

Funktionsanalyse der mitochondrialen Transportproteine UCP2, UCP3, UCPx und SOUP

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michaela Liebig
aus Bielefeld

Marburg/Lahn (2004)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	I
2	MATERIAL & METHODEN	9
2.1	Zellkultur	9
2.1.1	HEK 293-Zellen	9
2.1.2	Kultivierung	9
2.2	Transfektion mit Calcium-Phosphat	9
2.3	Expressionsvektoren	10
2.4	Klonierung von mUCP2 und mUCP3	11
2.4.1	PCR-Amplifizierung aus Maus-cDNA	11
2.4.2	Klonierung in Expressionsvektoren	12
2.5	Transformation	12
2.6	Plasmid-Präparation	12
2.7	Clark-Elektrode	13
2.8	Messung des Sauerstoffverbrauchs von HEK293 Zellen	14
2.8.1	Berechnung der relativen Atmungsraten	15
2.9	Mitochondrienisolation aus HEK293-Zellen	15
2.10	Proteinquantifizierung	16
2.11	SDS-Gel und Western-Blots	16
2.12	UCP1 und UCP3 Antikörperdetektion	17
2.12.1	Chemolumineszenz	18
2.13	Versuchstiere	18
2.13.1	Haltung und Zucht	18
2.13.2	Mutanten	19
2.14	In vitro Messungen des Fettsäurestoffwechsels	19
2.14.1	Versuchsgruppen	19
2.14.2	Tötung der Tiere und Gewebepräparation	20
2.14.3	Messung der β -Oxidation und Fettsäureaufnahme in isolierten Geweben	20
2.14.4	Bestimmung der freigesetzten CO ₂ -Mengen	21
2.14.5	Bestimmung der aufgenommenen Oleatmengen	23
2.14.6	Berechnung der oxidierten und aufgenommenen Oleatmengen	23
2.14.7	Mitochondrienisolation aus braunem Fettgewebe	25
2.14.8	Fettsäureveratmung von isolierten Mitochondrien	25
2.15	Analyse der mRNA-Expression	27
2.15.1	RNA-Isolation	27

2.15.2	Gelelektrophorese und Northern-Blots	27
2.15.3	cDNA-Sondenherstellung	28
2.15.4	Hybridisierung.....	29
2.15.5	Phosphor-Screen und Array Vision Analyse	29
2.15.6	18S-Korrektur.....	29
2.15.7	Vergleich der mRNA-Expressionslevel auf unterschiedlichen Blots	30
2.16	Genotypisierung	30
2.16.1	Extraktion von genomischer DNA	30
2.16.2	PCR-Amplifikation	31
2.16.3	Restriktionsverdau zur Genotypisierung.....	31
2.17	Statistik.....	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	O ₂ -Verbrauch von mUCP1, mUCP2, mUCP3, dmeUCPx und mSOUP transfizierten HEK293-Zellen	34
3.1.1	UCP1: Einfluss der DNA-Inkubationszeit auf den UCP1 Proteingehalt	34
3.1.2	O ₂ -Verbrauch von UCP1 transfizierten Zellen	35
3.1.3	Relative Atmungsraten von UCP1 transfizierten Zellen.....	37
3.1.4	Proteinnachweis von UCP1 und UCP3 in transfizierten Zellen	39
3.1.5	O ₂ -Verbrauch von mUCP2 und mUCP3 transfizierten Zellen	40
3.1.6	Relative Atmungsraten von mUCP2 und mUCP3 transfizierten Zellen.....	41
3.1.7	O ₂ -Verbrauch von dmeUCPx und mUCP1 transfizierten Zellen.....	42
3.1.8	Relative Atmungsraten von dmeUCPx und mUCP1 transfizierten Zellen	44
3.1.9	O ₂ -Verbrauch von dmeUCPx und dmeUCPx-mSOUP kotransfizierten Zellen	45
3.1.10	Relative Atmungsraten von dmeUCPx und mSOUP kotransfizierten Zellen.....	46
3.1.11	O ₂ -Verbrauch von mSOUP, UCP1 und kotransfizierten Zellen	47
3.1.12	Relative Atmungsraten von mUCP1 und mSOUP kotransfizierten Zellen.....	48
3.2	Genotypanalyse von Wildtypmüshen und Mutanten	50
3.3	Genexpressionsanalyse.....	52
3.3.1	UCP3 mRNA-Expression und Proteinanalyse im BAT.....	52
3.3.2	Korrelation des UCP3-Proteingehalts und der mRNA-Expression im BAT	54
3.3.3	Korrelation der UCP3 mRNA-Expression mit dem Genotyp	56
3.3.4	UCP3 mRNA-Expression im Skelettmuskel.....	57
3.3.5	MTE-I mRNA-Expression im Skelettmuskel und BAT	58
3.3.6	CPT-I mRNA-Expression im BAT	60
3.3.7	UCP1 mRNA-Expression im BAT	61
3.3.8	mRNA-Expression der SOD 2 im BAT	62
3.4	Fettsäurestoffwechsel in BAT und Skelettmuskelgewebeprobe.....	63

3.4.1	CO ₂ -Freisetzung des dorsal cervicalen BAT	63
3.4.2	Oleataufnahme des dorsal cervicalen BAT	66
3.4.3	CO ₂ -Freisetzung des Tibialis anterior	68
3.4.4	Oleataufnahme des Tibialis anterior	69
3.4.5	Vergleich der gesamten Oleataufnahme und Oxidationsrate von BAT und Skelettmuskel	70
3.5	β-Oxidation in isolierten BAT-Mitochondrien	72
3.5.1	Glycerol-3-Phosphat-Atmung (Messung I).....	72
3.5.2	Relative Atmungsraten Messung I	74
3.5.3	Fettsäureatmung (Messung II)	75
3.5.4	Relative Atmungsraten Messung II.....	76
3.5.5	O ₂ -Verbrauch bei unterschiedlichen Fettsäurekonzentrationen (Messung III).....	77
3.5.6	Relative Atmungsraten Messung III	78
4	DISKUSSION.....	80
4.1	Analyse der Entkopplerfunktion von mUCP1, mUCP2, mUCP3, dmeUCPx und mSOUP.....	80
4.1.1	Einfluss des UCP1-Proteingehalts auf die Zellatmung	81
4.1.2	Atmungseigenschaften von mUCP2 und mUCP3 transfizierten Zellen	84
4.1.3	Einfluss von dmeUCPx und mSOUP auf die mitochondriale Atmung	86
4.1.4	Fazit der Funktionsanalyse von mUCP2, mUCP3, dmeUCPx und mSOUP	89
4.2	Genotypanalyse von Wildtyphamstern und Mutanten	90
4.3	Genexpressionsanalyse.....	92
4.3.1	UCP3 mRNA-Expression und Proteinspiegel.....	92
4.3.2	MTE-I mRNA Expression	95
4.3.3	CPT-I mRNA-Expression	98
4.3.4	UCP1 mRNA-Expression	100
4.3.5	SOD2 mRNA-Expression	101
4.4	Fettsäurestoffwechsel von Wildtyphamstern und Mutanten.....	104
4.4.1	In vitro Fettsäurestoffwechsel in BAT-Gewebeproben	104
4.4.2	In vitro Fettsäurestoffwechsel im Tibialis anterior	111
4.4.3	Fettsäurestoffwechsel in isolierten Mitochondrien	114
4.5	Fazit zur UCP3 Funktion.....	122
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	126
6	LITERATUR.....	130

ABKÜRZUNGEN

18S	18S Untereinheit der ribosomalen RNA
AMPS	Ammoniumpersulfat
ADP/ATP	Adenosin-di-Phosphat/ Adenosin-tri-Phosphat
BAT	braunes Fettgewebe (<i>brown adipose tissue</i>)
bp	Basenpaare (<i>base paires</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CMV	Cytomelagovirus
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CPM	radioaktive Zerfallsrate (<i>counts per minute</i>)
CPT-I	Carnitin-Palmitoyl-Transferase I
dCTP	Desoxycytosin 5`-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>dme</i> UCP	<i>Drosophila melanogaster</i> UCP
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FCCP	carbonyl-cyanid <i>p</i> -[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazone
GDP/GTP	Guanin-di-Phosphat/ Guanin-tri-Phosphat
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
Gly-3-P/ G3P	Glycerol-3-Phosphat
HEK293	embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(ethanosulfonsäure); 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1`-(ethanosulfonsäure);
H ₂ O _{bb}	bidestilliertes Wasser
HRPO	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
kb	Kilobasen
kDA	Kilo-Dalton
KRB	Krebs-Ringer Puffer (<i>Krebs-ringer buffer</i>)
MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
MP	Mitochondrienprotein

mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (<i>messenger-RNA</i>)
MT	Mutante
MTE-I	mitochondriale Thioesterase I
mUCP	Maus-UCP
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphat-Puffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Palmitoyl-Carnitin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase-chain-reaction</i>)
P.S.	Dsungarischer Zwerghamster (<i>Phodopus sungorus</i>)
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RQ	Respiratorischer Quotient
r _s	Spearman Rangkorrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SA	spezifische Aktivität
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
Skm	Skelettmuskel
SNP	Einzelnucleotid-Polymorphismus (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
SOD “	Superoxiddismutase 2
SSC	Standard-Saline Citrat (Natriumchlorid, Natriumcitrat)
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
UCP	Entkopplerprotein (<i>uncoupling protein</i>)
WT	Wildtyp
w/ v	Gewichtsanteil pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

1 EINLEITUNG

Die Entkopplerproteine UCP1-5 (*uncoupling proteins*) gehören zur Familie der mitochondrialen Anionentransporter, zu der auch der ATP/ADP-Transporter und die Phosphat-, Citrat- und Oxoglutarat/Malat-Transporter gezählt werden (Boss et al., 1997). Generell besitzen alle mitochondrialen Transportproteine charakteristische Strukturmerkmale und Sequenzmotive. Sie sind aus durchschnittlich 300 Aminosäuren aufgebaut und besitzen eine dreiteilige, sich wiederholende Struktur aus je 100 Aminosäuren, die jeweils zwei α -helicale, hydrophobe Transmembrandomänen mit einem Matrix-loop bilden.

Die Entkopplerproteine UCP1-5 werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zum UCP1 zu einer Unterfamilie der mitochondrialen Anion-Transporter gezählt. Das namensgebende UCP1 wurde von Riquier und Kader 1976 entdeckt (Ricquier and Kader, 1976) und später die Sequenz zeitgleich von Aquila (Aquila et al., 1985) und Bouillaud (Bouillaud et al., 1986) aufgeklärt. Das UCP1 ist ein kernkodiertes, 307 Aminosäuren und rund 33 kDa großes Protein, welches im Cytosol synthetisiert und anschließend in die innere Mitochondrienmembran inkorporiert wird. Es ist bisher das einzige funktionell charakterisierte Protein dieser Familie.

UCP1 wird ausschließlich im braunen Fettgewebe (BAT) von Kleinsäugetieren und jungen Säugetieren exprimiert und gilt als Schlüsselenzym der zitterfreien Wärmebildung (Enerbäck et al., 1997). Die Produktion von zitterfreier Wärme in den Mitochondrien des BAT wird durch die Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese bewirkt. Dabei erfolgt der energieliefernde Protonenrückfluss in die Mitochondrienmatrix nicht über die ATP-Synthase, sondern über UCP1. Die dabei frei werdende Energie wird nicht in Form von ATP gespeichert, sondern als Wärme freigesetzt.

Der genaue Mechanismus des UCP1 vermittelten Protonentransports, sowie die Regulation sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Freie Fettsäuren wirken offensichtlich als Kofaktoren für den H^+ -Transport und gelten als physiologische Aktivatoren von UCP1. Für den Mechanismus des fettsäureabhängigen Protonentransports bzw. der UCP1-Aktivität gibt es verschiedene Hypothesen. Zum einen wird angenommen, dass Protonen direkt über UCP1 transportiert werden. Der Protonentransport erfolgt dabei möglicherweise über UCP1-assoziierte Fettsäuren (Klingenberg and Huang, 1999). Zum anderen wird postuliert, dass UCP1 Fettsäureanionen aus der Matrix heraustransportiert, die in undissoziierter, neutraler Form durch die Membran gelangt sind (*flip-flop*-Mechanismus) und in der Mitochondrienmatrix schließlich deprotoniert werden (Garlid et al., 1996). Eine Inhibition des

Protonentransports über UCP1 erfolgt nachweislich durch Purinnucleotide (Klingenberg and Huang, 1999; Echtay et al., 2001). Die durch UCP1 vermittelte Entkopplung wird zudem abhängig von weiteren Faktoren wie dem Membranpotential und dem pH-Wert reguliert. Mit ansteigendem pH-Wert (6.8-7.8) und infolge einer Erhöhung des Membranpotentials erfolgt ein erhöhter, fettsäureaktiverter H^+ -Transport. Die Sensitivität von UCP1 für Purinnucleotide sinkt unter diesen Bedingungen (Klingenberg and Huang, 1999).

Die nach UCP1 entdeckten Entkopplerproteine UCP2 (Fleury et al., 1997) und UCP3 (Boss et al., 1997) besitzen eine vergleichsweise hohe Sequenzähnlichkeit von ~59 % bzw. ~57 % zum UCP1. Untereinander beträgt die Ähnlichkeit rund 73 % (Boss et al., 1997; Ricquier and Bouillaud, 2000). Verschiedene, für UCP1 charakteristische Sequenzmotive konnten auch bei UCP2 und UCP3 nachgewiesen werden, weshalb auch für diese beiden Proteine eine Protonentransportfunktion denkbar ist. Das UCP3 besitzt beispielsweise wie UCP1, spezifische Aminosäuren bzw. Aminosäuremotive, welche für die Bindung von Purinnucleotiden und die pH-abhängige Kontrolle der Nucleotidbindung notwendig sind. Des Weiteren ist beim UCP3 eines der beiden Histidine (His^{145/147}) im zweiten Matrix-loop konserviert, welche offensichtlich für den fettsäureaktivierten Protonentransport des UCP1 verantwortlich sind. Im UCP2-Molekül sind diese Histidine nicht vorhanden (Hagen and Lowell, 2000).

Die Expression von UCP2 und UCP3 ist anders als beim UCP1, nicht nur auf ein Gewebe beschränkt. Das UCP2 ist in verschiedenen Geweben, unter anderem in Muskel, Niere, Milz und den Macrophagenzellen des Immunsystems zu finden (Ricquier and Bouillaud, 2000). UCP3 wird überwiegend im BAT und im Skelettmuskel exprimiert. Die weiteren Mitglieder der Entkopplerproteinfamilie, das UCP4 und UCP5 (auch als BMCP1 (*brain mitochondrial carrier protein*) bezeichnet) sind in neuronalem Gewebe, besonders im Gehirn nachgewiesen worden (Mao et al., 1999; Sanchis et al., 1998). Die Ähnlichkeit von UCP4 und UCP5 zu den anderen UCPs ist relativ gering (34-39 %). Bei UCP4 bildet lediglich die Nucleotidbindedomäne ein gemeinsames Sequenzmotiv (Bouillaud et al., 1994; Ricquier and Bouillaud, 2000). UCP4 und UCP5 gelten daher nur als sehr entfernte Mitglieder der Proteinfamilie. UCP4 ist vermutlich das „älteste“ und daher das ursprüngliche UCP, von dem sich die anderen Entkopplerproteine während der stammesgeschichtlichen Entwicklung abgeleitet haben. UCP1 ist wahrscheinlich das jüngste Mitglied der Familie. Beim UCP3 geht man davon aus, dass es aus einer Gendublikation von UCP2 hervorgegangen ist, da sich

UCP2 und UCP3 direkt nebeneinander auf einem Chromosom befinden (Ledezma et al., 2002).

UCP4 und UCP5 sind im Tierreich weiter verbreitet, als die anderen UCPs. Sie konnten sowohl in Chordaten, als auch in Insekten detektiert werden (Abb.1). Es gibt sogar verwandte Vertreter bei Pflanzen. Die UCP1-Paralogen UCP2 und UCP3 sind bislang bei Säugern und verschiedenen anderen Chordaten, wie Fischen, Vögeln und Beuteltieren nachgewiesen worden. Da UCP1 spezifisch im braunen Fettgewebe exprimiert wird, ist auch seine Verbreitung im Tierreich vermutlich nur auf die Säugetiere beschränkt.

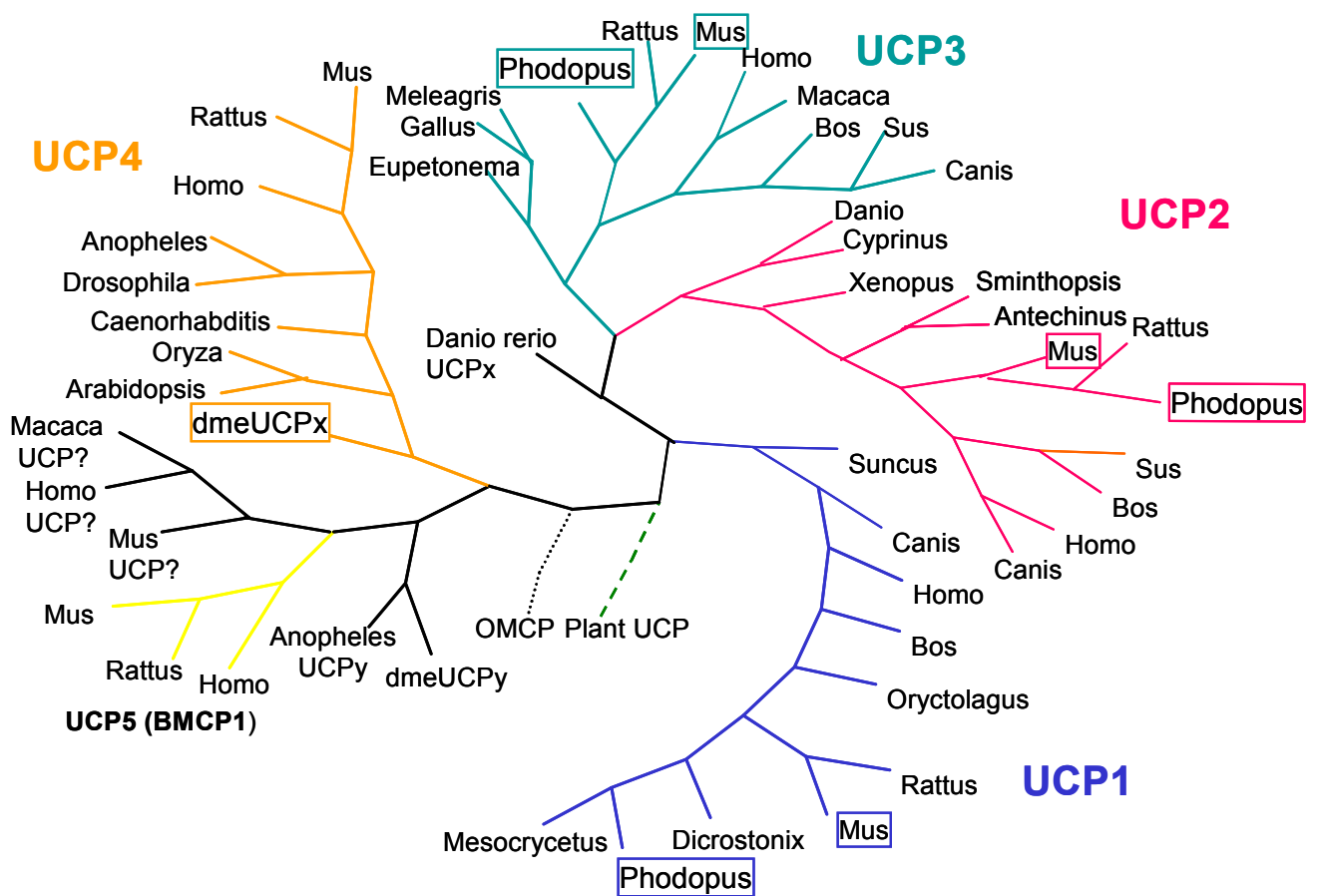


Abb. 1: Stammbaum der fünf bislang gefundenen UCPs (UCP1-5). Verrechnet wurden alle UCP-ähnlichen Sequenzen mit der *Neighbour joining*-Methode. Dargestellt ist der Verwandtschaftsgrad der bisher annotierten UCP Aminosäuresequenzen (Jastroch, 2003 a/ b, modifiziert). OMCP= Oxoglutarat/Malat-Carrier, blau= UCP1, rot= UCP2, grün= UCP3, orange= UCP4, gelb= UCP5/BMCP1, ?/schwarz= bislang nicht geclusterte UCPs; in Kästchen= in dieser Arbeit untersuchte UCPs;

Die Funktion und Bedeutung der neuen Mitglieder der UCP-Familie im Stoffwechsel sind noch ungeklärt. Die Funktionshypothesen zum UCP2 und UCP3 basieren vorwiegend auf Ergebnissen aus Analysen der Expressionsregulation der Gene.

Da die Expression von UCP3 im BAT entsprechend dem UCP1 beispielsweise bei Kälteakklimatisierung induziert wird, wurde zunächst angenommen, dass auch UCP3 eine Rolle bei der adaptiven Thermogenese im BAT spielt. Experimente an UCP3 *knock out* Mäusen (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000) und an Hamstern mit einem gewebespezifischen UCP3 Defizit im BAT (Liebig et al., 2004) haben jedoch gezeigt, dass ein Fehlen des Proteins die Kapazität der zitterfreien Thermogenese nicht beeinträchtigt. Dass eine direkte Beteiligung von UCP3 bzw. UCP2 an der Thermogenese unwahrscheinlich ist konnte zudem daraus geschlossen werden, dass die mehrfache Induktion der UCP2 mRNA-Expression in UCP1 *knock out* Mäusen, keinen kompensatorischen Effekt für das Fehlen von UCP1 hat, da die Mäuse kältesensitiv waren (Enerbäck et al., 1997).

Eine Protonentransport- bzw. Entkopplerfunktion, sowie die Regulationsmechanismen von UCP2 und UCP3 wurde bis heute in zahlreichen homologen und heterologen Expressionssystemen, nach Rekonstitution in Proteoliposomen und Hefen, sowie in transgenen und *knock out* Mäusen untersucht. Einen eindeutigen Nachweis für oder gegen eine mit UCP1 vergleichbare, fettsäureinduzierte Entkopplung bzw. eine Bedeutung von UCP3 als Protonentransporter haben diesen Analysen allerdings nicht erbracht. Auch die Inhibition durch Purinnucleotide ist weiterhin umstritten (Echtay et al., 2001; Hagen et al., 2000; Jaburek et al., 1999).

Neben der Protonentransportfunktion haben die Analysen der Expressionsregulation von UCP3 im BAT und Skelettmuskel Hinweise auf eine Funktion des Proteins im Energiehaushalt gegeben. Demnach besteht offensichtlich ein Zusammenhang der UCP3-Expression mit dem Energieumsatz bzw. dem Fettsäurestoffwechsel (Samec et al., 1998). Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass UCP3 nur im Skelettmuskel und BAT exprimiert wird, zwei Geweben, die eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation des Energiehaushaltes besitzen (Lowell et al., 1993). Die Regulation der Expression in beiden Geweben erfolgt unabhängig voneinander. Im BAT wird UCP3 nach Kälteexposition induziert, im Skelettmuskel nach Fasten, während bei erhöhtem T₃-Spiegel die Expression in beiden Geweben erhöht wird (Boss et al., 1998). Eine Induktion von UCP3 erfolgt demnach offensichtlich abhängig von der Stoffwechselaktivität des Gewebes.

Basierend auf diesen bisherigen Ergebnissen aus verschiedenen Studien, werden derzeit hauptsächlich zwei Funktionshypothesen von UCP3 diskutiert. Es wird zum einen angenommen, dass UCP3 als Protonentransporter oder zum anderen als Fettsäureexporter fungiert.

Die Hypothese der Funktion von UCP3 als Fettsäureexporter von Himms-Hagen und Harper (Himms-Hagen und Harper, 2001) postuliert eine regulative Bedeutung von UCP3 im Fettsäurestoffwechsel (Abb. 2 A). Grundlage für diese Hypothese bilden unter anderem Befunde aus Expressionsanalysen, die auf eine Koregulation von UCP3 und der mitochondrialen Thioesterase (MTE-I) hindeuten. Es wird angenommen, dass die MTE-I durch Hydrolyse von Acyl-CoA den mitochondrialen Coenzym A-Pool reguliert, der als limitierender Faktor für den Ablauf des Citrat-Zyklus und der β -Oxidation gilt. Die bei der Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren können in den Mitochondrien nicht verstoffwechselt werden und müssen daher, vermutlich über UCP3, heraustransportiert werden.

Eine etwas andere Bedeutung von UCP3 als Fettsäuretransporter wird in einer von Schrauwen et al. aufgestellten Hypothese beschrieben (Schrauwen et al., 2003). Laut dieser Hypothese stammen die freien Fettsäuren in den Mitochondrien nicht aus der Hydrolyse von Acyl-CoA, sondern gelangen, besonders bei erhöhtem intrazellulären Fettsäurespiegel, als neutrale Fettsäuren über einen *flip-flop*-Mechanismus in die Mitochondrien (Abb. 2 B). Da freie Fettsäuren nicht oxidiert werden und potentiell eine Bildung von zelltoxischen Radikalen bewirken können, müssen diese aus den Mitochondrien heraustransportiert werden. UCP3 würde demnach weniger eine Bedeutung in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels, sondern eher bei der Radikalabwehr zukommen.

Auch die UCP3-Funktion als Protonentransporter, wird überwiegend im Zusammenhang mit der Abwehr von Sauerstoffradikalen gesehen. Sauerstoffradikale können bei erhöhter Aktivität der Atmungskette bzw. durch die damit verbundene Erhöhung des Membranpotentials, durch einen Elektronentransfer auf Sauerstoff oder durch Ubichinon entstehen (Abb. 2 C) (Petrosillo et al., 2001; Echtay et al., 2000). Durch „milde“ Entkopplung über einen UCP3 vermittelten Protonentransport, könnte das Membranpotential moderat erniedrigt und die Radikalbildung dadurch vermindert werden (Skulachev, 1998).

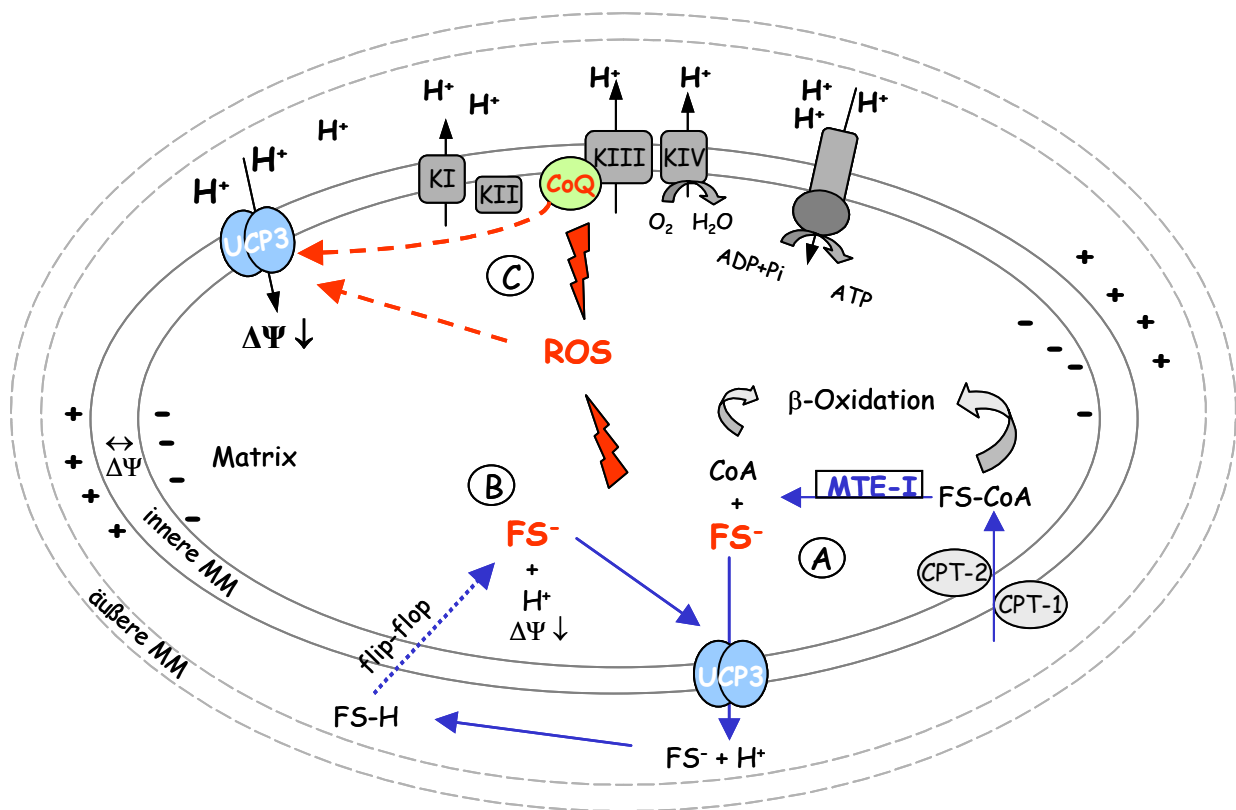


Abb. 2: UCP3 Funktionshypothesen. UCP3 als Fettsäureexporter: (A) Export von Fettsäuren (FS^-) die bei der MTE-I (mitochondrialen Thioesterase) katalysierten Hydrolyse von Acyl-CoA frei werden. (B) Protonierte Fettsäuren, die über einen flip-flop-Mechanismus in die Mitochondrienmatrix gelangen, werden dort deprotoniert und führen zu einer Erniedrigung des Membranpotentials ($\Delta\Psi\downarrow$). Freie Fettsäuren können nicht oxidiert werden und tragen potentiell zur Radikalbildung (ROS) bei. (C) UCP3 als Protonentransporter, der durch Entkopplung ($\Delta\Psi\downarrow$) die Bildung von Radikalen in der Atmungskette verhindert. Bei hoher Atmungskettenaktivität kann Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) durch Elektronentransfer auf O_2 oder $UQ^{\cdot-}$ als freies Radikal durch Reduktion von Coenzym Q ($CoQH_2$) entstehen. (Lanni et al., 2003, modifiziert); KI-KIV= Komplexe der Atmungskette; MM= Mitochondrienmembran; CPT-1/2= Carnitin-Palmitoyltransferase1 und 2;

Für UCP2 ist nach bisherigen Expressions- und Funktionsanalysen auch eine Funktion bei der Radikalabwehr denkbar (Negre-Salvayre et al., 1997; Arsenijevic et al., 2000).

Sollten UCP2 und UCP3 beide eine Rolle bei der Radikalabwehr spielen ist allerdings anzunehmen, dass sie unterschiedliche Bedeutung besitzen bzw. funktionell verschieden sind, da beide Proteine in BAT und Skelettmuskel kolokalisiert sind und bei gleicher Funktion redundant wären.

Um die Funktion der Entkopplerproteine zu analysieren bietet es sich an, die Proteine z.B. in Zellen oder Tieren zu überexprimieren oder das Gen auszuschalten und die Folgen des Defizits für die Zellen oder den Organismus zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen, eine mögliche Funktion der neuen Mitglieder der UCP-Familie als Protonentransporter bzw. Entkopplerproteine untersucht. Dafür wurden UCP1, UCP2 und UCP3 aus der Maus in embryonalen Nierenzellen (HEK293) transient exprimiert und der Einfluss auf die Zellatmung durch Messung des Sauerstoffverbrauchs analysiert.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Firma Develogen (Göttingen) wurde zudem eine mögliche Entkopplerfunktion des dmeUCPx, einem UCP4-Ortholog aus *Drosophila melanogaster* in HEK293-Zellen untersucht. Außerdem wurde der möglicherweise regulatorische bzw. inhibitorische Einfluss des mitochondrialen Folat-Carriers „SOUP“ auf die UCP vermittelte Entkopplung, nach Koexpression mit dmeUCPx und UCP1 in HEK293 Zellen geprüft.

Des Weiteren wurde die Hypothese der Funktion von UCP3 als Regulator des mitochondrialen Fettsäurestoffwechsels in Dsungarischen Zwerghamstern mit UCP3 Defizit im BAT untersucht.

Der Dsungarische Zwerghamster stellt ein gutes Versuchsmodell für die Analyse von Regulationsmechanismen des Energiehaushaltes und der (zitterfreien) Thermogenese dar. In seinem Verbreitungsgebiet, den zentralasiatischen Steppen herrscht ein kontinentales Klima mit starken jahreszeitlichen Temperaturschwankungen (Flint, 1966). Der Zwerghamster kann jedoch durch saisonale morphologische und physiologische Anpassungen unter diesen extremen Bedingungen überleben. Beispielsweise besitzen die Tiere im Winter eine hohe Kältetoleranz durch eine verbesserte Thermogenese. Des Weiteren ermöglicht eine Reduktion des Körpergewichts, sowie Phasen von Tageschlaflethargie (Torpor) eine Einsparung von Energie (Figala et al., 1973; Heldmaier and Steinlechner, 1981a; Heldmaier and Steinlechner, 1981b)

In der Zuchtkolonie von Dsungarischen Zwerghamstern des Fachbereichs Biologie der Philipps Universität Marburg wurde eine Mutante entdeckt, die durch eine bislang unbekannte, spontane Mutation kein UCP3 im braunen Fettgewebe exprimiert. Das Fehlen der UCP3-Expression bei den Mutantenhamstern ist auf das BAT beschränkt, die Expression im Skelettmuskel der Tiere ist nicht beeinträchtigt. Bisherige Erkenntnisse lassen vermuten, dass eine Mutation in einem für die gewebespezifische Expression verantwortlichen Bereich

des UCP3-Promotors aufgetreten ist oder eine andere Störung im intrazellulären Signalweg besteht. Der Phänotyp der Hamster konnte bislang nur anhand von Analysen der UCP3 mRNA-Expression im BAT eindeutig nachgewiesen werden. Eine kürzlich begonnene Analyse der UCP3-Gensequenz von Wildtypen und Mutanten hat zwei Einzelnucleotid-Polymorphismen im ersten Intron des UCP3-Gens aufgedeckt. Ob diese Mutationen Ursache für das Fehlen der UCP3-Expression im BAT sind, gilt es noch jedoch noch zu bestätigen. Nach diesen bisherigen Befunden wird die Mutation autosomal-rezessiv vererbt.

Um eine Bedeutung von UCP3 für den Fettsäurestoffwechsel zu bestätigen wurde untersucht, ob das Fehlen von UCP3 im BAT der Mutanten bzw. die Änderung des UCP3-Gehalts im BAT und Skelettmuskel nach Fasten oder Kälteexposition, einen Einfluss auf die mitochondriale Fettsäureoxidation hat. Die Fettsäureoxidationskapazität des BAT von Wildtyphamstern und Mutanten wurde *in vitro* in Gewebeproben und in isolierten Mitochondrien analysiert.

Zudem wurde neben der Expressionsregulation von UCP3, auch die Expression der mitochondrialen Thioesterase und der Carnitin-Palmitoyl-Transferase-I im BAT und Skelettmuskel von beiden Phänotypen nach Fasten und Kälteexposition untersucht. Beide Proteine besitzen eine Funktion im mitochondrialen Fettsäurestoffwechsel.

Hinweise auf eine Bedeutung von UCP3 bei der Radikalabwehr wurde anhand der mRNA-Expression der mitochondrialen Superoxid-Dismutase 2 in 28 Tage kaltakklimatisierten Hamstern geprüft.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Zellkultur

2.1.1 HEK 293-Zellen

Die Zellkulturstudien wurden an humanen, embryonalen Nierenzellen, bezeichnet als HEK 293 (*human embryonic kidney cells*) durchgeführt. Diese Zelllinie wurde durch eine Transformation von DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 generiert (Graham et al., 1977).

2.1.2 Kultivierung

Die HEK 293-Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen (Greiner, TPP) gezüchtet. Die Kultivierung erfolgte in (7 ml) Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) mit 25 mM Glucose, 25 mM HEPES (pH 7.4) und 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom). Zudem wurde dem Medium 50 µg/ml des Antibiotikums Gentamycin (Gibco) zugegeben. Die Haltung der Zellen erfolgte bei 37°C in einem Inkubator (Forma Scientific) mit 5 % CO₂ angereicherter Atmosphärenluft.

Sobald die Zellen auf den Schalen konfluent gewachsen waren (nach 3-4 Tagen), wurden sie passagiert. Dafür wurden sie mit 5 ml Salz-Phosphatpuffer (PBS) einmal gewaschen und anschließend mit einem 0.2 % igen Trypsin-Puffer (0.2 % Trypsin, 50 µM EDTA, 10 µM Natriumascorbat, in PBS, pH 7.4) abgelöst. Die Reaktion wurde nach vollständiger Ablösung der Zellen durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit Medium verdünnt und die Zellen auf 4-6 neue Kulturschalen verteilt.

2.2 Transfektion mit Calcium-Phosphat

Die transiente Transfektion der HEK 293 Zellen wurde mit der Calcium-Phosphat-Methode durchgeführt (Graham and van der Eb, 1973). Bei dieser Methode wird (Plasmid-) DNA in eine gepufferte, phosphathaltige Salzlösung gegeben. Nach Zugabe von CaCl₂ entsteht ein Präzipitat aus DNA-Calcium und Phosphat. Die DNA-Calcium-Phosphat Suspension wird auf die Zellen gegeben, sedimentiert und wird an der Zellmembran

adsorbiert. Während der Inkubation bei 37°C wird die DNA durch einen calciumabhängigen Prozess aufgenommen.

Die Zellen müssen für die Transfektion subkonfluent (50-60 %) gewachsen sein. Die aufgenommene DNA kann erst während einer Zellteilung in den Kern gelangen und transkribiert werden. Die Zellen wurden daher ~24 h vor der Transfektion passagiert.

Ein bis drei Stunden vor der Transfektion wurden 10 ml frisches Kulturmedium auf jede 10 cm Kulturschale gegeben.

Für die Transfektion der Zellen wurden 20 µg Plasmid-DNA mit 50 µl einer 2 M CaCl₂-Lösung versetzt und mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt; anschließend wurde bei schwachem schütteln (Vortex) 500 µl Phosphatpuffer (280 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4, 1.5 mM Na₂HPO₄) tropfenweise dazu pipettiert. Es bildete sich ein feiner, unter dem Mikroskop erkennbarer Niederschlag. Jeweils 1 ml des DNA-Calcium-Phosphat-Mix wurde auf jede Kulturschale aufgetropft und durch leichtes schwenken verteilt.

Die Inkubationszeit der Zellen mit der Plasmid-DNA betrug bei der UCP1-Transfektion 6 h und 16 h. Bei allen anderen Transfektionen wurden die Zellen 16 h mit Plasmid-DNA inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationzeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1-2 mal mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium gegeben. Nach etwa 36-48 h waren die Zellen konfluent gewachsen und die maximale Transfektionseffizienz erreicht.

2.3 Expressionsvektoren

Für die Transfektionsexperimente wurden die Expressionsvektoren pcDNA3 (Invitrogen) und pEGFP-N1 (Clontech) eingesetzt. Beide tragen CMV (*human cytomegalovirus*) Promotoren für die Expression von klonierten Genen in eukaryotischen Zellen. Der pcDNA3-Vektor trägt zur Selektion ein Ampicillinresistenzgen, der pEGFP-N1-Vektor ein Kanamycinresistenzgen. In den Expressionsvektor pcDNA3 wurden jeweils die cDNA-Fragmente der kodierenden Sequenzen von mUCP2 (Maus, 940 bp) und mUCP3 (Maus, 1100 bp) kloniert. Die pcDNA3 Vektoren mit kloniertem mUCP1 (Maus), dmeUCPx (Drosophila) und mSOUP (Maus) wurden von der Firma Develogen zur Verfügung gestellt.

Der Vektor pEGFP-N1 trägt ein (modifiziertes) Gen für das *green-flourescent-protein* (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* (Cormack et al., 1996). Das GFP absorbiert Licht mit einem

Excitationsmaximum von 488 nm und fluoresziert bei einem Emissionsmaximum von 507 nm. Dieser Vektor wurde zur Überprüfung der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Zellen die GFP exprimieren erscheinen grün leuchtend im Mikroskop. Die für die Kotransfektion eingesetzte Menge an pEGFP-N1 betrug $\frac{1}{3}$ der insgesamt eingesetzten DNA. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die Anzahl der grün leuchtenden Zellen (subjektiv) geschätzt. In den Experimenten wurden nur Platten mit einer vergleichbaren Menge (> 50 %) an grün leuchtenden Zellen eingesetzt.

2.4 Klonierung von *mUCP2* und *mUCP3*

2.4.1 PCR-Amplifizierung aus Maus-cDNA

Für die Klonierung der pcDNA3-Vektoren mit *mUCP2* und *mUCP3*, wurden die Gene mit mittels PCR (*polymerase chain reaction*) aus Maus-cDNA amplifiziert. Die cDNA-Synthese erfolgte aus Maus Skelettmuskel-RNA mit Oligo-dT Primern und einer Reversentranskriptase (Superscript II, Invitrogen). Die Genamplifikation wurde mit einer *Proofreading*-Polymerase (Pfu-Polymerase) (Statagene) durchgeführt. Diese besitzt eine *proofreading* Exonucleaseaktivität von 3' nach 5' die es ermöglicht, falsch inkorporierte Nucleotide zu korrigieren. Die Wahrscheinlichkeit von (Punkt-) Mutationen in den amplifizierten Genen wird dadurch reduziert.

Für die Amplifikation wurden modifizierte Primer mit integrierten Restriktionsschnittstellen eingesetzt (Tab. 1).

Tab. 1: Oligo-Primer zur *mUCP2* und *mUCP3* PCR-Amplifizierung

<i>mUCP2</i>	Primersequenz	Schnittstelle
Forward Primer	5'-AATCGAATTCATGGTTGGTTTCAAGGC	EcoRI
Reverse Primer	5'-CGGAGGCACCTTTCTGAGCTCCTCC	XhoI

<i>mUCP3</i>	Primersequenz	Schnittstelle
Forward Primer	5'-TGCGGATCCCTAATGGAGTGGAGCCTTAGG	EcoRI
Reverse Primer	5'-CGAGAATTCGCC-TGCTTGCCTTGTTCA	BamHI

Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC 200) durchgeführt (Denaturierung bei 94°C, 2 min; Annealing Temperatur 60°C für UCP2/ 56°C für UCP3, 1 min; 72°C, 1 min, 40 Zyklen).

2.4.2 Klonierung in Expressionsvektoren

Für die Klonierung wurden das mUCP2-PCR-Produkt sowie der pcDNA3-Vektor mit EcoRI und XhoI verdaut. Das mUCP3-PCR-Fragment und der pcDNA3-Vektor wurden mit EcoRI und BamHI verdaut (alle Enzyme stammten von Amersham pharmacia). Anschließend wurden die Fragmente in einer Ligationsreaktion mit einer Ligase (Promega) nach Herstelleranleitung in den Vektor kloniert.

Die Expressionsvektoren wurden nach erfolgreicher Ligation in kompetente Bakterien transformiert, das Plasmid isoliert und sequenziert (MWG).

2.5 Transformation

Für die Amplifizierung der Plasmide wurden die fertig klonierten Vektoren (mUCP1, mUCP2, mUCP3, dmeUCPx und mSOUP) in kompetente E coli Bakterien (Stamm DH5 α , Gibco) transformiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien wurde dabei durch einen kurzen Hitzeschock (45 sec, 42°C) induziert. Die transformierten Bakterien wurden zunächst auf antibiotikahaltigem Agar-Nährboden selektiert. Einzelne Klone wurden dann gepickt und in Flüssigkulturen vermehrt.

2.6 Plasmid-Präparation

Die Isolation der Plasmide erfolgte mit einem Plasmid-Extraktionskit von Qiagen (QIAprep-Mini- und Megaprepkit) und wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. In diesem Protokoll erfolgt zunächst eine alkalische Lyse der Bakterienzellen. Anschließend wird die Plasmid-DNA selektiv an eine Silicagelmembran gebunden, mit 70 % Ethanol gewaschen und schließlich in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) eluiert.

Um für die Transfektion von HEK293-Zellen ausreichend Plasmid zur Verfügung zu haben, wurden 500 ml Bakterienkulturen angesetzt und die Plasmide mit dem Qiagen-Megaprepkit

isoliert. Die Quantifizierung der gereinigten Plasmide erfolgte photometrisch (Ultrospec® 2100 pro, Amersham pharmacia).

2.7 Clark-Elektrode

Der Sauerstoffverbrauch von Zellen und Mitochondrien wurde polarographisch mit einer Clark-Elektrode (Hansatech) gemessen. Die Elektrode befand sich in einer verschließbaren Messkammer, die durch einen umgebenen Wassermantel auf 37°C temperiert wurde (Abb. 3).

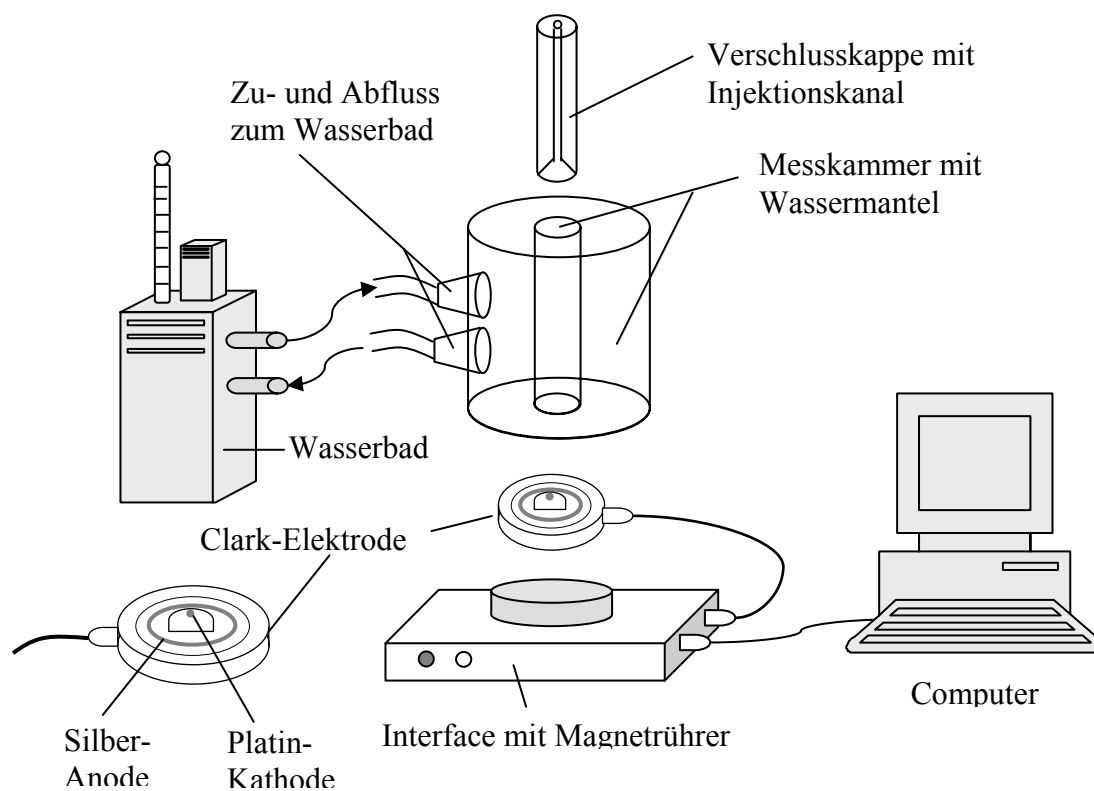


Abb. 3: Messaufbau zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen und isolierten Mitochondrien mit einer Clark-Elektrode.

Die Elektroden (Silber/Silber-Chlorid- Anode und Platin-Kathode) der Clark-Elektrode waren von einer 3 M KCl Elektrolyt-Lösung umgeben und wurden von der Messkammer durch eine sauerstoffpermeable Teflonmembran getrennt. Durch eine angelegte Spannung (0.6 V), wurde Sauerstoff an der Kathode unter Bildung von Wasser reduziert. Chlorid-Anionen wanderten zur Anode und gaben Elektronen ab, wodurch ein messbarer Elektronenfluss zwischen

Kathode und Anode entstand, der sich linear zum Sauerstoffpartialdruck in der Lösung verhielt.

Die von der O₂-Konzentration abhängigen Spannungsänderungen an den Elektroden wurden über ein Interface an einen Computer übermittelt und das Spannungssignal von einem zugehörigen Programm (Oxygraph) in eine Sauerstoffkonzentration umgerechnet. Die Sauerstoffabnahme in der Messkammer wurde als eine Funktion der Änderung der O₂-Konzentration pro Zeit berechnet und graphisch dargestellt. Das Programm ermöglichte es, aus der Steigung in einem ausgewählten Abschnitt der Verlaufskurve den Sauerstoffverbrauch (in nmol O₂*min⁻¹) automatisch zu berechnen.

Vor der Messung wurde durch eine Zweipunkt-Kalibrierung der Punkt der Sauerstoffsättigung mit O₂-äquilibriertem Messpuffer (37°C) bestimmt und der sauerstofffreie Nullpunkt nach Zugabe von Natrium-Dithionit (Na₂S₂O₄) festgelegt. Bei der Kalibrierung und Messung wurde die Temperatur der Messlösung und der Luftdruck mit einbezogen.

2.8 Messung des Sauerstoffverbrauchs von HEK293 Zellen

Für die Messung wurden die Zellen kurz mit 5 ml PBS gewaschen und durch 1.5 ml Trypsinpuffer von der Kulturschale abgelöst. Nach Stoppen der Reaktion mit (4 ml) DMEM wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (6 ml, Falcon) überführt und 1 min bei 2000 rpm/739 g (Rotor JS 7.5, Beckmann) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml serumfreien, sauerstoffäquilibriertem DMEM (37°C) vorsichtig resuspendiert. Je 1 ml Zellsuspension wurde in eine der beiden Messkammern gegeben. Sofort nach Aufsetzen der Verschlusskappe wurde das Messprogramm gestartet. Zunächst wurde der basale Sauerstoffverbrauch der Zellen mit 5 mM Glucose als Substrat ermittelt. Nach Erreichen eines stabilen O₂-Verbrauchs der Zellen, wurde die ATP-Synthase durch Zugabe des Antibiotikums Oligomycin (1.2 µM) irreversibel inhibiert. Um eine durch Fettsäuren induzierte Entkopplung zu prüfen, wurde Palmitat mit einer Endkonzentration von 50 µM bis 100 µM in die Kammer pipettiert. Die maximale entkoppelte Atmung wurde durch 400-700 nM Carbonyl-cyanid *p*-[trifluoromethoxy]-phenyl-hydrazone (FCCP), einem synthetischen Protonentranslokator, induziert. Dabei handelt es sich um eine lipophile, schwache Säure, die pH abhängig als Shuttle für H⁺-Ionen agiert, indem sie die Protonen vom Intermembranraum zur Matrix transportiert.

2.8.1 Berechnung der relativen Atmungsraten

In den Messungen wurden jeweils alle Zellen einer Platte eingesetzt, die genaue Zellzahl war jedoch nicht bekannt. Um ausschließen zu können, dass Unterschiede in den Atmungsraten durch unterschiedliche Zellzahlen bedingt sind, wurde der maximale Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von FCCP als Referenzwert für die Zellzahl eingesetzt. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass alle Zellen bei einem ausreichenden Substratangebot, einen vergleichbaren maximalen Sauerstoffverbrauch haben. Die Rate des maximalen Sauerstoffverbrauchs mit FCCP von jeder Messung (pro Messkammer) wurde als 100 % ige Atmungsrate festgelegt. Auf diesen maximalen O₂-Verbrauch wurden die anderen gemessenen Raten prozentual bezogen und als relative Atmungsraten dargestellt.

2.9 Mitochondrienisolation aus HEK293-Zellen

Um die erfolgreiche Transfektion von HEK293-Zellen mit mUCP1 und mUCP3 zu überprüfen, wurden UCP1- und UCP3-Proteine in den Mitochondrien mittels Western-Blot Analysen nachgewiesen. Zudem sollte geprüft werden, ob abhängig von der Dauer der Inkubation der Zellen mit der UCP1-DNA quantitative Unterschiede im Proteingehalt auftreten.

Für die Mitochondrienpräparation wurden die Zellen einer Kulturschale in 1 ml Isolationsmedium (250 mM Sucrose, 5 mM TES, 1 mM EDTA-K₂; pH 7.2) mit einem Zellschieber zusammengeschaubt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit einem Mikropistill (Treff Lab) wurden die Zellen mit 15 Hüben aufgeschlossen und das Homogenat anschließend 10 min in einer Tischzentrifuge bei 8500 g zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Isolationsmedium resuspendiert. Nach erneutem zentrifugieren bei 700 g für 10 min, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die Mitochondrien bei 8500 g (10 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Mitochondrienpellet in ~20µl Isolationsmedium resuspendiert. Die weitere Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.10 Proteinquantifizierung

Die Mitochondrienproteinmenge wurden photometrisch mit einem Spektrophotometer quantifiziert (Ultrospec® 2100 pro, Amerham pharmacia).

Zur Quantifizierung wurde jeweils eine Eichkurve mit BSA-Proteinstandards bekannter Konzentration erstellt. Die Standards wurden in dem jeweiligen Mitochondrienisolationspuffer angesetzt.

BCA-Assay

Die Mitochondrienproteinmenge aus den transfizierten HEK293-Zellen wurde nach der Bicinchoninic Acid (BCA) Methode (Smith et al., 1985) mit einem Kit der Firma Pierce bestimmt. Bei dieser Methode werden Cu^{2+} -Ionen in einer alkalischen Proteinlösung zu Cu^+ reduziert (Biuret Reaktion), welches mit BCA einen violettfarbenen Komplex bildet. Die Farbintensität verstärkt sich proportional mit zunehmender Proteinkonzentration und kann photometrisch bei 562 nm gemessen werden.

Bradford-Assay

Die Mitochondrienproteinmenge aus BAT-Proben wurde nach Bradford (Serra and Morgante, 1980) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte in einer sauren Coomassie-Lösung (0.01 % Coomassie Brilliant Blue G250, 4.7 % Ethanol, 8.5 % Phosphorsäure), deren Absorptionsmaximum sich abhängig von der Proteinkonzentration von 495 nm auf 595 nm verschiebt.

2.11 SDS-Gel und Western-Blots

Der qualitative und quantitative Nachweis von UCP1- und UCP3-Proteinen in Mitochondrien von transfizierten Zellen bzw. in Mitochondrien aus Gewebe, erfolgte durch eine Detektion mit spezifischen Antikörpern auf Western-Blots.

Die Proteine wurden zunächst in einem SDS-Gel gelelektrophoretisch nach ihrer Größe in einer Mini-Gel-Kammer (Biorad) aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde nach einer von Laemmli (Laemmli, 1970) eingeführten Methode, in modifizierter Form durchgeführt. Das SDS-Gel bestand aus einem Trenngel (12.5 % Acrylamid (30 % (w/v))/ bis-Acrylamid (0.8 %

(w/v))-Lösung (rotiphorese Gel 30, ROTH), 62.5 mM TRIS, pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.05 % Ammoniumpersulfat, 0.05 % N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin), welches von einem Sammelgel überschichtete wurde (3 % Acrylamid-Lösung, 75 mM TRIS, pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.03 % AMPS, 2 % TEMED). Die Gelkammer wurde mit einem Laufpuffer (25 mM TRIS (pH 8.3), 192 mM Glycin und 0.1 % SDS) aufgefüllt.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen denaturiert. Dafür wurden sie in einem farbigen Denaturierungspuffer (62.5 mM TRIS-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 0.1 M DTT, 10 % Glycerol, 0.1 % Bromphenolblau, in H₂O) 5 min aufgeköcht. Nach Abkühlung konnten die Proben aufgetragen werden.

Nach der Auftrennung wurden die Proteine in einer Blotting-Kammer (BIORAD TRANS-BLOT[®]SD) nach Herstellerprotokoll auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-CT[™] extra, Amersham Life Science) übertragen.

Durch kurzes Einfärben (1 min) der Proteine auf der Membran in einer Ponceau-S-Lösung (0.2 % Ponceau S, 3 % TCA, in H₂O) konnte die Qualität des Transfers überprüft werden. Außerdem wurden die Proteine an die Membran gebunden.

Um zu prüfen, ob der Proteintransfer vollständig erfolgt ist, wurde das Gel bzw. die im Gel zurückgebliebenen Proteine mit Coomassie-Blau mehrere Stunden angefärbt (Coomassie Brilliant Blue 0.035 %, Methanol 40 %, Eisessig 10 %).

2.12 UCP1 und UCP3 Antikörperdetektion

Vor der Inkubation der Blots mit dem ersten Antikörper wurden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt. Die Blots wurden dafür über Nacht bei 5°C oder für 2 h bei Raumtemperatur in einer Blocking-Lösung geschwenkt. (Slim-Fast[®] oder Sojamehl 5 % (w/v), 0.1 % Tween 20 in PBS (pH 7.4)).

Die Detektion von UCP1 erfolgte mit einem anti-Hamsterserum aus dem Kaninchen, dieses wurde in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt (in PBS, pH 7.4, 0.05 % Tween). UCP3 wurde mit einem im Kaninchen gegen Maus-UCP3 generierten, polyklonalen Antikörper (zur Verfügung gestellt von Lawrence Sliker, ELY LILLY) detektiert. Der Antikörper wurde 1:3000 verdünnt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 1-2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

Danach wurden die Blots viermal 5 min in Waschpuffer gewaschen (PBS, pH 7.4, 0.05 % Tween 20, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS).

Für die Immunodetektion wurde ein Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRPO konjugierter zweiter Antikörper (1:10000) eingesetzt (DAKO). Die Blots wurden damit für 1-2 h auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Blots wiederum viermal 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend die Antikörperdetektion durchgeführt.

2.12.1 Chemoluminiszenz

Die UCP1 und UCP3 Proteindetektion erfolgte mittels Chemoluminiszenz. Der Blot wurde 5 min in einer Peroxid/ Luminol-Lösung (Supersignal[®] Substrate, Pierce) geschwenkt. Zur Detektion der Lichtsignale wurden die Blots auf einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert.

Die Intensität des abgegebenen Lichts ist proportional zur Menge des gebundenen zweiten Antikörpers und damit auch zur vorhandenen Proteinmenge.

2.13 Versuchstiere

2.13.1 Haltung und Zucht

Die Dsungarischen Zwerghamster der Art *Phodopus sungorus* (Pallas 1770) stammten aus der institutseigenen Zucht des Fachbereiches Biologie der Philipps-Universität in Marburg.

Die Haltung der Hamster erfolgte in Makrolon-Käfigen (22x17x15 cm) bei 23°C ± 1°C, mit Futter (Hamster-Zuchtdiät, Altromin 7014) und Wasser *ad libitum*. Die eingesetzten Versuchstiere wurden in einer Licht-Dunkelphase von 16:8 h gehalten.

Die Jungtiere aus der Zucht wurden 21 Tage nach der Geburt von den Eltern entwöhnt, lebten noch weitere 7 Tage als Wurf zusammen und wurden schließlich vereinzelt.

2.13.2 Mutanten

Bei einer Northern-Blot Analyse der UCP3 mRNA-Expression im BAT von Dsungarischen Zwerghamstern, konnte bei allen Geschwistertieren eines Wurfes keine UCP3 mRNA im braunen Fettgewebe nachgewiesen werden. Die UCP3 Expression im Skelettmuskel war nicht verändert. Weitere Nachkommen der Eltern dieses Wurfes wurden daraufhin zu neuen Zuchtpaaren zusammengesetzt. Neue Northern-Blot Analysen zeigten, dass alle Nachkommen von diesen Zuchtpaaren ein UCP3 Defizit im braunen Fettgewebe aufwiesen. Das Fehlen der UCP3-Expression im BAT konnte demnach auf eine vererbte Mutation zurückgeführt werden. Ausgehend von dem ersten Mutanten-Zuchtpaar wurde eine neue Hamsterlinie etabliert.

Auch in der Wildtypzucht treten allerdings immer wieder Hamster mit fehlender UCP3 Expression auf.

Die Bezeichnung „Mutante“ für die Hamster aus den Experimenten dieser Arbeit bezieht sich auf den Phänotyp, also das Fehlen der UCP3 mRNA im BAT.

2.14 In vitro Messungen des Fettsäurestoffwechsels

2.14.1 Versuchsgruppen

Die in den Experimenten eingesetzten Mutanten stammen alle aus der Mutanten-Inzuchtlinie. Die Messung der β -Oxidation in braunem Fett und Skelettmuskel wurde an Geweben von kaltakklimatisierten oder gefasteten Wildtyphamster und Mutanten, sowie von Kontrolltieren durchgeführt. Zur Kaltakklimatisierung wurden die Hamster für sieben Tage in einer Klimakammer bei 5°C, mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Den Versuchsgruppen der gefasteten Tiere wurde 48 h vor Versuchsbeginn das Futter entzogen, Wasser stand den Tieren weiterhin *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung der Kontrolltiere erfolgte bei 23°C mit Futter und Wasser *ad libitum*.

Für die Versuche wurden adulte weibliche und männliche Hamster eingesetzt. Das Alter der Tiere lag durchschnittlich zwischen 57 und 78 Wochen. Es wurden insgesamt 37 Wildtypen und 38 Mutanten untersucht.

2.14.2 Tötung der Tiere und Gewebepräparation

Zur Gewebeentnahme wurden die Hamster mit CO₂ betäubt und anschließend mit einem Schnitt durch die *Vena cava posterior* getötet.

Für die Messung der β -Oxidation wurde das *dorsal cervicale* BAT-Depot vollständig herauspräpariert. Als Muskelprobe wurde der *Tibialis anterior* von beiden Hinterextremitäten präpariert.

Für die Isolation von Mitochondrien wurde das *suprasternale, axiale, dorsal cervicale* und das *interscapulare* BAT-Depot verwendet.

Für die Expressionsstudien, sowie zur Phäno- und Genotypisierung wurden Proben vom *suprasternalen* BAT-Depot, ein Teil der Milz, sowie der *Biceps femoris* der Hinterextremitäten herauspräpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung dieser Proben erfolgte bei -80°C.

2.14.3 Messung der β -Oxidation und Fettsäureaufnahme in isolierten Geweben

Die β -Oxidationsrate von Gewebeproben wurde durch Messung der CO₂-Produktion bestimmt. Zudem wurde die Fettsäureaufnahme des Gewebes quantifiziert. Zur Bestimmung dieser beiden Parameter wurde den Gewebeproben ein Überschuss an Oleat, mit einem Anteil von 2 % radioaktiv markiertem [¹⁴C-1]-Oleat angeboten. Die beim Abbau von Fettsäuren in der β -Oxidation synthetisierten Acetyl-CoAs, werden im mitochondrialen Citrat-Zyklus unter Freisetzung von CO₂ abgebaut. Die Menge an freigesetzten, radioaktiven CO₂ wurde ermittelt und ermöglichte einen Rückschluss auf die, über den β -Oxidationsweg abgebauten Oleatmenge. Da nur das C₁-Atom der Oleatmoleküle radioaktiv markiert war, konnte allerdings keine Aussage über den vollständigen Abbau der Oleatmoleküle getroffen werden. Wie viel Oleat insgesamt von den Gewebeproben aufgenommen wurde, konnte durch die Bestimmung der Menge an Radioaktivität in den Proben ermittelt werden.

Die Messungen der CO₂-Produktion und der Fettsäurekonzentration im Gewebe wurde nach modifizierten Protokollen von A. Coleman und J. Fruebis (Fruebis et al., 2001; Muoio et al., 1999) durchgeführt.

Für die Inkubation der Gewebe wurde ein Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (*KRB, Krebs-Henseleit Puffer*) verwendet (118.6 mM NaCl, 4.76 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM

MgSO₄, 2.54 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4). Der Puffer wurde bei 30°C mit Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂) äquilibriert.

Nach Tötung der Tiere wurde das *dorsal cervicale* BAT-Depot rasch heraus präpariert und in vier Teile geschnitten. Zudem wurde von jeder der beiden Hinterextremitäten der *Tibialis anterior* herauspräpariert. Die Gewebestückchen wurden gewogen und jeweils in 1 ml KRB in eine 12er Multiwellplatte überführt. Bis zur Präparation der letzten Probe, wurden die Gewebe bei 30°C, in einer Atmosphäre von 95 % O₂ und 5 % CO₂ geschwenkt. Nach Beendigung der Präparation wurden die Gewebe weitere 15 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Gewebeproben in 1 ml KRB mit 1 mM Na-Oleat (Sigma) und 1 % BSA überführt und 20 min bei 37°C geschwenkt. Das Na-Oleat wurde zuvor mit BSA komplexiert (15 min 37°C), dann wurde der KRB zugegeben. Zudem wurde dem Oxidationsmedium 1 mM L-Carnitin hinzugefügt, da der Import von Fettsäuren in die Mitochondrien als Acyl-Carnitin erfolgt.

Nach 20 min Inkubation wurden die Gewebeproben in frisches Oxidationsmedium mit zusätzlich 1 µCi/ ml (20 nmol) [¹⁴C]-Oleat (SA 50 mCi/ mmol, ICN) überführt.

Vor der Komplexierung mit BSA wurde das in Ethanol gelöste [¹⁴C]-Oleat zunächst unter N₂-Begasung getrocknet und anschließend mit 1 mM Na-Oleat und BSA (1 %) wie oben beschrieben komplexiert. Nach dem Transfer der Gewebe in das [¹⁴C]-Oleat-Oxidationsmedium wurde die Multiwellschale mit Parafilm abgedichtet und die Platte für 90 min bei 37°C geschwenkt.

2.14.4 Bestimmung der freigesetzten CO₂-Mengen

Das von den Geweben freigesetzte CO₂ lag im Oxidationsmedium als CO₃²⁻-Anion gelöst vor. Zur Quantifizierung des gelösten radioaktiven CO₂, wurde das es durch Ansäuern des Mediums zunächst freigesetzt und anschließend wieder (alkalisch) aufgefangen.

Das Herauslösen und wieder auffangen des CO₂ erfolgte in einer modifizierten 48er-Multiwellplatte (TPP) (Abb. 5). Zwischen zwei benachbarte Wells wurde jeweils ein kleines Verbindungsloch (~1,5 mm Ø) gebohrt. Zudem wurde in den Deckel über einem der beiden Nachbarwells ein kleines Loch gebohrt. In das Well ohne Loch im Deckel wurden 200 µl 1 N NaOH gegeben, in das andere je 500 µl des Oxidationsmediums eines Gewebestückchens. Für

die Hintergrundkorrektur wurden zudem 500 μl vom Oxidationsmedium als Blindwert gleichbehandelt.

Die Wells wurden mit Parafilm abgedichtet, eine Schaumstoffplatte darüber platziert und anschließend der Plastikdeckel aufgelegt. Der Deckel wurde zusätzlich mit Klebeband fixiert und abgedichtet.

Durch die Bohrungen im Deckel wurden dann je 50 μl 70 % ige Perchlorsäure injiziert. Durch die Säure wurde das im Medium gelöste Carbonat unter Bildung von CO_2 freigesetzt. Dieses gelangte durch das Verbindungsloch in das Well mit der Natronlauge und wurde als NaCO_3 ($2\text{Na}^+ + \text{CO}_3^{2-}$) gefällt.

Die Multiwellplatte wurde 90 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot von 150 μl NaOH in 5 ml Szintillationslösung (ROTH, Rotiszint Eco⁺), in ein 20 ml Szintillationsgefäß geben.

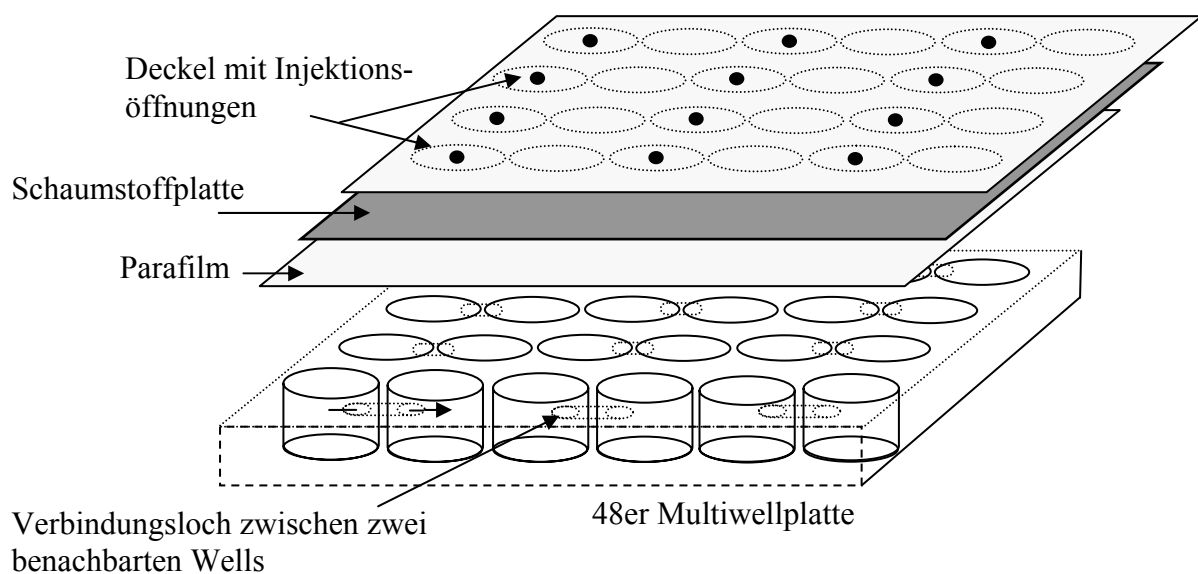


Abb. 5: Modifizierte 48er Multiwellplatte zur Messung der β -Oxidation in isolierten Gewebeprobe. Zwischen zwei benachbarten Wells befindet sich eine Verbindungsöffnung für den Gasaustausch. Die Wells werden durch eine Lage Parafilm, eine Schaumstoffplatte und den Plastikdeckel dicht verschlossen. Für die Injektion von Perchlorsäure, zur Freisetzung von CO_2 aus dem Medium, befinden sich kleine Löcher in der Plastikabdeckung, über jeweils einem der verbundenen Wells.

2.14.5 Bestimmung der aufgenommenen Oleatmengen

Zur Bestimmung der aufgenommenen Menge an radioaktivem Oleat in den einzelnen Gewebeproben wurden die Gewebestücke lysiert. Vor der Lyse wurden die Gewebe zweimal mit gekühltem PBS gewaschen, anschließend mit 400 µl 2 M KOH in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben und in einem Wärmeschrank auf 70°C erhitzt (~15 min). Anschließend wurden 400 µl 100 % Ethanol zugegeben, kurz geschüttelt und die Gewebe für 60 min bei 70°C lysiert. Jeweils 200 µl des Gewebelysats wurde in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Menge an Radioaktivität darin bestimmt.

Um den Anteil der vollständig verstoffwechselten bzw. der intrazellulären Menge von [¹⁴C]-Oleat bestimmen zu können, wurde auch die Radioaktivität im Ausgangsmedium bestimmt.

Die Messung der Radioaktivität in den NaOH-Proben und dem Gewebelysat wurde in einem β-Counter (Beckman Coulter) durchgeführt. Das automatische Zählprogramm führt vor den Messungen der Proben eine Kalibrierung mit ¹⁴C und ³H-Standards durch. Anschließend werden die radioaktiven Zerfälle (*CPM, counts per minute*) in den Proben gemessen. Die Messdauer pro Probe wurde auf drei Minuten eingestellt.

2.14.6 Berechnung der oxidierten und aufgenommenen Oleatmengen

Von den 200 µl NaOH mit darin gelöstem CO₂ wurde die Radioaktivität in einem Aliquot von 150 µl und von den 800 µl Gewebelysat in einem Aliquot von 200 µl bestimmt. Von den gemessenen CPM wurde zunächst der ermittelte Blindwert als Hintergrund abgezogen. Anschließend wurde die Radioaktivität in den NaOH-Probe und dem Gewebelysat berechnet. Es wurde angenommen, dass von der jeweils eingesetzten Menge an markierten bzw. nicht radioaktiv markierten Oleat der gleiche prozentuale Anteil von den Gewebeproben aufgenommen und die gleiche CO₂-Menge freigesetzt wurde. Anhand der Menge an umgesetzten radioaktiven Oleat konnte also berechnet werden, wie viel von 1 µmol des eingesetzten Oleats von den Gewebeproben aufgenommen und zu CO₂ oxidiert wurde.

Von jedem Tier wurde die Oxidationsrate und Oleataufnahme von jeweils vier BAT bzw. von zwei Muskel-Proben mit teilweise unterschiedlichem Gewicht gemessen. Es wurde damit

geprüft, ob ein Zusammenhang von Gewebemenge und der Oxidationsrate bzw. Oleataufnahme besteht.

Bei den BAT-Proben konnte, mit Ausnahme von der Oleataufnahme der Mutanten Kontrollgruppe, ein solcher Zusammenhang bestätigt werden. Allerdings ergab die Berechnung der aufgenommenen Oleatmenge bzw. der CO₂-Rate von jedem Gewebestück pro Gramm, eine negative Korrelation ($r_s < 1$). Dies bedeutet letztlich, dass kleine Gewebeproben pro Gramm mehr Oleat aufnehmen als große. Um für jedes Tier eine mittlere Oleataufnahme bzw. CO₂-Rate des BAT pro Gramm unter Berücksichtigung des Größeneffekts berechnen und vergleichen zu können, wurde für jede Behandlungsgruppe von jedem Phänotyp eine Regression über die Einzelmesswerte berechnet. Von jedem Tier wurde das mittlere Gewicht der vier BAT-Proben ermittelt. Mit der Regressionsgleichung wurde dann für jedes Tier zum einen die erwartete Oleataufnahme bzw. CO₂-Rate der Einzelproben berechnet und zum anderen die erwartete Rate des mittleren BAT-Gewichts. Die Differenz aus erwarteter und tatsächlicher Oleataufnahme bzw. CO₂-Rate der Einzelmessungen wurde als Korrekturwert für die Oleataufnahme bzw. CO₂-Rate des mittleren Probengewichts eingesetzt. Dafür wurde vom mittleren Probengewicht jeweils der Korrekturwert der Einzelmessungen subtrahiert und man erhielt damit vier Werte für das mittlere Probengewicht, die letztlich das Maß der Streuung der Messergebnisse von einem Tier repräsentieren. Aus den vier korrigierten Werten für das mittlere Probengewicht wurde der Mittelwert berechnet. Da zwischen der berechneten mittleren Oleataufnahme bzw. CO₂-Raten innerhalb der Behandlungsgruppen beider Phänotypen kein linearer Zusammenhang festgestellt werden konnte ($p \geq 0.05$), wurde die durchschnittliche Oleataufnahme bzw. CO₂-Rate pro Gramm BAT der Gruppe aus den berechneten Raten des mittleren Probengewichts ermittelt.

Da pro Tier nur zwei Muskelproben analysiert wurden, die Variabilität der Muskelgewichte gering war und nur bei der Oleataufnahme der Mutanten ein Zusammenhang zwischen Oleataufnahme und Probengewicht festgestellt werden konnte, wurde die Oleataufnahme und die CO₂-Rate pro Gramm direkt aus den Raten der Einzelmessungen berechnet.

2.14.7 Mitochondrienisolation aus braunem Fettgewebe

Die Mitochondrienisolation erfolgte nach dem Prinzip der differentiellen Zentrifugation nach Nedergaard und Cannon (Nedergaard and Cannon, 1979). Alle Isolationschritte wurden auf Eis bzw. mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt.

Das *suprasternale*, *axiale*, *dorsal cervicale* und das *interscapulare* BAT wurde herauspräpariert und sofort in Isolationsmedium (250 mM Sucrose; 10 mM TES; 1 mM EDTA; 64 μ M Rinderserumalbumin (BSA); pH 7.2) überführt. Das Gewebe wurde mit einer Schere zerkleinert und anschließend in einem 30 ml Glas-Teflon-Homogenisator mit langsam rotierenden Potter sehr vorsichtig, durch fünfmaliges auf und abwärts bewegen homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine Nylon-Gaze direkt in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegossen und so von größeren Geweberesten befreit. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit einem Festwinkelrotor (JA-20, Beckmann). Beim ersten Zentrifugationsschritt (12096 g/ 10000 rpm, 10 min, 5°C) wurden die Mitochondrien und andere größere Zellbestandteile pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Röhrchen mit Zellstoff von Fettresten gesäubert. Das Pellet wurde anschließend in einem anderen Isolationsmedium (250 mM Sucrose; 10 mM TES; 1 mM EGTA, 64 μ M BSA; pH 7.2) mit einer gebogenen, an der Spitze geschlossenen Pasteurpipette resuspendiert, dann das Röhrchen mit Puffer aufgefüllt und bei 756 g/2500 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugengefäß überführt und bei 8740 g/ 8500 rpm für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde dann, je nach Größe, in 30-50 μ l BSA freien Puffer (100 mM KCl; 20 mM TES; 1 mM EGTA; pH 7.2) vorsichtig resuspendiert.

2.14.8 Fettsäureveratmung von isolierten Mitochondrien

Der Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien wurde mit einer Clark-Elektrode (vergl. 2.7) bei 37°C in einem mit Sauerstoff äquilibrierten Puffer (nach (Moreno et al., 2003) gemessen (80 mM KCl; 50 mM HEPES (pH 7); 1 mM EGTA; 5 mM K₂HPO₄; 1 % BSA; pH 7).

Es wurde eine BSA-Konzentration von 1 % (w/ v) im Medium eingesetzt, um freie Fettsäuren zu binden, welche zum einen die maximale Oxidationsrate von Glycerol-3-Phosphat durch Hemmung der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase beschränken würden. Zudem aktivieren freie Fettsäuren UCP1, was zu einer Entkopplung der Mitochondrien führen würde (Cannon and Lindberg, 1979).

Als Substrat wurde den Mitochondrien neben Fettsäuren auch *sn*-Glycerol-3-Phosphat in einer Konzentration von 20 mM angeboten. Die Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase ist an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Sie besitzt im BAT eine vergleichsweise hohe Aktivität (Cannon and Lindberg, 1979). Die Fettsäureoxidationsrate wurde anhand des O₂-Verbrauchs nach Zugabe von Palmitoyl-Carnitin (20, 40 und 60 μM) ermittelt. Das an Carnitin gebundene Palmitat konnte direkt über den Acylcarnitin-Transporter in die Mitochondrienmatrix gelangen.

Um eine mögliche Aktivierung von UCP1 durch Palmitoyl-Carnitin zu prüfen, wurden Messungen in Anwesenheit von Rotenon (2 μg/ml) durchgeführt, einem pflanzlichen Wirkstoff der den Komplex I der Atmungskette irreversibel inhibiert.

Frisch präparierte Mitochondrien des BAT befinden sich generell in einem entkoppelten Zustand (Cannon and Lindberg, 1979). Zur Bestimmung der an die ATP-Synthese gekoppelten Atmung, wurde daher das UCP 1 durch Zugabe von 3 mM GDP gehemmt.

UCP1 wird durch langkettige Fettsäuren aktiviert. Um eine mögliche entkoppelnde Wirkung durch Palmitoyl-Carnitin mit der durch Palmitat induzierten Entkopplung zu vergleichen, wurden den Mitochondrien gleiche Mengen (40 μM) Palmitoyl-Carnitin und Palmitat angeboten.

Die maximale Entkopplung der Mitochondrien wurde durch den künstlichen Entkoppler FCCP (2 μM) erreicht.

2.15 Analyse der mRNA-Expression

2.15.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi isoliert (Chomczynski and Sacchi, 1987). Tiefgefrorene BAT und Skelettmuskelproben wurden in 1 ml Trizol[®] (Invitrogen) gegeben und 1 min mit einem Ultra-Turax (Janke und Kunkel GmbH) homogenisiert. Trizol[®] enthält Guanidinisothiocyanat zum Denaturieren von Proteinen und DNA, sowie Phenol (pH 4-5) zur Abtrennung der DNA.

Das Gewebehomogenat wurde nach 5 min Inkubation (RT) zentrifugiert (2500 g, 5 min, 4°C), um Zellreste und Fett abzutrennen. Die RNA wurde anschließend in 200 µl Chloroform gelöst und konnte nach Zentrifugation (15 min, 12000 g) als Überstandsfraktion abgenommen werden. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von (100 %) Isopropanol (500 µl) während einer Inkubation von 20 min (RT). Anschließend wurde die RNA pelletiert (15 min, 12000 g, 4°C). Die RNA aus dem braunen Fettgewebe wurde einem zusätzlichen Reinigungsschritt unterzogen. Das Pellet wurde dafür in 500 µl einer SOLD-7.2 % Mercaptoethanol-Lösung gelöst und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol, bei -20°C erneut gefällt.

Die gefällte RNA wurde wiederum pelletiert (15 min, 12000 g) und in 1 ml Ethanol (75 %) 10 min gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (10 min, 10000 g), wurde die RNA luftgetrocknet und in (0.1 % v/v) DEPC behandeltem Wasser resuspendiert (20 min, 68°C). Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die RNA wurde photometrisch bei 260 nm quantifiziert (Ultrospec[®] 2100 pro, Amersham pharmacia).

2.15.2 Gelelektrophorese und Northern-Blots

Die (Größen-) Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen (20 mM 3-Morpholino-1-Propansulfonsäure; 5 mM Natriumacetat; 1 mM Na₂EDTA (MOPS-Puffer); 5 % Formaldehyd (v/v)).

Von den RNA-Proben wurden je 12-20 µg für die Gelelektrophorese in einem Puffer (60 % Formamid (v/v), 20 % Formaldehyd (v/v), in MOPS-Puffer) mit 50 ng Ethidiumbromid für 15 min bei 68°C denaturiert. Die Qualität und die Menge der aufgetragenen RNA konnten

durch das interkalierte Ethidiumbromid nach der Auftrennung im Gel, unter UV-Licht kontrolliert werden.

Die RNA aus dem Gel wurde nach der *Downward*-Methode (Chomczynski, 1992) über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) geblotted. Nach Trocknung wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker, Stratagene) an die Membran fixiert.

2.15.3 cDNA-Sondenherstellung

Die Detektion der mRNA auf dem Northern Blot erfolgte mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden. Alle eingesetzten cDNA-Fragmente zur Sondenherstellung wurden mittels PCR generiert, standen aber bereits gebrauchsfertig zur Verfügung.

Die Sondenherstellung erfolgte nach dem Prinzip des Random-Primings mit dem *rediprimeTMII Kit* von Amersham pharmacia nach Herstelleranleitung. Als radioaktives Nucleotid wurde dCTP [α -³²P] (ICN) eingesetzt. Die fertige Sonde wurde zur Aufreinigung über ein Molekularsieb (NucTrap Probe Purification Columns, Stratagene) gegeben.

Es wurden die im folgenden aufgeführten cDNA-Sonden hergestellt.

Tab. 2: cDNA-Sonden

cDNA	Spender	Größe
UCP1	<i>Phodopus sungorus</i>	603 pb
UCP3	<i>Phodopus sungorus</i>	584 bp
CTE-I* (MTE-I)	<i>Mus musculus</i>	1.4 kb
CPT-I	<i>Mus musculus</i>	~2 kb
SOD2	<i>Mus musculus</i>	690 bp
18S	<i>Mus musculus</i>	281 bp

* Mit der CTE-I cDNA-Sonde wird sowohl die cytosolische, als auch die mitochondriale Form der Thioesterase detektiert. Unterschieden wurden beide mRNAs aufgrund ihrer Größe, die mRNA der mitochondriale Thioesterase ist größer als die cytosolische.

2.15.4 Hybridisierung

Die Northern-Blots wurden zunächst mindestens eine Stunde in der Hybridisierungslösung (250 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA; 7 % SDS; 1 % BSA, pH 7.4) bei 63-64°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit den radioaktiven cDNA-Sonden erfolgte bei gleicher Temperatur für mindestens 18 Stunden. Die cDNA-Sonden wurden vorab durch Erhitzen auf 100°C (5 min) denaturiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Blots durch Waschen von unspezifisch gebundener Sonde befreit. Gewaschen wurde in vier Waschschritten in SSC/SDS-Lösungen mit zunehmender Stringenz. (2x SSC, 1x SSC, 0.5x SSC, 0.1x SSC mit jeweils 0.1 % SDS). Die ersten drei Waschschrritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, der letzte bei 55-60°C. Die Dauer wurde abhängig von der Sondenstärke zwischen 5 min und 20 min variiert.

2.15.5 Phosphor-Screen und Array Vision Analyse

Für die quantitative Analyse der RNA-Expression wurden die mit radioaktiven cDNA-Sonden hybridisierten Northern-Blots auf einen Phosphor-Screen (Molecular Dynamics) für 1-24 h aufgelegt. Die radioaktive Strahlung der markierten RNA auf dem Blot regt Moleküle auf der Oberfläche des Screens an und bewirkt eine Schwarzfärbung. Bei zunehmender Signalstärke wird die Schwärzung intensiviert. Mit einem Laserscanner (Storm 860) und einer zugehörigen Computersoftware (Storm Imaging System, Molecular Dynamics) konnten die Signale auf dem Phosphorscreen erfasst werden. Die Signalstärken konnten anschließend mit einer speziellen Analyse-Software (Array Vision 7.0) quantitativ ausgewertet werden.

2.15.6 18S-Korrektur

Für die quantitative Analyse der mRNA-Expression wurden die Northern-Blots nach der Hybridisierung mit den verschiedenen Sonden (UCP3, MTE-I, UCP1, CPT-I) mit einem 281 bp Fragment der 18S-RNA aus der Maus hybridisiert. Das Signal der 18S-RNA wurde als quantitativer Marker für die gesamte RNA-Menge der einzelnen Proben auf den Blots verwendet. Die Korrektur der ermittelten (Array Vision) Intensitäten der einzelnen mRNA-Banden auf den Blots erfolgte durch Division der Signalstärke durch die Intensität des korrespondierenden 18S-Signals.

2.15.7 Vergleich der mRNA-Expressionslevel auf unterschiedlichen Blots

Um die mRNA-Mengen von verschiedenen Blots vergleichen zu können, wurde die 18S-korrigierten Intensität der mRNA-Signale der einzelnen Banden auf den Blots, jeweils auf die mittlere Intensität der mRNA-Signale von Kontrollhamstern bezogen. Alle Intensitätswerte wurden durch diesen Mittelwert dividiert. Der Wildtyp-Mittelwert wurde als Faktor *Eins* festgelegt und die Expressionswerte der einzelnen Tiere als *x*-fache Änderung gegenüber dem mittleren Kontrollwert dargestellt.

2.16 Genotypisierung

Die Mutanten konnten bislang nur nach Analyse der UCP3 mRNA mittels Northern-Blots phänotypisiert werden. In diesem Jahr wurde in Zusammenarbeit mit dem IMB (Institute of Molecular Biology) in Jena begonnenen die UCP3 Gensequenzen von Wildtypen und Mutanten zu analysieren. Es wurden bislang 7167 bp im 5'-Bereich des Gens (Exon 1 und 2, sowie Intron 1) sequenziert. Im ersten Intron des UCP3 Gens wurden zwei Einzelnucleotid-Polymorphismen (*single-nucleotide polymorphism, SNP*) gefunden, die nach ersten Befunden offensichtlich im Zusammenhang mit dem Phänotyp stehen (Fromme, 2003). Die verschiedenen Genotypen können anhand eines Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) differenziert werden. Um den Zusammenhang von Geno- und Phänotyp zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit weitere Hamster phäno- und genotypisiert.

2.16.1 Extraktion von genomischer DNA

Die genomische DNA wurde aus Skelettmuskel- (*Biceps femoris*) oder Milzproben isoliert. Die Gewebe wurden in einer Pufferlösung (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM EDTA pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 % SDS) mit 0.5 mg/ml Proteinase K bei 55°C über Nacht auf einem Schüttler verdaut. Die DNA-Extraktion erfolgte durch Zugabe von je 0.35 ml Phenol (pH 7.5-8.0, Roti® Phenol) und Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Die Proben wurden nach mehrfachen Invertieren, 30 min leicht geschüttelt und anschließend 10 min bei 15000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 100 % Ethanol (1 ml) 5 min bei Raumtemperatur gefällt und dann pelletiert (10 min, 15000 rpm). Das DNA-Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen und nach nochmaliger

Zentrifugation getrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei - 20°C.

2.16.2 PCR-Amplifikation

Für die Genotypisierung wurde ein 3.161 kb großes Fragment des ersten Introns mittels PCR aus genomischer DNA von Wildtypen und Mutanten herausamplifiziert (Tab. 3) (Denaturierung bei 94°C für 30 sec; Annealing Temperatur: 58.5°C für 30 sec; 72°C für 2 min; 39 Zyklen).

Tab. 3: Oligo-Primer zur PCR-Amplifikation eines 3.161 bp Fragments vom Intron 1 des UCP3-Gens vom Hamster

	Primersequenzen
Forward Primer	5' - TGTCCTGATGGCTCCTCTCTA
Reverse Primer	5' - CCCAGGAACTTCACAACCTG

2.16.3 Restriktionsverdau zur Genotypisierung

Die verschiedenen Allele des UCP3-Gens von Wildtypen und Mutanten konnten anhand eines RFLP nach einem Restriktionsverdau mit AarI (MBI Fermentas) und EcoR57I (MBI Fermentas) identifiziert werden (Abb. 4). Die Restriktionsverdau wurden nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt.

Das SNP1 des Wildtypallels (G) bietet keine Schnittstelle für AarI (5'-CACCTGC-3'). Das nicht geschnittene Fragment besaß eine Größe von 2,971 kb. Durch einen Basenaustausch von $G \rightarrow A$ im Mutantenallel entstand eine Erkennungssequenz für AarI. Das SNP1 der homozygoten Mutanten (A/A) wurde mit AarI in zwei Fragmente von 1.127 kb und 1.844 kb Größe geschnitten. Beim heterozygoten Wildtyp (A/G) traten alle drei Fragmentgrößen (2,971 kb, 1.127 kb und 1.844 kb) auf. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte gelelektrophoretisch in einem 1 % Agarosegel (Abb. 4 A).

Das SNP2 der Wildtypen (A) trägt eine Schnittstelle für Eco57I (5'-CTGAAG-3'), die beim Mutantenallel (G) durch einen Basenaustausch von A → G nicht mehr vorhanden ist. Nach dem Verdau mit Eco57I konnte bei den homozygoten Wildtypen (A/A) ein 371 bp großes Fragment festgestellt werden. Das ungeschnittene Fragment der Mutanten (G/G) war 412 bp lang. Heterozygote Tiere (A/G) wiesen eine Mischung beider Fragmentgrößen auf.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der mit Eco57I verdauten Produkte wurde ein 2.5 % iges Agarosegel verwendet (Abb. 4 B).

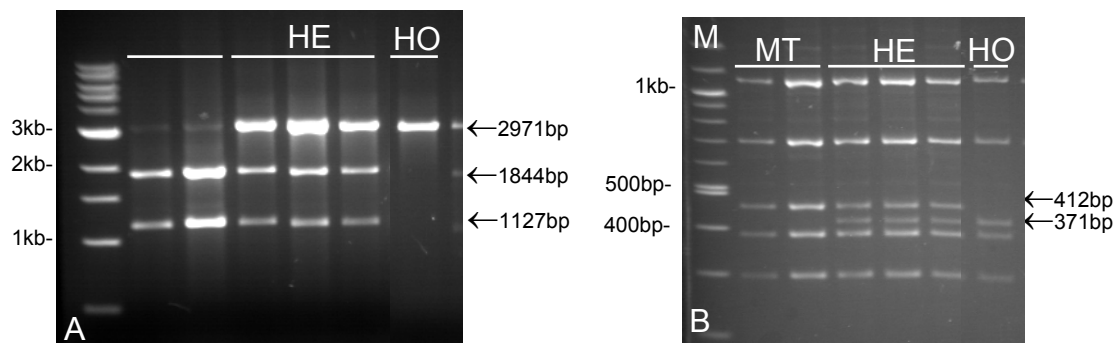


Abb. 4: Genotypanalyse von Wildtyphamstern und Mutanten mit fehlender UCP3 Expression im BAT. Ein 3161 bp großes PCR-Produkt des ersten Introns des UCP3-Gens trägt zwei SNPs (SNP1 und SNP2). Die Differenzierung der Genotypen ist anhand von Größenunterschieden von cDNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau mit AarI oder Eco57I möglich. A) und B) zeigen die Gelbilder nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente nach dem Restriktionsverdau.

A) SNP1: der Verdau mit AarI ergibt für Mutanten (A/A) zwei Fragmente von 1127 bp und 1844 pb. Homozygote Wildtypen (G/G) besitzen ein Fragment mit 2971 bp, heterozygote (A/G) zeigen alle drei Fragmentgrößen. B) SNP2: nach dem Verdau mit Eco57I wird das homozygote Mutantenallel (G/G) durch ein 412 bp großes Fragment erkennbar; das Wildtypallel (A/A) besitzt eine Größe von 371 bp; Heterozygote zeigen beide Fragmentgrößen. M= DNA-Größenmarker; MT= Mutanten, HO= homozygote Wildtypen und HE= heterozygote Wildtypen;

Von allen vierzig in dieser Arbeit genotypisierten Hamster, wurde SNP2 durch einen Restriktionsverdau mit Eco57I analysiert. Von zwanzig der vierzig Tiere wurde zusätzlich die Sequenz des SNP1 durch einen Restriktionsverdau mit AarI untersucht.

2.17 Statistik

Bei Mittelwertangaben wurde der Standardfehler (SEM=*standard error of the mean*) als Maß für die Streuung angegeben. Alle Daten wurden vor der Auswertung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Abweichungen von Normalverteilung getestet.

Die Abhängigkeit der Messwerte (mRNA-Expressionsraten, CO₂-Produktion, Oleataufnahme in Gewebeproben) von Kofaktoren wie Behandlung (Kälte, Fasten) und dem Phänotyp, wurde mittels einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) getestet. Für die ANOVA-Analyse wurde die Gleichheit der Fehlervarianzen auf signifikante Abweichungen geprüft. Dafür wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse über den Betrag der Abweichungen vom Gruppenmittelwert gerechnet (Levene-Test). Bei signifikanten Abweichungen von der Varianzhomogenität wurden die Daten für die ANOVA logarithmisch transformiert.

Bei den Sauerstoffverbrauchsmessungen von transfizierten HEK293-Zellen und BAT-Mitochondrien von Wildtypenhamstern und Mutanten wurden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mittels Student *t*-Test auf Signifikanz geprüft.

Bei den Messungen der Fettsäureoxidation in Gewebeproben wurde die Stärke des Zusammenhanges von Probengewicht und der CO₂-Freisetzung bzw. der Oleataufnahme mittels Spearman-Rangkorrelation (r_s) auf Signifikanz geprüft.

Als Signifikanzniveau wurde für alle Testverfahren $p < 0.05$ festgelegt.

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm SPSS 11.5 und mit Excel 2000.

3 ERGEBNISSE

3.1 O_2 -Verbrauch von *mUCP1*, *mUCP2*, *mUCP3*, *dmeUCPx* und *mSOUP* transfizierten HEK293-Zellen

3.1.1 *UCP1*: Einfluss der DNA-Inkubationszeit auf den *UCP1* Proteingehalt

Nach der Transfektion von HEK293-Zellen mit Maus-UCP1 wurde getestet, ob das Protein in den Zellen funktionsfähig exprimiert wird und ob eine Variation der Inkubationszeit mit der Plasmid-DNA einen Einfluss auf die Expressionsrate hat. Als Inkubationszeiten wurden 6 h und 16 h gewählt.

Die Western Blot-Analyse von Mitochondrien der UCP1 transfizierten HEK293-Zellen hat bestätigt, dass das Protein in den Zellen exprimiert wird (Abb. 6). In Zellen die nur mit dem leeren pcDNA 3-Vektor transfiziert wurden, erschienen keine Proteinsignale auf den Western-Blots. Der Vergleich der UCP1-Proteinspiegel in den Zellen nach 6 h und 16 h DNA-Inkubation zeigt, dass nach 16 h Inkubationszeit die UCP1-Proteinkonzentration in den Mitochondrien höher ist, als in Zellen die 6 h inkubiert wurden. Demzufolge ändert sich der Proteingehalt abhängig von der DNA-Inkubationszeit bzw. der aufgenommenen DNA-Menge.

Im Folgenden werden Zellen, die 6 h mit DNA inkubiert wurden, als Zellen mit geringem UCP1-Gehalt bezeichnet, die mit 16 h Inkubationszeit als Zellen mit hohem UCP1-Gehalt.

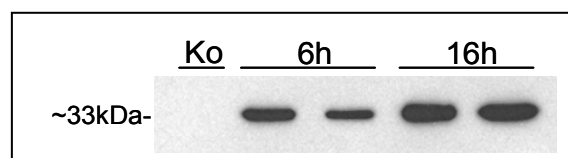


Abb. 6: UCP1 Proteindetektion in transfizierten HEK293 Zellen. Western-Blot Analyse von Mitochondrienprotein aus Kontrollzellen (Ko, n=1) und Zellen die 6 h (n=2) oder 16 h (n=2) mit Plasmid-DNA inkubiert wurden. Aufgetragen wurden jeweils die Mitochondrien (16 μ g) von Zellen einer Kulturschale. Die Zellen wurden 46-48 h nach entfernen der DNA geerntet.

3.1.2 O_2 -Verbrauch von UCP1 transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellen mit hohem und geringem UCP1-Proteingehalt unterscheiden sich morphologisch nicht voneinander bzw. von den Kontrollzellen. Die Vitalität und Entwicklung der Zellen wurde durch UCP1 nicht merklich beeinflusst (subjektive Beobachtung).

Durch Messung der Zellatmung wurde getestet, ob das transient exprimierte UCP1 als funktionsfähiges Protein in die Mitochondrien der HEK293-Zellen inkorporiert wird und eine durch Fettsäuren induzierte Entkopplung möglich ist. Für jede Messung wurden alle Zellen einer 10 cm Kulturschale eingesetzt. Als Substrat stand den Zellen während der Messung 5 mM Glucose zur Verfügung.

Vergleicht man den basalen Sauerstoffverbrauch von Zellen mit geringem bzw. hohem UCP1-Gehalt mit Kontrollzellen, so sind keine signifikanten Unterschiede in der Atmung feststellbar (Abb. 7 A/ B). Der basale Sauerstoffverbrauch der Zellen einer Kulturschale liegt bei durchschnittlich $40 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$.

Wird die ATP-Synthese der Kontrollzellen (6 h Inkubation) durch Oligomycinzugabe inhibiert, werden nur noch $9.6 \pm 0.7 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ Sauerstoff verbraucht (Abb. 7 A). Die Zellen mit einem geringen UCP1-Gehalt verbrauchen in Anwesenheit von Oligomycin noch $13.8 \pm 0.6 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Die Atmungsrate ist damit signifikant höher als bei den Kontrollzellen. Bei den Zellen mit einem hohen UCP1-Gehalt beträgt die Atmungsrate in Anwesenheit von Oligomycin noch $18.5 \pm 1.2 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 7 B). Damit ist sie signifikant höher als die Rate der Kontrollen ($10.8 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$, 16 h Inkubation) und höher als die Rate der Zellen mit wenig UCP1 (Abb. 7 A). Demnach sind bei den Kontrollzellen 75 % und bei den Zellen mit wenig UCP1 70 % des basalen O_2 -Verbrauchs an die ATP-Synthese gekoppelt, während es bei den Zellen mit hohem UCP1-Gehalt nur 48 % sind. Die Mitochondrien mit hoher UCP1-Proteinkonzentration sind demnach nicht vollständig gekoppelt.

In BAT-Mitochondrien von Kleinsäugetern wird die UCP1 vermittelte Entkopplung durch Fettsäuren aktiviert. Auch in den transient UCP1 exprimierenden Zellen kann nach Zugabe von Palmitat eine Entkopplung festgestellt werden. Der O_2 -Verbrauch bei Zellen mit geringem UCP1-Gehalt steigt signifikant von $13.8 \pm 0.6 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ in Anwesenheit von Oligomycin auf $23.7 \pm 1.0 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ nach Palmitatzugabe. Bei den Zellen mit hohem UCP1-Gehalt steigt die Atmungsrate signifikant von $18.5 \pm 1.2 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ auf

$25.0 \pm 1.3 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Bei den Kontrollzellen ist keine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs durch Palmitat feststellbar.

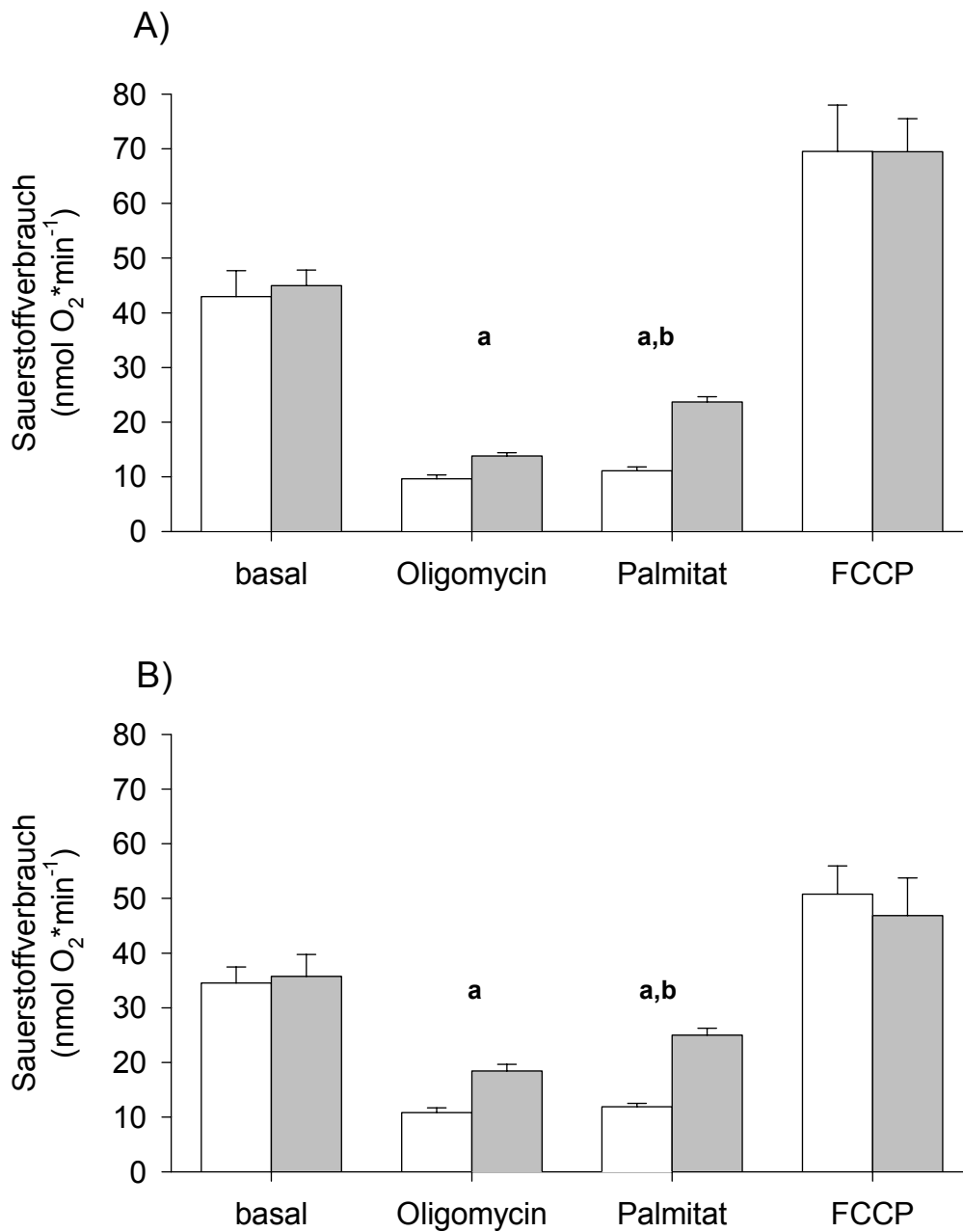


Abb. 7: Sauerstoffverbrauch (\pm SEM) von mUCP1 transfizierten HEK293-Zellen (graue Balken n=6) und Kontrollzellen (Weiße Balken, n=6) nach (A) 6h und (B) 16 h Inkubation mit Plasmid-DNA. Sukzessive Zugabe von Oligomycin, Palmitat und FCCP. n= Anzahl der gemessenen Kulturschalen; a: signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle; b: signifikante Änderung nach Fettsäurezugabe; Student *t*-Test, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

Durch Zugabe von FCCP werden die Mitochondrien maximal entkoppelt und erreichen bei Substratsättigung ihren maximalen Sauerstoffverbrauch. Der maximale Sauerstoffverbrauch beträgt bei den Kontroll- und UCP1 exprimierenden Zellen mit 6 h Inkubation gleichermaßen etwa $69 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Bei der 16 h Inkubationsgruppe wird durchschnittlich eine etwas geringere maximale Atmungsrate erreicht, sie beträgt bei den Kontrollen $50.8 \pm 5.1 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ und $46.8 \pm 6.9 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ bei den UCP1-Zellen. In beiden Inkubationsgruppen unterscheiden sich die maximalen O_2 -Verbrauchsraten von Kontroll- und transfizierten Zellen nicht signifikant voneinander.

3.1.3 Relative Atmungsraten von UCP1 transfizierten Zellen

Um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede in den Atmungsraten durch unterschiedliche Zellzahlen bedingt sind, wurden alle gemessenen Sauerstoffverbrauchswerte jeder Messung auf die maximale FCCP-Atmungsrate bezogen und als relative Atmungsrate dargestellt.

Die basale Atmung beträgt bei Zellen mit geringem UCP1-Gehalt und Kontrollzellen durchschnittlich 63 % des maximalen O_2 -Verbrauchs (Abb. 8). Der relative Sauerstoffverbrauch nach Hemmung der ATP-Synthase durch Oligomycin unterscheidet sich bei den Zellen mit geringem UCP1-Gehalt mit 20.9 % signifikant von den Kontrollen, deren relative Atmungsrate nur 14.7 % beträgt. Durch Palmitatzugabe erfolgt bei den UCP1-Zellen eine Zunahme der Atmungsrate von 20.9 % auf 35.8 %, die mittlere Rate der Kontrollen bleibt unverändert.

Bei den Zellen mit hohem UCP1-Gehalt liegt die relative basale Atmungsrate mit 78 % signifikant über der Rate von 68 % der Kontrollen. Die relative basale Atmung der Zellen mit hohem UCP1-Proteingehalt ist damit auch signifikant höher als die bei den Zellen mit wenig UCP1 (63 %).

Der Anteil der oligomycininsensitiven Atmung ist bei den Zellen mit hohem UCP1-Gehalt mit 42.5 % zweifach höher als bei den Kontrollen (21.7 %).

Durch Palmitat erhöht sich die Atmung der UCP1-Zellen signifikant von 42.5 % auf 58.1 % der maximalen Atmung. Die relative Atmungsrate der Kontrollzellen ändert sich durch Palmitatzugabe nicht.

Vergleicht man die Zunahme der relativen Atmung der UCP1-Zellen mit geringem und hohem UCP1-Proteingehalt nach Fettsäurezugabe, so kann man feststellen, dass sich die

relative Atmung bei beiden Gruppen, unabhängig vom UCP1 Proteingehalt, um rund 15 % gegenüber der oligomycininsensitiven Atmung erhöht.

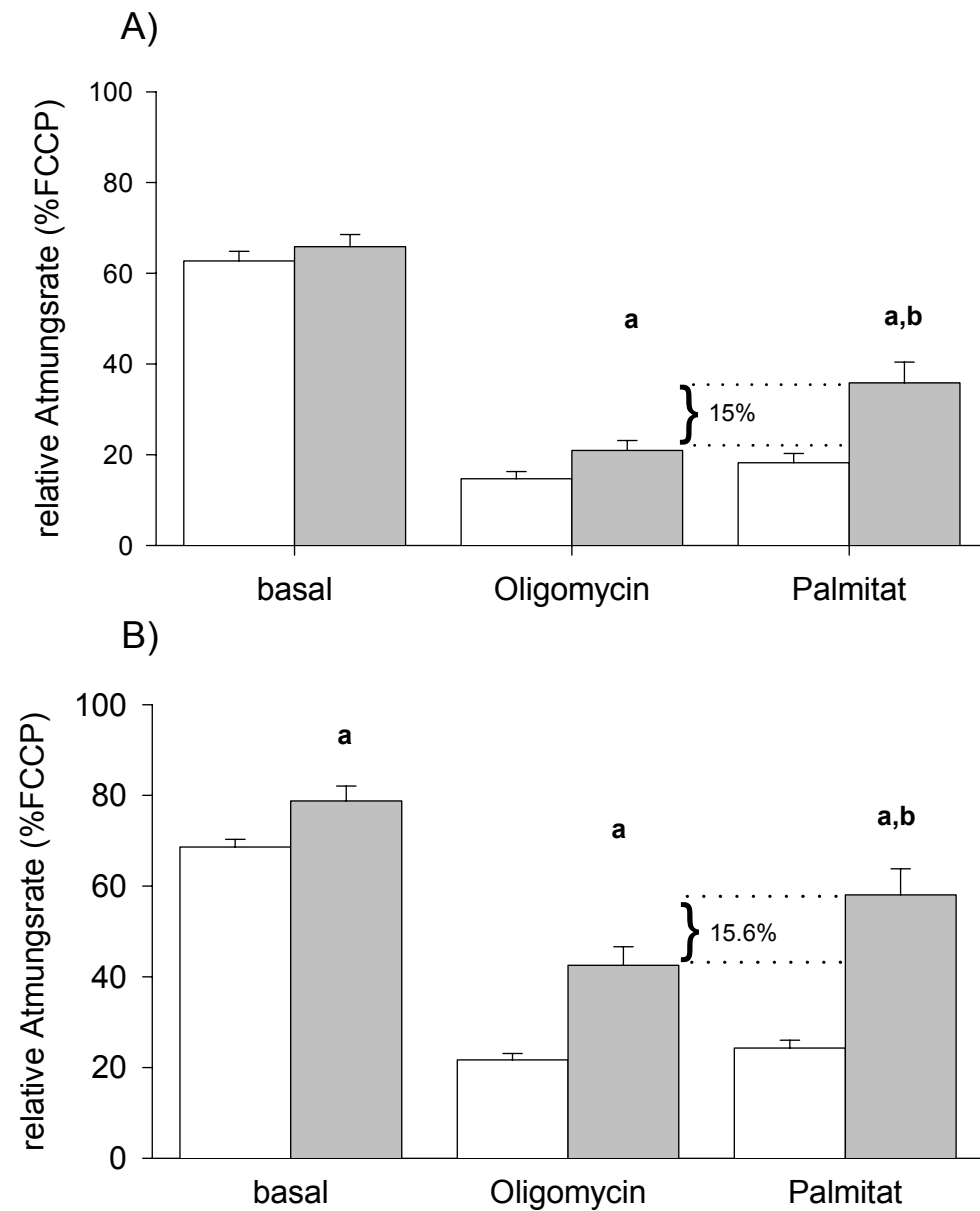


Abb. 8: Relative Atmungsrate (\pm SEM) von mUCP1 transfizierten HEK293-Zellen (graue Balken, n=6) und Kontrollzellen (Weiße Balken, n=6) nach (A) 6h und (B) 16 h Inkubation mit Plasmid-DNA. Die relative Atmungsrate zeigt den jeweiligen Anteil der basalen, oligomycininsensitiven und Palmitat-Atmung an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %). Dargestellt ist zudem die prozentuale Steigerung der Atmung nach Palmitatzugabe. n= Anzahl der eingesetzten Kulturschalen; a: signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle; b: signifikante Änderung nach Fettsäurezugabe; Student *t*-Test, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

3.1.4 Proteinnachweis von UCP1 und UCP3 in transfizierten Zellen

Nach transients Transfektion von HEK293-Zellen mit Maus UCP1, UCP2 und UCP3 wurde mittels Western Blots geprüft, ob eine spezifische Detektion von UCP1 und UCP3-Proteine in den Mitochondrien mit den vorhandenen Antikörpern möglich ist. Die Zellen wurden 16 h mit der Plasmid-DNA inkubiert. Die UCP2 transfizierten Mitochondrien dienen zur Überprüfung möglicher Kreuzreaktionen der UCP1 und UCP3 Antikörper mit UCP2. Für die UCP2-Detektion stand zum Zeitpunkt dieser Experimente kein geeigneter Antikörper zur Verfügung. Als positive Kontrolle wurden Mitochondrien aus dem BAT von Dsungarischen Zwerghamstern parallel analysiert, da in diesem Gewebe sowohl UCP1 und UCP2, als auch UCP3 exprimiert werden.

UCP1 kann in den Mitochondrien von transfizierten HEK293-Zellen eindeutig nachgewiesen werden (Abb.6 A/ 9). Auch bei den Mitochondrien aus dem BAT von Hamstern erscheint ein spezifisches UCP1-Signal bei einer Größe von etwa 33 kDa. Bei den UCP2 und UCP3 transfizierten Zellen werden keine Proteine detektiert. Der Antikörper ermöglicht also eine spezifische Detektion von Hamster- und Maus-UCP1.

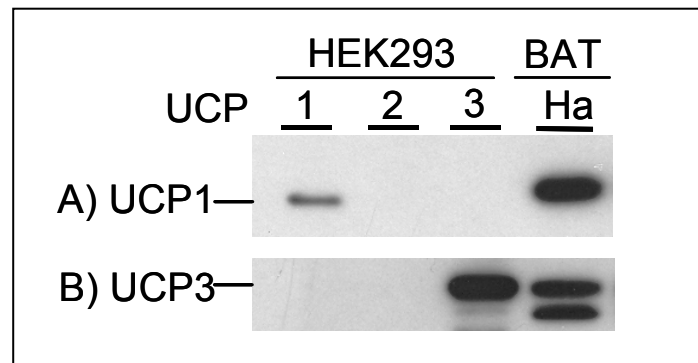


Abb. 9: Western Blot-Analyse von UCP1 und UCP3 in Mitochondrien von transfizierten HEK293 Zellen; neben UCP1 und UCP3 sind auch UCP2 transfizierte Mitochondrien und Mitochondrien aus dem braunen Fettgewebe vom Dsungarischen Zwerghamstern (P.S.) als Positivkontrolle aufgetragen. A) Detektion von UCP1; B) Detektion von UCP3; von jeder Proteinprobe wurden jeweils 15 µg aufgetragen;

Auch UCP3 konnte in den Mitochondrien der UCP3 transfizierten HEK293-Zellen und des braunen Fettgewebes vom Hamster spezifisch nachgewiesen werden. Das Protein hat wie UCP1 eine Größe von etwa 33 kDa (Abb. 9 B). Beim Hamster erscheinen auf dem Western-Blot allerdings noch zwei weitere, etwas kleinere Banden unbekannter Proteine, die sehr dicht beieinander liegen und nur schlecht aufgelöst werden. Abgesehen davon kann man sagen, dass der gegen Maus-UCP3 generierte Antikörper sowohl Maus- als auch Hamster-UCP3 erkennt. UCP1 und UCP2 werden von dem Antikörper nicht detektiert.

Die Western Blot Analysen haben also bestätigt, dass UCP1 und UCP3 nach einer transienten Transfektion in HEK293-Zellen exprimiert werden und als mitochondriale Proteine vorliegen.

3.1.5 *O₂-Verbrauch von mUCP2 und mUCP3 transfizierten Zellen*

Der Sauerstoffverbrauch von mUCP2 oder mUCP3 transfizierten HEK293-Zellen wurde gemessen und mit Kontrollzellen verglichen, die mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert wurden.

Der basale O₂-Verbrauch mit Glucose als Substrat, ist bei allen drei Gruppen vergleichbar, er liegt zwischen 31 und 41 nmol O₂*min⁻¹ (Abb. 10). Nach Inhibition der ATP-Synthase mit Oligomycin, reduziert sich die Atmung in den UCP2-Zellen auf 9.0 ± 0.5 nmol O₂*min⁻¹ und bei den UCP3 transfizierten Zellen auf 9.6 ± 0.7 nmol O₂*min⁻¹. Bei Kontrollzellen erniedrigt sich die Rate auf 11.2 ± 1.0 nmol O₂*min⁻¹. Die Raten der oligomycininsensitiven Atmung der drei Versuchsgruppen unterscheiden sich demnach nicht voneinander. Von der basalen Atmung sind bei den drei Zellgruppen zwischen 70 und 75 % des O₂-Verbrauchs an die ATP-Synthase gekoppelt.

In Anwesenheit von Palmitat ändert sich bei keiner der drei Zellgruppen der O₂-Verbrauch. Eine fettsäureinduzierte Entkopplung von UCP2 und UCP3 erfolgte demnach nicht.

Der maximale Sauerstoffverbrauch der Zellen nach Zugabe von FCCP beträgt bei den Kontrollen 59.1 ± 6.7 nmol O₂*min⁻¹. Bei UCP2 und UCP3 transfizierten Zellen sind die Raten durchschnittlich etwas niedriger, sie liegen bei Werten von 41.6 ± 2.8 nmol O₂*min⁻¹ und 47.5 ± 4.6 nmol O₂*min⁻¹. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

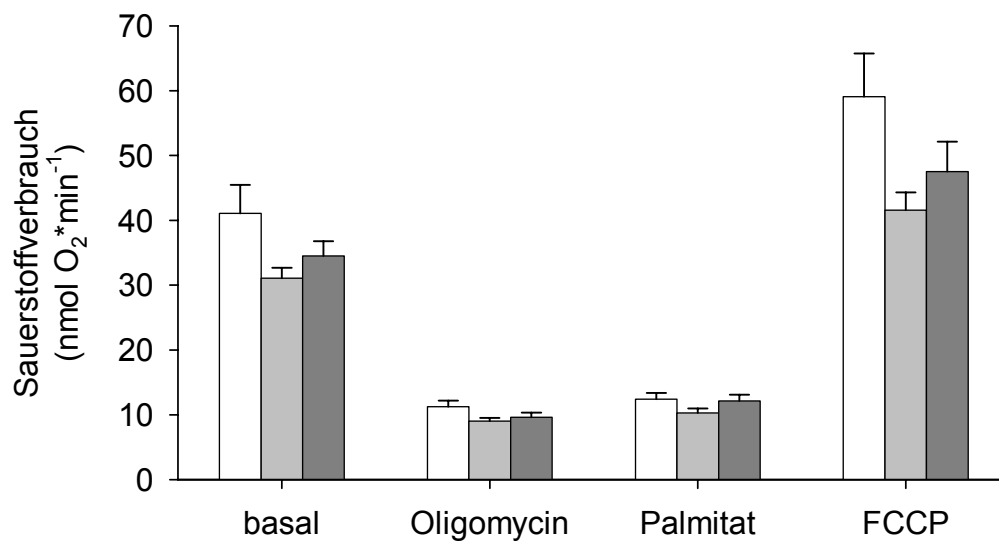


Abb. 10: Sauerstoffverbrauch (\pm SEM) von mUCP2 (hellgraue Balken, $n=8$) und mUCP3 (dunkelgraue Balken, $n=9$) transfizierten HEK293-Zellen, Kontrollzellen (weiße Balken, $n=7$) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert. Sukzessive Zugabe von Oligomycin, Palmitat und FCCP; n = Anzahl der eingesetzten Kulturschalen;

3.1.6 Relative Atmungsraten von mUCP2 und mUCP3 transfizierten Zellen

Bezieht man die gemessenen Sauerstoffverbrauchsrate auf die maximale Rate in Anwesenheit von FCCP, so erreichen die relativen basalen Atmungsraten bei den drei Zellgruppen zwischen 69 % und 75 % der maximalen Atmung (Abb. 11). Auch der relative O₂-Verbrauch in Anwesenheit von Oligomycin unterscheidet sich nicht signifikant bei Kontrollen und mUCP2 bzw. mUCP3 transfizierten Zellen, er liegt bei durchschnittlich 21 %. Wie bereits an den absoluten O₂-Verbrauchsrate erkennbar ist, erfolgt nach Palmitatzugabe bei keiner der Zellgruppen eine Änderung in der oligomycininsensitiven Atmungsrate.

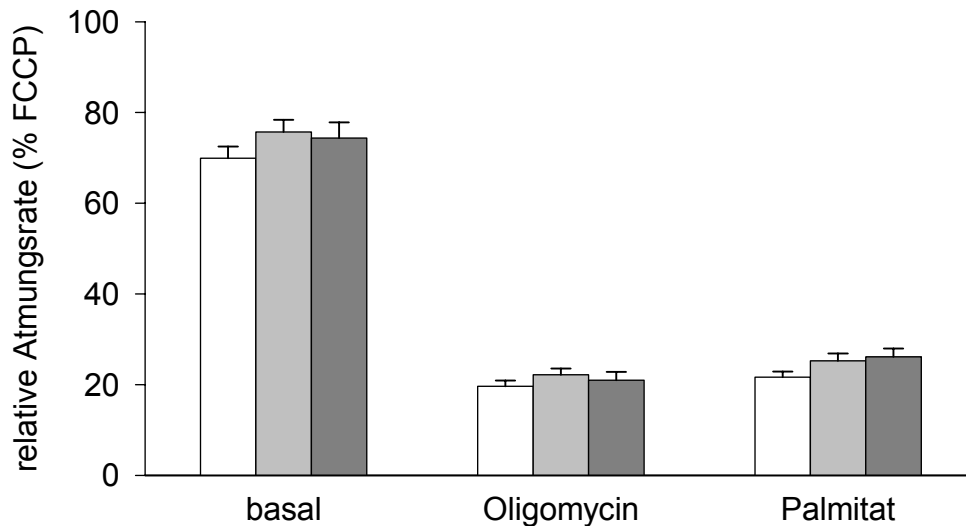


Abb. 11: relative Atmungsrate (\pm SEM) von mUCP2 (hellgraue Balken, n=8) und mUCP3 (dunkelgraue Balken, n=9) transfizierten HEK293-Zellen, Kontrollzellen (weiße Balken, n= 7) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert. Die relative Atmungsrate zeigt den jeweiligen Anteil der basalen, oligomycininsensitiven und Palmitat-Atmung, an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %);

3.1.7 O_2 -Verbrauch von *dmeUCPx* und *mUCP1* transfizierten Zellen

Mittels Sauerstoffverbrauchsmessungen wurde geprüft, ob *dmeUCPx*, ein UCP4-Ortholog aus *Drosophila melanogaster*, eine mit Maus-UCP1 vergleichbare mitochondriale Entkopplung bewirkt. Der Sauerstoffverbrauch von *dmeUCPx* transfizierten HEK293-Zellen wurde mit den Atmungsraten von Kontrollzellen und *mUCP1* transfizierten Zellen verglichen (Abb. 12). Die basale Glucoseatmung der *dmeUCPx* exprimierenden Zellen ist mit $35.4 \pm 4.1 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ niedriger als die Raten der Kontrollen und UCP1-Zellen, die bei beiden durchschnittlich $52 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ betragen.

Nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin sinken die O_2 -Raten von Kontroll- und *dmeUCPx*-Zellen auf vergleichbare Raten von $13.4 \pm 1.0 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. $11.4 \pm 0.3 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Der Sauerstoffverbrauch der UCP1-Zellen wird auf durchschnittlich $21.7 \pm 1.4 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ reduziert. Die oligomycininsensitive Atmung der UCP1-Zellen liegt damit bei 41.7 % der basalen Atmung und ist signifikant höher als bei Kontroll- und *dmeUCPx*-Zellen. Bei den Kontrollen finden nur 26.7 %, bei den *dmeUCPx*-Zellen 32.1 % der basalen Atmung unabhängig von der ATP-Synthese statt.

Durch Zugabe von 50 μM Palmitat erfolgt nur bei den UCP1-Zellen eine signifikante Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs auf $32.4 \pm 1.9 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Eine Erhöhung der Palmitatkonzentration auf 100 μM bewirkt keine weitere Steigerung der Atmung. Der maximale fettsäureinduzierte O_2 -Verbrauch wird also bereits bei einer Konzentration von 50 μM Palmitat erreicht. Bei den Kontrollen und dmeUCPx-Zellen bewirkt auch eine höhere Palmitatkonzentration keine Entkopplung der Atmung bzw. keine Änderung im O_2 -Verbrauch.

Die maximalen Atmungsraten nach Entkopplung mit FCCP liegen bei den Kontrollzellen im Mittel bei $74.9 \pm 8.3 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$, die UCP1-Zellen veratmen durchschnittlich $59.6 \pm 4.7 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Für die dmeUCPx-Zellen konnte ein maximaler Verbrauch von $48.2 \pm 5.2 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ ermittelt werden. Die unterschiedlichen maximalen Atmungsraten der Versuchsgruppen deuten auf unterschiedliche Zellzahlen in den Einzelmessungen hin.

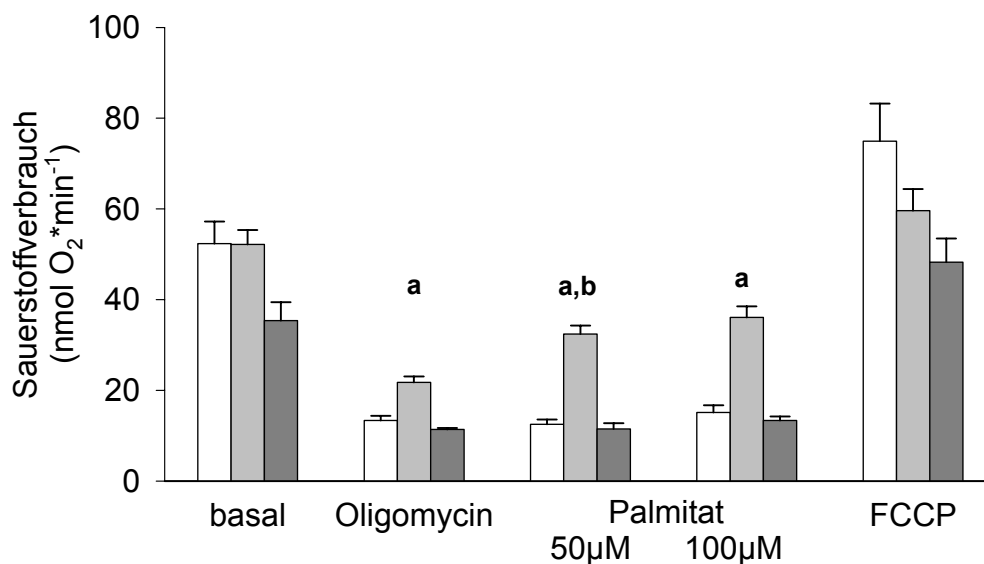


Abb. 12: Sauerstoffverbrauch (\pm SEM) von mUCP1 (hellgraue Balken) und dmeUCPx (dunkelgraue Balken) transfizierten HEK293-Zellen, Kontrollzellen (weiße Balken) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert ($n=5$ Kulturschalen pro Gruppe). Sukzessive Zugabe von Oligomycin, Palmitat und FCCP. a: signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle; b: signifikante Änderung nach Fettsäurezugabe; Student t -Test, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

3.1.8 Relative Atmungsraten von *dmeUCPx* und *mUCP1* transfizierten Zellen

Bezieht man die Atmungsraten zur Korrektur der Zellzahlschwankungen auf den maximalen Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von FCCP, so liegt der basale O₂-Verbrauch von Kontrollzellen und *dmeUCPx*-Zellen bei 70.5 % bzw. 73.3 % der maximalen Atmung (Abb. 13). Der relative O₂-Verbrauch bei den UCP1-Zellen ist mit 88 % signifikant höher als bei den anderen beiden Versuchsgruppen.

Auch die relative Rate der nicht an die ATP-Synthese gekoppelten Atmung ist mit 36.7 % bei den UCP1-Zellen signifikant höher als bei den Kontrollen (18.9 %) und den *dmeUCPx*-Zellen (24.4 %). In Anwesenheit von 50 µM Palmitat werden bei den UCP1-Zellen 54.8 % der maximalen Atmung erreicht. Bei einer Erhöhung der Palmitat Konzentration auf 100 µM steigt die relative Atmungsrate nur noch wenig bis auf 60.9 %. Bei den Kontrollen und *dmeUCPx*-Zellen wird die von der ATP-Synthese unabhängige Atmung durch Fettsäurezugabe nicht beeinflusst.

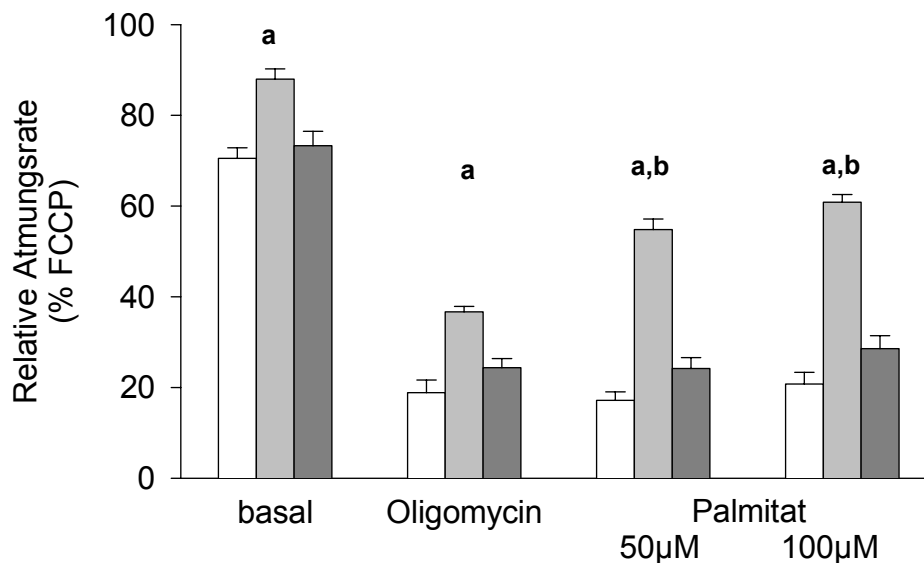


Abb. 13: relative Atmungsrate (\pm SEM) von *mUCP1* (hellgraue Balken) und *dmeUCPx* (dunkelgraue Balken) transfizierten HEK293-Zellen, Kontrollzellen (weiße Balken) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert (n=5 Kulturschalen pro Gruppe). Die relative Atmungsrate zeigt den jeweiligen Anteil der basalen, oligomycininsensitiven und Palmitat-Atmung an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %). a: signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle; b: signifikante Änderung nach Fettsäurezugabe; Student *t*-Test, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

3.1.9 O_2 -Verbrauch von *dmeUCPx* und *dmeUCPx-mSOUP* kotransfizierten Zellen

Hinweise auf einen möglichen regulativen Zusammenhang von SOUP, einem mitochondrialen Folat-Transportprotein und *dmeUCPx* sollten durch Messung der Atmungseigenschaften von transfizierten HEK293-Zellen geprüft werden. Die Zellen wurden mit *dmeUCPx* allein oder mit *dmeUCPx* und *mSOUP* kotransfiziert und die Atmungsraten mit Kontrollzellen verglichen.

Die basale (Glucose-) Atmung wird durch *dmeUCPx* oder nach Koexpression von *dmeUCPx* und *mSOUP* nicht beeinflusst, der durchschnittliche O_2 -Verbrauch liegt wie bei den Kontrollen bei rund $80 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 14). Auch der von der ATP-Synthese unabhängige Sauerstoffverbrauch, der nach Zugaben von Oligomycin ermittelt wurde, ist bei allen drei Versuchsgruppen gleich. Die Atmungsraten liegen zwischen 13.5 und $16.1 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Wie bereits beobachtet wurde (vergl. 3.1.5.) bewirken Fettsäuren bei den *dmeUCPx*-Zellen keine Entkopplung der Atmung, die Rate beträgt $19.3 \pm 1.1 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Wird neben *dmeUCPx* auch *mSOUP* exprimiert hat dies auch keinen Einfluss auf die Atmung in Anwesenheit von Fettsäuren ($18.4 \pm 1.5 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$). Die durch FCCP induzierten maximalen Atmungsraten sind bei allen drei Versuchsgruppen nicht signifikant verschieden. Sie betragen bei den Kontrollen $126.1 \pm 5.6 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$, bei den *dmeUCPx*-Zellen $127.9 \pm 12.8 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ und $130.1 \pm 5.2 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ bei den *dmeUCPx-mSOUP* kotransfizierten. Man kann also sagen, dass die in den Messungen eingesetzten Zellzahlen sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden.

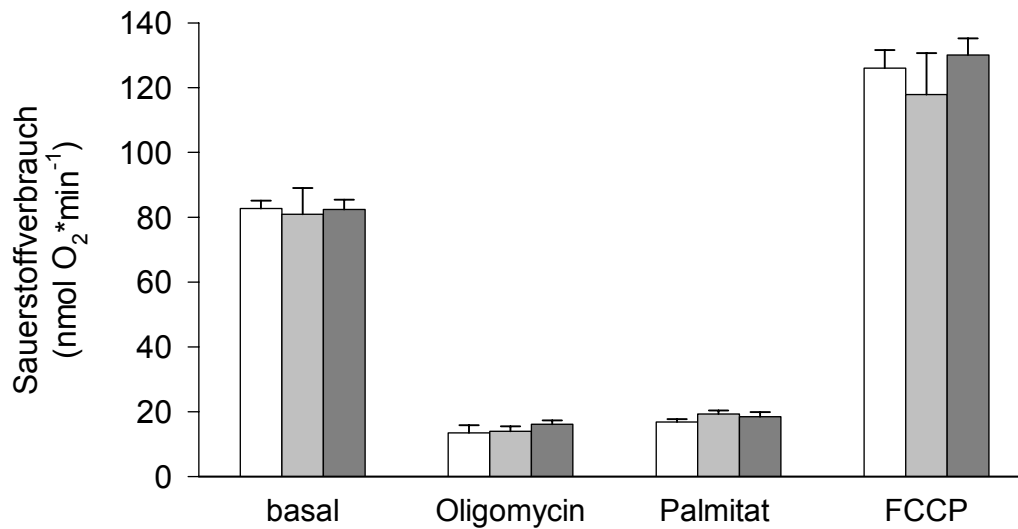


Abb. 14: Sauerstoffverbrauch (\pm SEM) von dmeUCPx (graue Balken, $n=5$) und dmeUCPx-mSOUP (dunkelgraue Balken, $n=5$) kotransfizierten HEK293-Zellen, Kontrollzellen (weiße Balken, $n=3$) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert. Sukzessive Zugabe von Oligomycin, Palmitat und FCCP.

3.1.10 Relative Atmungsraten von dmeUCPx und mSOUP kotransfizierten Zellen

Die absoluten Raten der maximalen Atmung in Anwesenheit von FCCP bei den Kontrollen, dmeUCPx und dmeUCPx-mSOUP kotransfizierten HEK293-Zellen unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Demzufolge gibt es auch keine signifikanten Unterschiede in den relativen Raten des basalen und oligomycininsensitiven O_2 -Verbrauchs. Auch die relative Atmung in Anwesenheit von Fettsäuren unterscheidet sich nicht zwischen den drei Versuchsgruppen (Abb. 15). Der relative basale Sauerstoffverbrauch liegt bei durchschnittlich 66 %. Der Anteil der oligomycininsensitiven Atmung an der maximalen Atmungsrate beträgt bei den Kontrollen 10.7 %, bei den dmUCPx-Zellen 11.9 % und bei den dmeUCPx-mSOUP-Zellen 12.6 %. Die relativen O_2 -Verbrauchswerte ändern sich nach Zugabe von Palmitat nicht signifikant (Kontrollen 13.3 %, dmUCPx 17 %, dmUCPx-mSOUP 14.4 %).

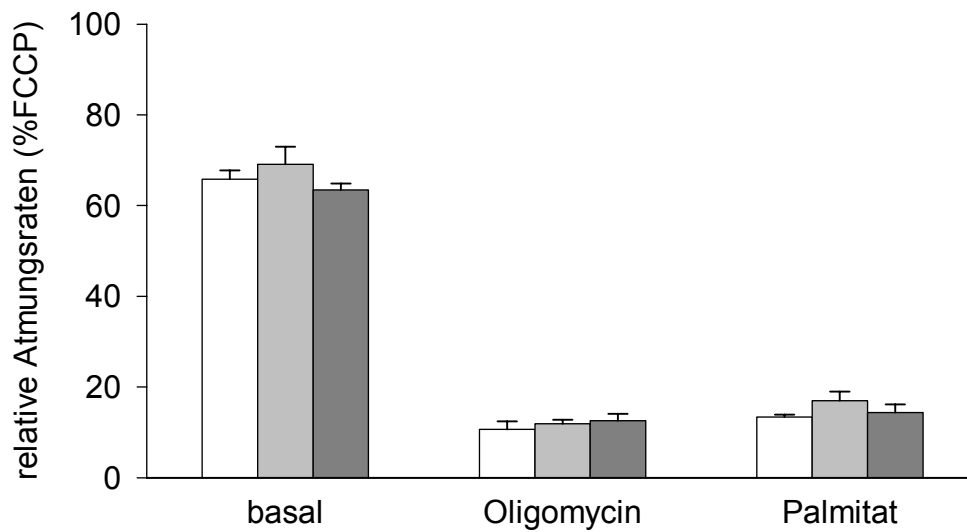


Abb. 15: Relative Atmungsrate (\pm SEM) von dmeUCPx (graue Balken, $n=5$) und dmeUCPx-mSOUP kotransfizierten HEK293-Zellen (dunkelgraue Balken, $n=5$), Kontrollzellen (weiße Balken, $n=3$) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert. Die relative Atmungsrate zeigt den jeweiligen Anteil der basalen, oligomycininsensitiven und Palmitat-Atmung an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %).

3.1.11 O_2 -Verbrauch von mSOUP, UCP1 und kotransfizierten Zellen

Nach Kotransfektion von mSOUP und mUCP1 wurde der möglicherweise regulative Einfluss von mSOUP auf die mUCP1 vermittelte mitochondriale Entkopplung mittels Sauerstoffverbrauchsmessungen geprüft. Neben Kontrollzellen, wurden mSOUP, mUCP1 oder kotransfizierte Zellen gemessen.

Die basale Glucoseatmung ist bei den vier Zellgruppen vergleichbar, sie liegt zwischen 44 und 52 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 16). Die Atmung in Anwesenheit von Oligomycin ist sowohl bei den mUCP1 ($19.2 \pm 1.0 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$), als auch bei den kotransfizierten Zellen ($17.6 \pm 0.6 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$) signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen ($11.9 \pm 0.4 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$) und mSOUP transfizierten Zellen ($11.1 \pm 0.4 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$). Der O_2 -Verbrauch der mUCP1- und der kotransfizierten Zellen ist gleich. Bei Zugabe von 100 μM Palmitat kann bei allen vier Versuchsgruppen ein signifikanter Anstieg in der Atmung beobachtet werden. Bei den Kontrollen erhöht sich die Atmung auf $16.0 \pm 0.6 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ und auf $15.1 \pm 0.7 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$ bei den mSOUP-Zellen. Die Atmung bei den mUCP1 und mUCP1-mSOUP-Zellen wird durch Fettsäuren allerdings in beiden Gruppen um 35 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$

erhöht. Die in Anwesenheit von FCCP ermittelten Atmungsraten sind wiederum vergleichbar bei allen vier Gruppen, sie liegen zwischen 69 und 77 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$.

Durch eine Überexpression von mSOUP bzw. der Kotransfektion von mSOUP und mUCP1 wird die Zellatmung oder die UCP1 vermittelte Entkopplung der Mitochondrien nicht beeinflusst.

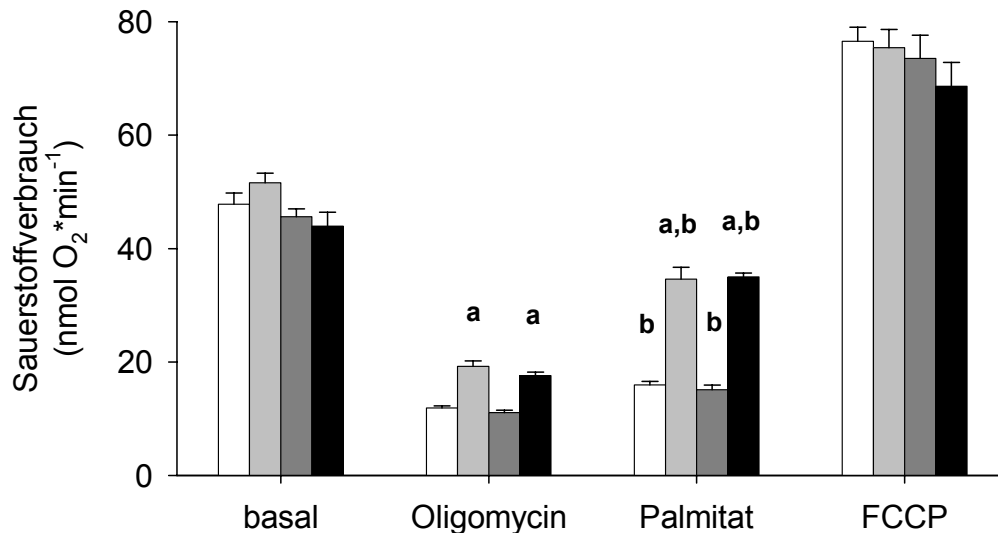


Abb. 16: Sauerstoffverbrauch (\pm SEM) von mUCP1 (hellgraue Balken, $n=5$), mSOUP (dunkelgraue Balken, $n=5$) und mUCP1-mSOUP kotransfizierten HEK293-Zellen (schwarze Balken, $n=5$). Kontrollzellen (weiße Balken, $n=3$) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert. Sukzessive Zugabe von Oligomycin, Palmitat und FCCP; a: signifikante Änderung gegenüber den Kontrollen; b: signifikante Änderung nach Fettsäurezugabe; Student t -Test, Signifikanzniveau bei $p<0.05$;

3.1.12 Relative Atmungsraten von mUCP1 und mSOUP kotransfizierten Zellen

Betrachtet man die relativen, auf die maximale FCCP-Atmung bezogenen basalen Raten, so betragen diese bei allen vier Versuchsgruppen etwas über 60 % (Abb. 17). Durch Oligomycingabe reduzieren sich die Raten bei den Kontrollen und bei den mSOUP-Zellen auf durchschnittlich 15 % der maximalen Atmung. Bei den mUCP1 und mUCP1-mSOUP-Zellen ist der relative Sauerstoffverbrauch mit 26 % signifikant höher. In Anwesenheit von Palmitat wird in allen vier Versuchsgruppen die relative Atmungsrate signifikant erhöht. Die Kontrollen und die mSOUP-Zellen erreichen 21 % der maximalen Atmung, die den mUCP1

und mUCP1-mSOUP-Zellen allerdings 46 % bzw. 52 %. Die relative Palmitat-Atmung ist damit signifikant höher als bei den Kontrollen und den mSOUP transfizierten Zellen.

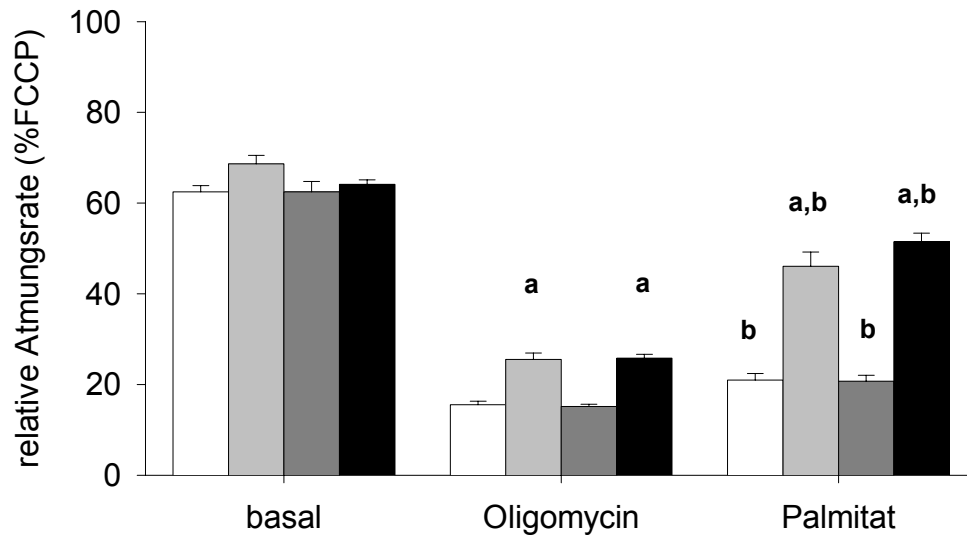


Abb. 17: Relative Atmungsrate (\pm SEM) von mUCP1 (hellgraue Balken, n=5), mSOUP (dunkelgraue Balken n=5) und mUCP1-mSOUP kotransfizierten HEK293-Zellen. Kontrollzellen (weiße Balken, n=3) wurden mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert. Die relative Atmungsrate zeigt den jeweiligen Anteil der basalen, oligomycininsensitiven und Palmitat-Atmung an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %). a: signifikante Änderung gegenüber den Kontrollen; b: signifikante Änderung nach Fettsäurezugabe; Student *t*-Test, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

Die Messungen des O₂-Verbrauchs von HEK293-Zellen nach Koexpression von mSOUP mit dmeUCPx oder mUCP1 haben gezeigt, dass mSOUP weder einen Einfluss auf die Atmung in dmeUCPx-transfizierten Zellen (Abb. 14), noch auf die entkoppelte Atmung in mUCP1-transfizierten Zellen hat (Abb 16).

3.2 Genotypanalyse von Wildtypmüshen und Mutanten

Die in dieser Arbeit untersuchten Hamstermutanten sind durch ein Fehlen der UCP3-Expression im BAT charakterisiert. Die Ursache für das gewebespezifische UCP3 Defizit ist bislang noch ungeklärt. Der Phänotyp von Wildtypen und Mutanten konnte bisher nur durch eine Analyse der UCP3-mRNA des BAT *post mortem* eindeutig bestimmt werden.

Eine Analyse der UCP3-Gensequenzen von Wildtypen und Mutanten hat zwei Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNP1 und SNP2) im ersten Intron, also in einem nicht codierenden Bereich des UCP3 Gens ergeben (Fromme, 2003). Demnach ist es bei den Mutanten offensichtlich zu zwei gekoppelten Nucleotidtransition gekommen.

Um den Zusammenhang der SNPs mit dem UCP3 Defizit durch größere Tierzahlen zu bestätigen, wurden von 34 Wildtypen und sechs Mutanten aus den hier durchgeführten Experimenten der Genotyp ermittelt. Es wurden Nachkommen aus unterschiedlichen Würfen von 17 verschiedenen Elternpaaren der normalen Zucht mit unbekanntem Geno- bzw. Phänotyp untersucht. Vier der sechs genotypisierten Mutanten traten in der Wildtypzucht auf, die zwei anderen stammten aus der Mutantenzuchtlinie. Von insgesamt 20 Tieren wurden beide SNPs analysiert, von den restlichen 20 nur das SNP2.

Von den 34 phänotypischen Wildtypen, sind sechs Tiere für beide SNPs homozygot (G/G)/(A/A), von den anderen fünf wurde nur SNP2 (A/A) analysiert und als homozygot bestätigt. Insgesamt sind also 11 Tiere als homozygot charakterisiert worden. Die anderen 23 Wildtypen sind heterozygot. Von 10 Tieren wurden beide SNPs durch die RFLP-Analyse als heterozygot nachgewiesen ((G/A)/(A/G)), von den anderen wurden nur SNP2 als heterozygot (G/A) bestätigt (Tab. 4). Die Mutante aus der Inzuchtlinie und drei der Mutanten, die in der Wildtypzucht aufgetreten sind, sind homozygot für beide SNPs ((A/A)/(G/G)). Von zwei Mutanten wurde wiederum nur das SNP2 als (G/G) bestätigt.

Tab. 4: Phäno- und Genotyp von Wildtypen und Mutanten. Von allen aufgeführten Tieren wurde der SNP2 analysiert, von einem Teil der Tiere zusätzlich auch der SNP1. Der Phänotyp der Tiere wurde mittels Northern-Blots ermittelt. n= gesamte Tierzahl eines Phänotyps;

Phänotyp	n	SNP1			SNP2		
		(G/G)	(A/G)	(A/A)	(A/A)	(G/A)	(G/G)
Mutante	6	0	0	4	0	0	6
Wildtyp	34	6	10	0	11	23	0

Bei allen als Mutanten genotypisierten Hamstern konnte keine UCP3 Expression im BAT nachgewiesen werden. Die Hamster von denen SNP1 und SNP2 bzw. nur SNP2 homo- oder heterozygot vorlag, exprimierten alle UCP3 im BAT. Diese Daten, sowie vorherige Analysen (Fromme, 2003) bestätigen, dass offensichtlich ein Zusammenhang zwischen der SNP-Variante und dem Phänotyp besteht.

Zurzeit werden diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt, sind aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.3 Genexpressionsanalyse

3.3.1 UCP3 mRNA-Expression und Proteinanalyse im BAT

Bei den Mutanten ist im BAT keine UCP3 mRNA auf den Northern-Blots detektierbar (Abb. 18/ 19). Die UCP3 mRNA Expression im braunen Fettgewebe der Wildtypen ist nach siebentägiger Kaltakklimatisierung oder nach 48 h Fasten nicht signifikant verändert gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 18).

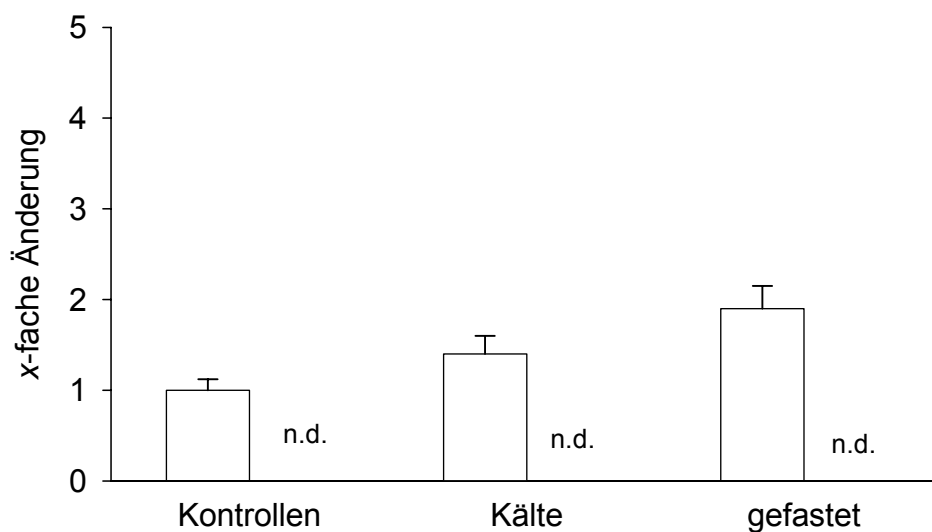


Abb. 18: UCP3 mRNA-Expression im BAT von Wildtypmähstern (weiße Balken, n=9-13) und Mutanten (n.d., n=10-15) nach sieben Tage Kälteexposition oder 48 h Fasten und von Kontrolltieren (23°C, *ad libitum* Futter) (n=9-15). Dargestellt ist der Änderungsfaktor (\pm SEM) gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten Mittelwert der Kontroll-Wildtypmähster. n.d.= nicht detektierbar;

Mittels Western-Blot Analysen von isolierten Mitochondrien konnte bestätigt werden, dass die Mutanten mit fehlender UCP3 mRNA-Expression im BAT, auch keine nachweisbaren UCP3 Proteinmengen in den Mitochondrien besitzen (Abb. 19).

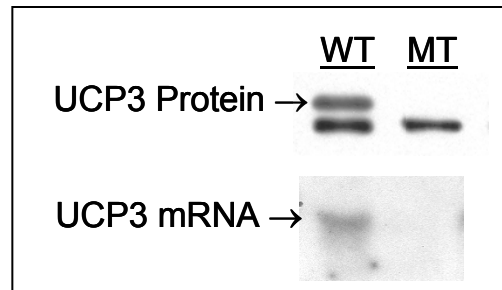


Abb 19. UCP3 Proteinnachweis in BAT Mitochondrien (Western Blot, oben) und UCP3 mRNA Expression im BAT (Northern Blot, unten) eines sieben Tage kaltakklimatisierten Wildtypieres und einer Mutante. Bei der Mutante ist weder das Protein (obere der zwei Banden), noch die mRNA nachweisbar.

Des Weiteren wurden die UCP3 Proteinmengen in den BAT-Mitochondrien von Wildtyphamstern nach sieben Tagen Kälteexposition und nach 48 h Fasten quantitativ mit Mitochondrien aus Kontrollhamstern verglichen. Der UCP3 Proteingehalt in BAT-Mitochondrien ist nach sieben Tagen Kaltakklimatisierung signifikant um durchschnittlich das 2.8-fache erhöht, gegenüber dem Proteingehalt von Hamstern, die bei 23°C gehalten wurden (Abb. 20). Nach 48 h Fasten ist der UCP3-Gehalt bei vier Hamstern signifikant erniedrigt verglichen mit den Kontrollen. Einer der gefasteten Hamster besitzt allerdings einen 2.5-fach höheren UCP3 Proteingehalt im BAT als die Kontrollmitochondrien.

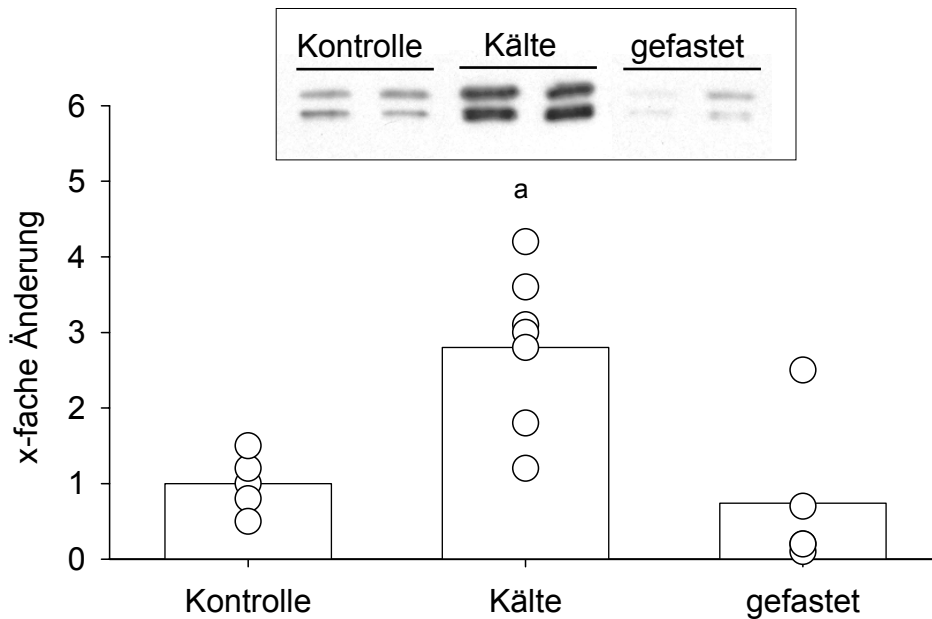


Abb. 20: UCP3 Proteingehalt im BAT von Wildtyphamstern nach sieben Tagen Kälteexposition (n=7) oder 48 h Fasten (n=5) und von Kontrolltieren (23°C, ad libitum Futter, n=5). Darstellung der Werte als x-fache Änderung gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten Mittelwert der Kontroll-Wildtyphamster. Dargestellt sind Einzelwerte und Gruppenmittelwerte. oben: Ausschnitt des Western Blots der für die quantitative Analyse der UCP3-Proteinmengen in den BAT-Mitochondrien verwendet wurde. a: signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollen. Student *t*-Test, Signifikanzniveau $p < 0.05$;

3.3.2 Korrelation des UCP3-Proteingehalts und der mRNA-Expression im BAT

Die mRNA- und Proteinmengen von einzelnen Wildtyphamstern wurden gegenübergestellt, um die Korrelation von mRNA-Gehalt und Proteinkonzentration im BAT der Kontrollen, kälteexponierten und gefasteten Tieren zu prüfen. Die Änderung im Proteinkonzentration und in der mRNA-Expression wurde jeweils als Änderungsfaktor gegenüber dem Mittelwert der Wildtyp-Kontrollen dargestellt. Wie bereits beschrieben wurde, gibt es bei den Wildtyphamstern keine signifikanten Unterschiede im mRNA-Gehalt bei den drei Behandlungsgruppen. Bei den drei gefasteten Hamstern liegt der mRNA-Gehalt zwischen 1.25-fach und etwa 1.8-fach über dem mittleren Kontrollwert (Abb. 21). Die Proteinmenge ist bei zwei Tieren tendenziell niedriger (0.2-0.7-fach). Der gefastete Hamster mit 1.8-fach höherer mRNA-Menge besitzt auch eine mehr als zweifach höhere Proteinmenge als die Kontrollen. Bei den kaltakklimatisierten Hamstern unterscheiden sich die durchschnittlichen mRNA Werte nicht von den Kontrollen oder gefasteten Hamstern. Die UCP3-Proteinmengen sind allerdings zwei- bis vierfach höher als bei den Kontrollen. Man kann also feststellen,

dass der UCP3-Proteingehalt der unterschiedlich behandelten Hamster nicht direkt mit dem mRNA-Gehalt im BAT korreliert.

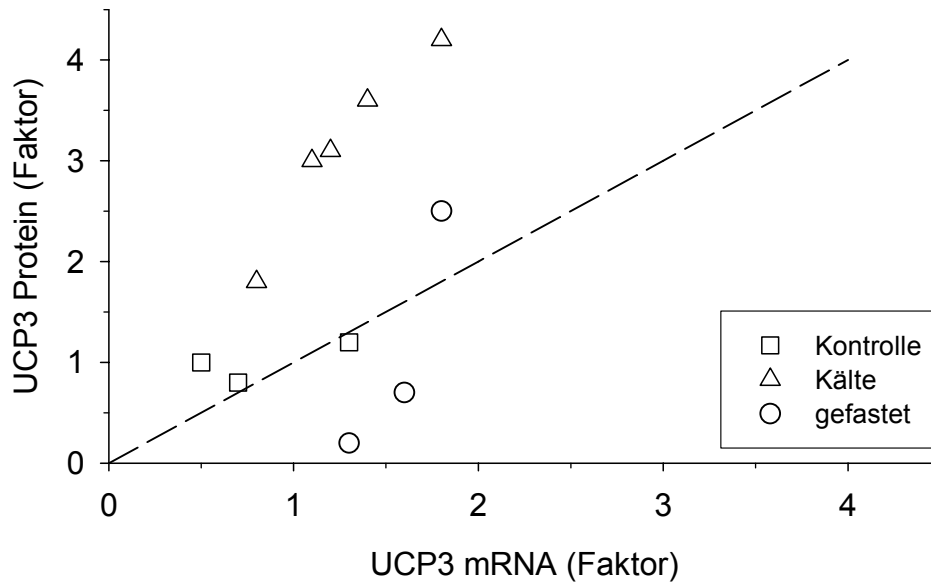


Abb. 21: Korrelation der UCP3-mRNA und Protein-Level im BAT von einzelnen Wildtyphamstern nach Kälteexposition oder Fasten sowie von Kontrollen. Dargestellt sind die Änderungsfaktoren gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten Mittelwert der Kontroll-Wildtyphamster. (- -) = 1:1-Linie;

3.3.3 Korrelation der UCP3 mRNA-Expression mit dem Genotyp

Um zu überprüfen, ob bei heterozygoten Wildtypen möglicherweise ein intermediärer Phänotyp auftritt, wurden die UCP3 mRNA-Spiegel von Wildtypen mit unterschiedlichem Genotyp aus einer Behandlungsgruppe verglichen. Es wäre möglich, dass die UCP3-Expression in heterozygoten Tieren geringer ist als in homozygoten.

Verglichen wurden die UCP3 mRNA-Spiegel der Gruppe der Wildtyphamster die für 48 h gefastet waren, da die Gruppen der Kontrollen und kaltakklimatisierten Hamster fast ausschließlich aus heterozygoten Tieren bestanden. Die Gruppe der gefasteten Tiere setzte sich aus jeweils fünf Wildtypen zusammen, die homozygot (A/A) und heterozygot (A/G) für das SNP2 waren. Außerdem wurden fünf für SNP2 homozygote (G/G) Mutanten analysiert. Vergleicht man die UCP3 mRNA-Konzentration der phänotypisch als Wildtypen charakterisierten Hamster, so scheint sie bei den Homozygoten (A/A) tendenziell eher etwas erhöht gegenüber den Heterozygoten (A/G). Dieser Unterschied zwischen beiden Genotypen ist aber nicht signifikant (Abb. 22). Bei Tieren mit homozygoten (G/G)-Genotyp für SNP2 konnte keine UCP3 mRNA detektiert werden.

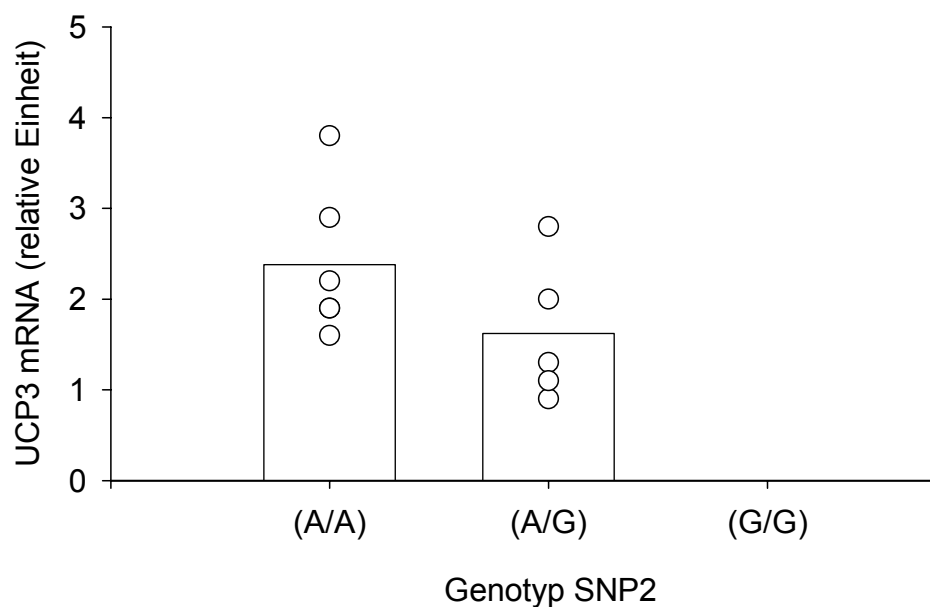


Abb. 22: Korrelation der UCP3-mRNA-Expression mit dem Genotyp des SNP2. Analysiert wurden die mRNA-Spiegel von 48 h gefasteten Hamstern. Dargestellt sind Einzelwerte und der Gruppenmittelwert. Balken= Mittelwerte; (A/A)= homozygot für das Wildtypallel, (G/G)= homozygot für das Mutantenallel, (A/G)= heterozygot; n=5 pro Genotyp;

3.3.4 UCP3 mRNA-Expression im Skelettmuskel

Im Skelettmuskel wird die Expression von UCP3 nach 48 h Fasten um rund das 3-fache gegenüber den *ad libitum* gefütterten Tieren gesteigert. Die UCP3 mRNA-Expression ist nach sieben Tagen Kälteexposition unverändert gegenüber den Wildtyp-Kontrolltieren (Abb. 23). Es gibt demnach keine Expressionsunterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten in den drei Behandlungsgruppen.

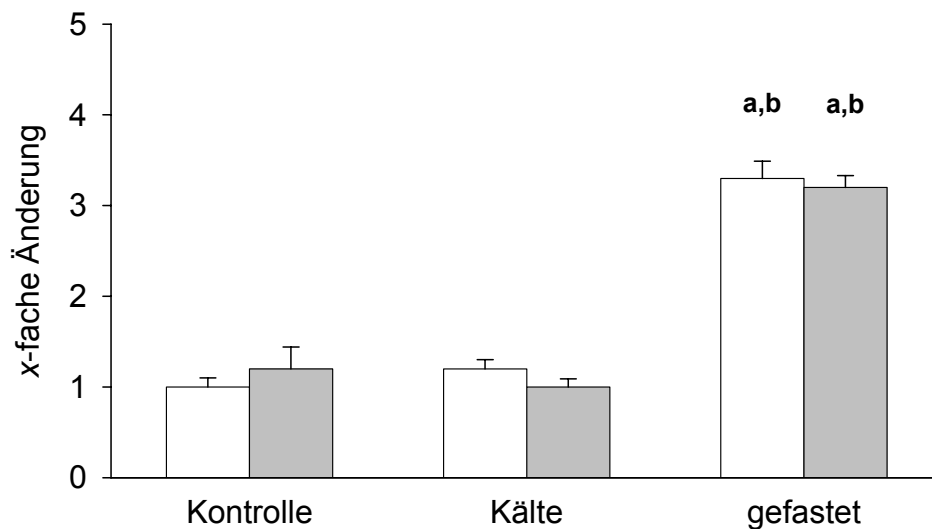


Abb. 23: UCP3 mRNA-Expression im Skelettmuskel von Wildtypmähstern (weiße Balken, n=6-10) und Mutanten (graue Balken, n=10) nach sieben Tage Kälteexposition oder 48 h Fasten und von Kontrolltieren (23°C, *ad libitum* Futter). Dargestellt ist der mittlere Änderungsfaktor (\pm SEM) gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten Mittelwert der Kontroll-Wildtypmähster. a: signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen; b: signifikanter Unterschied gegenüber der Kältegruppe; ANOVA, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

3.3.5 MTE-I mRNA-Expression im Skelettmuskel und BAT

Im Skelettmuskel der Wildtypen wird die MTE-I nach 48 h Fasten signifikant um das ~3.5-fache gegenüber den Kontrollen erhöht, bei Mutanten um etwa das 4.6-fache (Abb. 24). Die durchschnittlich etwas stärkere Induktion bei den Mutanten ist allerdings nicht signifikant verschieden von den Wildtypen.

Kälteexposition hat keinen Einfluss auf die MTE-I Expression im Skelettmuskel bei beiden Phänotypen, die mRNA-Konzentrationen entsprechen denen der Kontrollen.

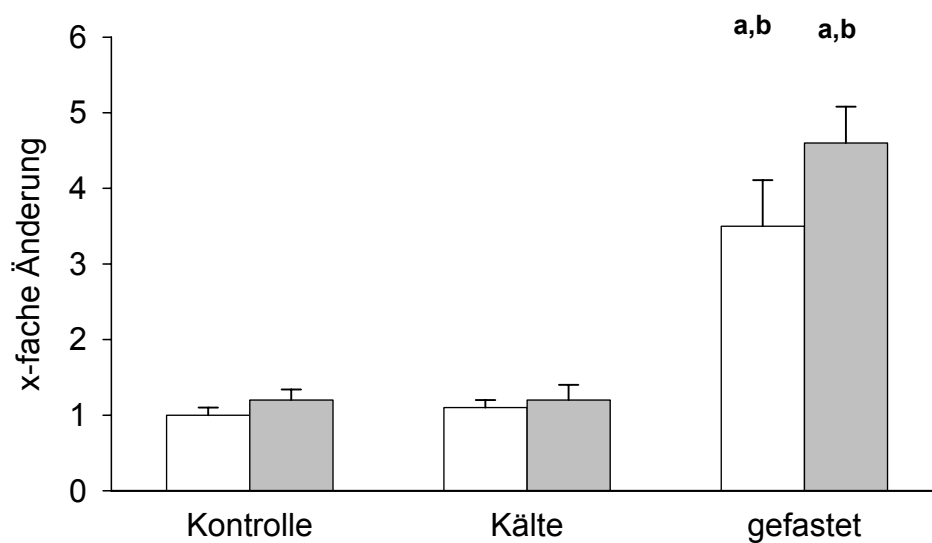


Abb. 24: MTE-I mRNA-Expression im Skelettmuskel von Wildtypmähstern (weiße Balken, n=6-10) und Mutanten (graue Balken, n=10) nach sieben Tage Kälteexposition oder 48 h Fasten und von Kontrolltieren (23°C, ad libitum Futter). Dargestellt ist der mittlere Änderungsfaktor (\pm SEM) gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten Mittelwert der Kontroll-Wildtypmähster. a: signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen; b: signifikanter Unterschied gegenüber der Kältegruppe; ANOVA, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

Auch im BAT der Wildtypmähster erhöht sich die Expression der MTE-I nach 48 h Fasten um durchschnittlich das 3.9-fache. Bei den Mutanten erfolgt ebenfalls ein 3.1-facher, signifikanter Anstieg im mRNA-Spiegel über den Kontrollwert. Im Unterschied zum Skelettmuskel wird die MTE-I Expression im BAT bei Wildtypmähstern auch nach Kälteexposition signifikant um das 2-fache und bei den Mutanten um das 1.8-fache erhöht (Abb. 25). Im BAT kann also kein direkter Zusammenhang zwischen der MTE-I- und UCP3-Expression festgestellt werden, da die MTE-I unabhängig vom UCP3-Gehalt induziert wird.

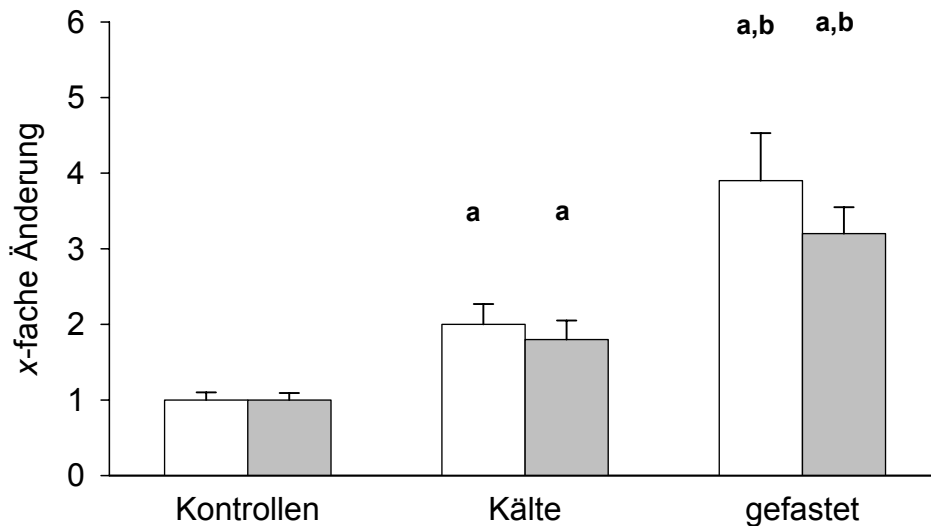


Abb. 25: MTE-I mRNA-Expression im BAT von Wildtypmähstern (weiÙe Balken, n=6-10) und Mutanten (graue Balken, n=10) nach sieben Tage Kälteexposition oder 48 h Fasten und von Kontrolltieren (23°C, ad libitum Futter). Dargestellt ist der mittlere Änderungsfaktor (\pm SEM) gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten mittleren Kontrollwert der Wildtypen; a: signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen; b: signifikanter Unterschied gegenüber der Kältegruppe; ANOVA, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

Vergleicht man die MTE-I mRNA Expression in BAT und Skelettmuskel von Wildtypen und Mutanten nach 48 h Fasten auf einem Northern Blot, so wird deutlich, dass der mRNA-Gehalt der MTE-I im BAT, unabhängig von der Behandlung, vielfach höher ist als im Skelettmuskel. Bei einer Menge von 15 μ g (gesamt-) RNA erscheinen beispielsweise in BAT-Proben der gefasteten Tieren deutliche Signale, während im Skelettmuskel fast keine mRNA detektiert wird, obwohl nach Fasten die stärkste Induktion der MTE-I erfolgt (Abb. 26). Die Signalintensitäten von UCP3 in BAT und Skelettmuskel sind hingegen vergleichbar.

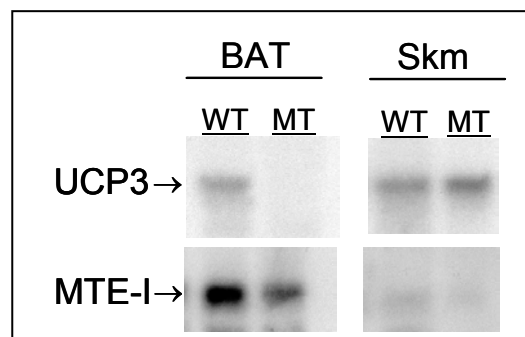


Abb. 26. Quantitativer Vergleich der UCP3 und MTE-I mRNA-Expression im BAT und Skelettmuskel nach 48 h Fasten auf einem Northern-Blot. Aufgetragen sind jeweils 15 μ g gepoolte gesamt-RNA von je zwei Wildtypen (WT) und zwei Mutanten (MT), aus dem braunen Fettgewebe (BAT) oder dem Skelettmuskel (Skm).

3.3.6 CPT-I mRNA-Expression im BAT

Die mRNA-Expression der *muscle-like* Form der *Carnitin-Palmitoyltransferase I* (CPT-I) wurde im BAT von Wildtypen und Mutanten geprüft. Die Northern Blot Analyse ergab weder eine Veränderung in der Expressionsrate nach Kälteexposition oder 48 h Fasten, noch konnten Unterschiede im Expressionslevel zwischen beiden Phänotypen festgestellt werden (Abb. 27).

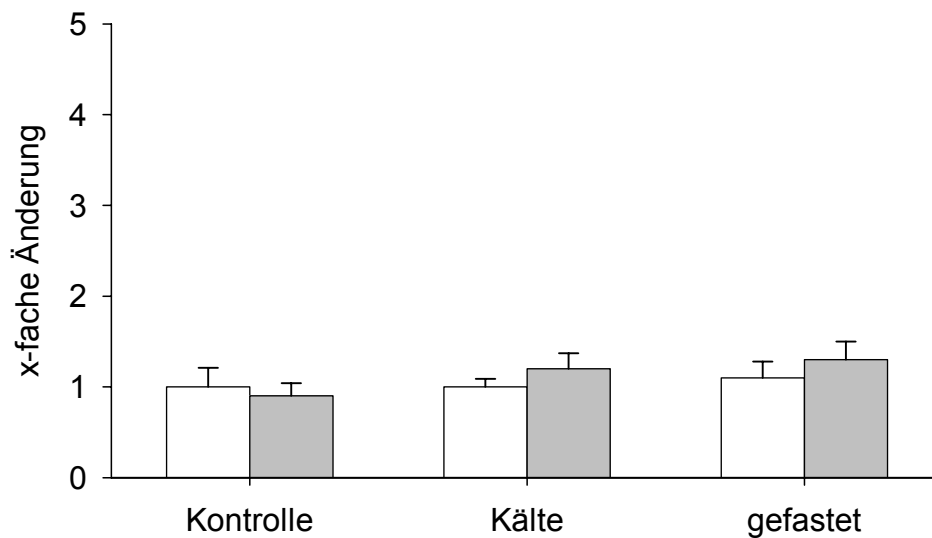


Abb. 27: CPT-I mRNA-Expression im BAT von Wildtyphamstern (weiße Balken, n=3-4) und Mutanten (graue Balken, n=4-5) nach sieben Tage Kälteexposition oder 48 h Fasten und von Kontrolltieren (23°C, ad libitum Futter). Dargestellt ist der mittlere Änderungsfaktor (\pm SEM) gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten Mittelwert der Kontroll-Wildtyphamster.

3.3.7 UCP1 mRNA-Expression im BAT

Warmakklimatisierte Mutanten besitzen im Mittel die gleichen UCP1 mRNA-Mengen wie Wildtypmüster. Nach sieben Tagen Kaltakklimatisierung zeigen beide Phänotypen eine ~2.5-fache Induktion der UCP1 mRNA gegenüber dem Kontrollniveau (Abb. 28). Durch Fasten ändert sich die Expression der UCP1-mRNA nicht gegenüber den Kontrollen. Man kann also feststellen, dass UCP1 und UCP3 im BAT unabhängig voneinander reguliert werden. Bei Wildtypen und Mutanten unterscheidet sich die UCP1 mRNA-Expression nicht.

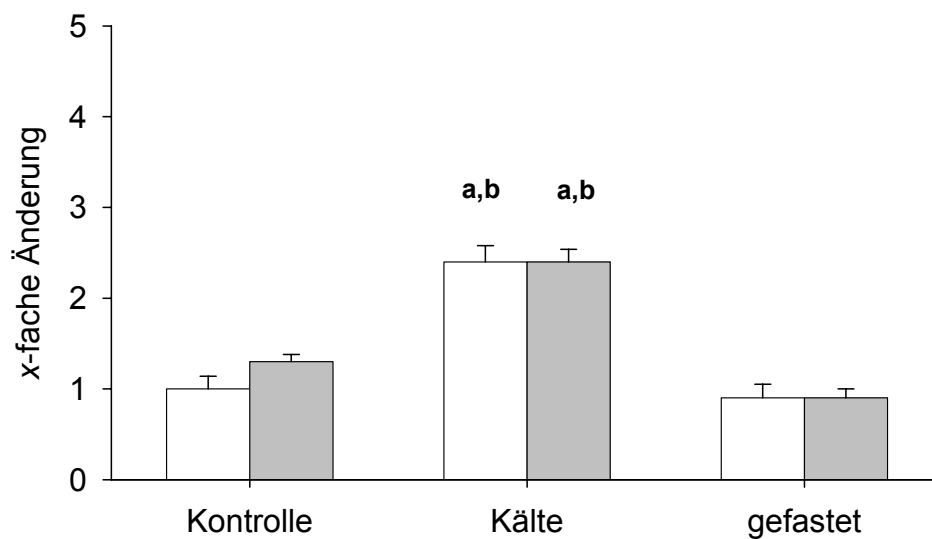


Abb. 28: UCP1 mRNA-Expression im BAT von Wildtypmüstern (weiße Balken, n=9-13) und Mutanten (graue Balken, n=10-15) nach sieben Tage Kälteexposition oder 48 h Fasten und von Kontrolltieren (23°C, ad libitum Futter). Dargestellt ist der mittlere Änderungsfaktor (\pm SEM) gegenüber dem mit Eins gleichgesetzten Mittelwert der Kontroll-Wildtypmüster. a: signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen; b: signifikanter Unterschied gegenüber der Fastengruppe; ANOVA, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

3.3.8 mRNA-Expression der SOD 2 im BAT

Um Hinweise auf eine möglicherweise erhöhte Superoxid-oder Peroxidbelastung in den Mitochondrien der UCP3 defizienten Hamster zu erhalten, wurde die Expression der Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) im BAT und Skelettmuskel von 28 Tagen kaltakklimatisierten Mutanten und Wildtyphamstern analysiert. Mit einer SOD2 cDNA-Sonde aus der Maus konnte ein spezifisches mRNA-Signal detektiert werden. Die Größe entspricht ungefähr der annotierten Sequenzgröße von ~1162 bp für die SOD2 in der Maus (Genbank-Accession # BC010548).

Die Analyse der SOD 2 mRNA-Konzentration im BAT und Skelettmuskel hat keine Unterschiede in der Expression bei Mutanten und Wildtypen ergeben (Abb. 29).



Abb. 29: Northern Blot-Analyse der SOD2 mRNA-Expression im BAT und Skelettmuskel (Skm) von 28 Tage kaltakklimatisierten Wildtyphamstern (WT) und Mutanten (MT). Gepoolte RNA-Proben von jeweils acht Tieren.

3.4 Fettsäurestoffwechsel in BAT und Skelettmuskelgewebeproben

Die Hypothese einer möglichen Beteiligung von UCP3 am mitochondrialen Fettsäurestoffwechsel wurde durch Messung der Fettsäureoxidationsraten *in vitro* im BAT und im Muskel *Tibialis anterior* von Wildtyphamstern und Mutanten verifiziert. Da die UCP3 Expression bei Futterentzug und Kälte in den Geweben unterschiedlich reguliert wird, wurde die Fettsäureaufnahme und Oxidation von Tieren beider Phänotypen bestimmt, die für sieben Tage bei 5°C kalt akklimatisiert oder für 48 h gefastet wurden. Die Oxidationsraten wurden mit Kontrollhamstern verglichen, die bei 23°C mit einem *ad libitum* Futterangebot gehalten wurden.

Für die quantitative Analyse der Fettsäurestoffwechselaktivität wurde den Gewebeproben anteilig radioaktiv markiertes Oleat angeboten. Anschließend wurde die Menge an freigesetztem, radioaktiven CO₂, sowie die Konzentration an intrazellulär vorliegendem, radioaktiven Oleat ermittelt.

3.4.1 CO₂-Freisetzung des dorsal cervicalen BAT

Für die Messung des Fettsäurestoffwechsels im BAT wurde das *dorsal-cervicale* Depot von jedem Tier in vier Stücke (4-30 mg) geteilt und diese parallel gemessen. Betrachtet man die CO₂-Produktion der einzelnen Gewebestückchen von allen Tieren, so besteht bei den Proben aus Kontroll- und gefasteten Hamstern beider Phänotypen und bei den kaltakklimatisierten Mutanten ein positiver Zusammenhang von CO₂-Freisetzung und dem Probengewicht ($0.406 < r_s < 0.735$, $p < 0.05$). Bei den BAT-Proben aus kaltakklimatisierten Wildtypen ist dieser Zusammenhang weniger deutlich ($p=0.49$) (Abb. 30 A).

Berechnet man für die einzelnen Proben die Rate der CO₂-Freisetzung pro Gramm Gewebe, so ist festzustellen, dass eine negative Korrelation mit dem Probengewicht bei Wildtypen und Mutanten aller Behandlungsgruppen besteht ($-0.606 < r_s < -0.807$, $p < 0.05$). Kleine Gewebestücke setzen demnach im Verhältnis zu größeren Proben mehr CO₂ frei (Abb. 30 B). Nur bei den Mutanter Kontrollgruppe besteht keine Gewichtsabhängigkeit ($r_s = -1.191$, $p=0.419$).

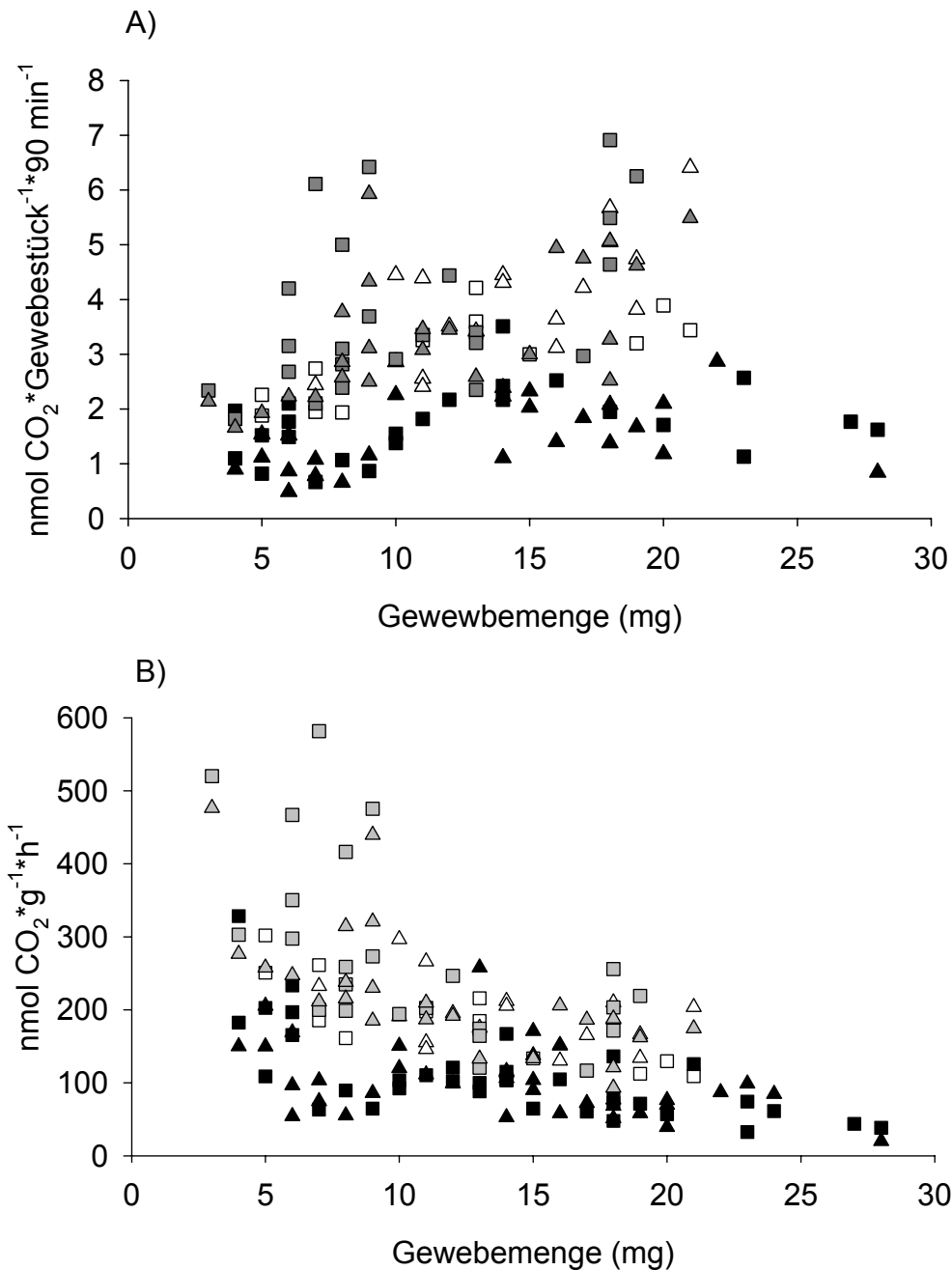


Abb. 30: CO₂-Produktion von BAT-Gewebeproben. A) Freigesetzte CO₂-Mengen von einzelnen BAT Gewebeproben in 90 min. B) Berechnete CO₂-Produktion pro Gramm Gewebe und Stunde von jeder BAT-Probe von Wildtyphamstern (□) und Mutanten (Δ). Von jedem Tier (n=3-6) wurden vier Proben gemessen. weiß= Kontrolltiere (23°C, ad libitum Futter), schwarz= sieben Tage Kälteexposition, grau= 48 h Fasten;

Ein Vergleich der mittleren CO₂-Produktion pro Gramm Gewebe von jeder Gruppe zeigt, dass die CO₂-Freisetzung aus dem BAT der Kontrollmutanten mit $278.9 \pm 26.7 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ sich nicht von den Wildtypkontrollen unterscheidet, deren mittlere Rate $284.5 \pm 34.9 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ beträgt (Abb. 31). Das braune Fettgewebe aus Tieren, die Kälte exponiert wurden, setzt im Vergleich mit Kontrollhamstern insgesamt nur etwa die Hälfte an CO₂ frei.

Bei den Wildtypen liegt die Rate bei $155.7 \pm 29.0 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und bei den Mutanten bei $117.5 \pm 14.0 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die etwas niedrigere Rate bei den Mutanten ist nicht signifikant verschieden von den Wildtypen. 48 h Fasten bewirkt bei beiden Phänotypen keine signifikante Änderung der Oxidationsrate gegenüber den *ad libitum* gefütterten Kontrollen (Wildtypen $373.5 \pm 94.9 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und Mutanten $303.9 \pm 29.1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

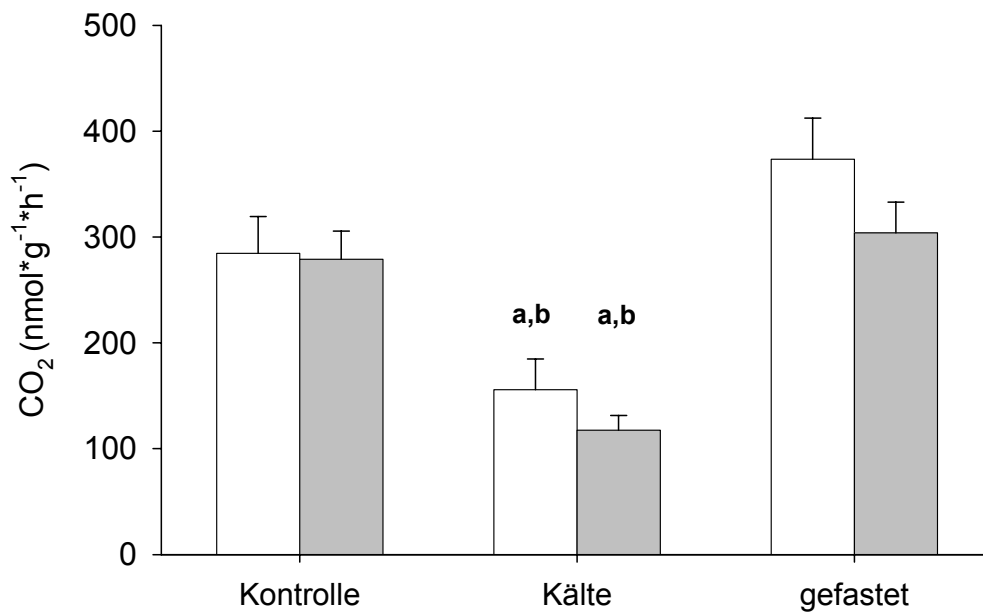


Abb. 31: Mittelwerte (\pm SEM) der CO_2 -Freisetzung pro Gramm BAT von Wildtyphamstern (weiße Balken, $n=3-6$) und Mutanten (graue Balken, $n=3-6$) in 1 h. Die Tiere wurden sieben Tage kälteexponiert, 48 h gefastet oder unter Kontrollbedingungen gehalten (23°C , *ad libitum* Futter). a: signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen; b: signifikanter Unterschied gegenüber der Fastengruppe; ANOVA, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

Man kann also zusammenfassend sagen, dass braunes Fettgewebe von Hamstern die sieben Tage Kälte exponiert wurden, durchschnittlich weniger CO_2 pro Gramm Gewebe produziert als BAT von warmaklimatisierten oder gefasteten Hamstern. Die Reduktion erfolgt bei beiden Phänotypen gleichermaßen.

3.4.2 Oleataufnahme des dorsal cervicalen BAT

Die Messung der Oleat-Aufnahme in den Gewebeproben sollte einen möglichen Einfluss der Behandlung bzw. des UCP3 Defizits auf die Fettsäureaufnahme der Gewebe klären.

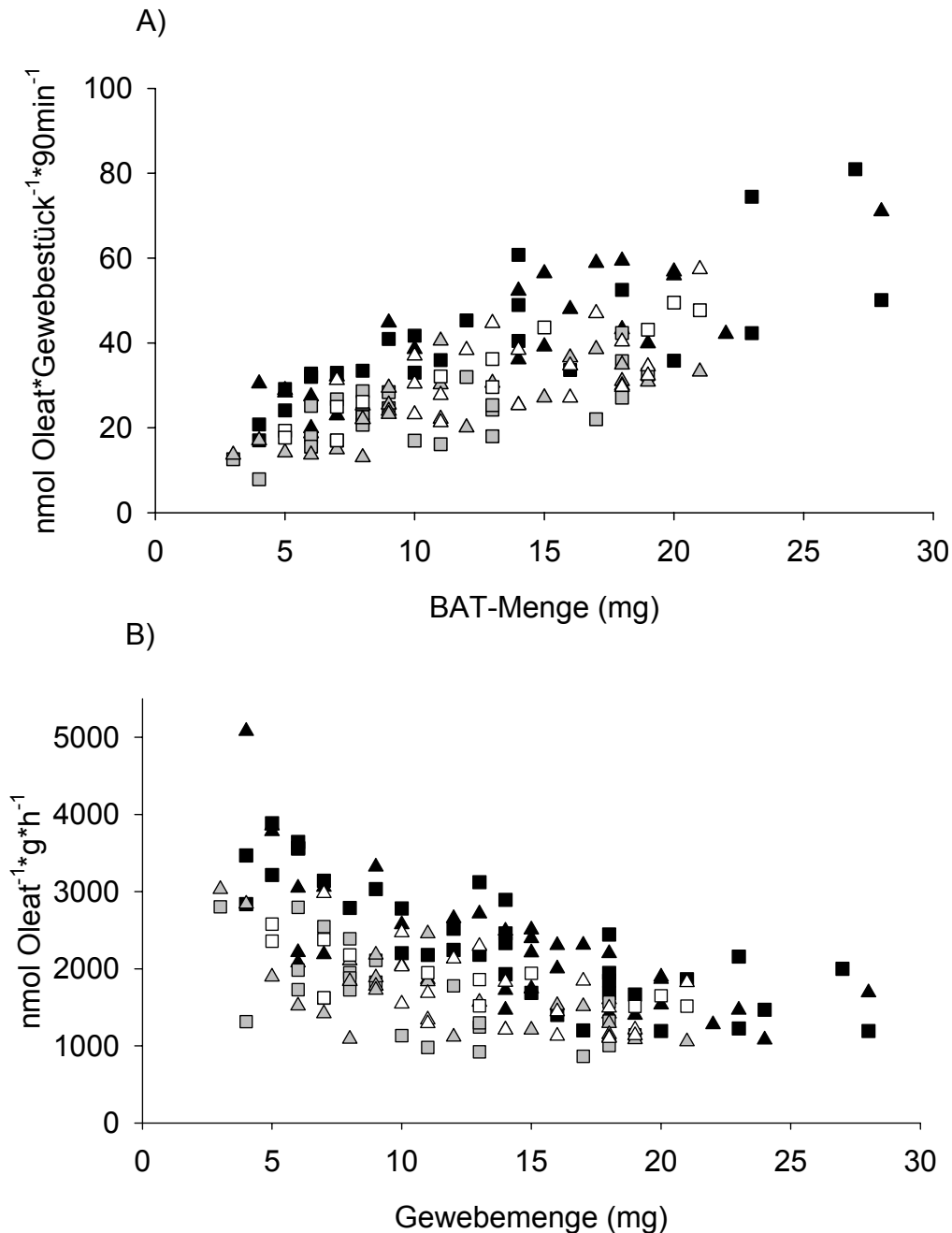


Abb. 32: Oleataufnahme von BAT-Gewebeproben. A) Aufgenommene Oleat-Mengen von einzelnen BAT Gewebeproben in 90 min, B) Berechnete Mengen der Oleataufnahme pro Gramm Gewebe und Stunde von jeder BAT-Probe von Wildtypmähstern (□) und Mutanten (Δ). Von jedem Tier (n=3-6) wurden vier Proben gemessen; weiß= Kontrolltiere (23°C, ad libitum Futter), schwarz= sieben Tage Kälteexposition, grau= 48 h Fasten;

Bei Wildtypen und Mutanten ist ein positiver Zusammenhang zwischen der BAT-Gewebemenge und der endogenen Oleat-Konzentration nachweisbar ($0.612 < r_s < 0.942$, $p < 0.05$) (Abb. 32 A). Wie bereits bei den Raten der CO_2 -Freisetzung festgestellt wurde, nehmen demnach kleine Gewebeproben pro Gramm mehr Oleat auf als größere Proben (Abb. 32 B).

Vergleicht man die mittlere Fettsäureaufnahme vom *dorsal cervicalen* BAT-Depot der Wildtyp- und Mutantenkontrolltiere, so ist kein Unterschied erkennbar. Die Kontrollgewebe der Wildtypen haben durchschnittlich $2707.9 \pm 77 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und die Mutanten $2345.7 \pm 222 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ des angebotenen Oleats aufgenommen (Abb. 33). Die Fettsäureaufnahme der gefasteten Tiere unterscheidet sich nicht von den Kontrollraten beider Phänotypen, sie beträgt bei den Wildtypen $2375.5 \pm 260 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und bei den Mutanten $2336.5 \pm 197 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Gegenteilig zur CO_2 -Freisetzung in BAT-Proben von kaltakklimatisierten Hamstern, ist die Fettsäureaufnahme bei beiden Phänotypen signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen und gefasteten Tieren. Die Oleataufnahme beträgt bei den Wildtypen $3427.1 \pm 357 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und bei den Mutanten $3170.6 \pm 258 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Wildtyp und Mutante unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

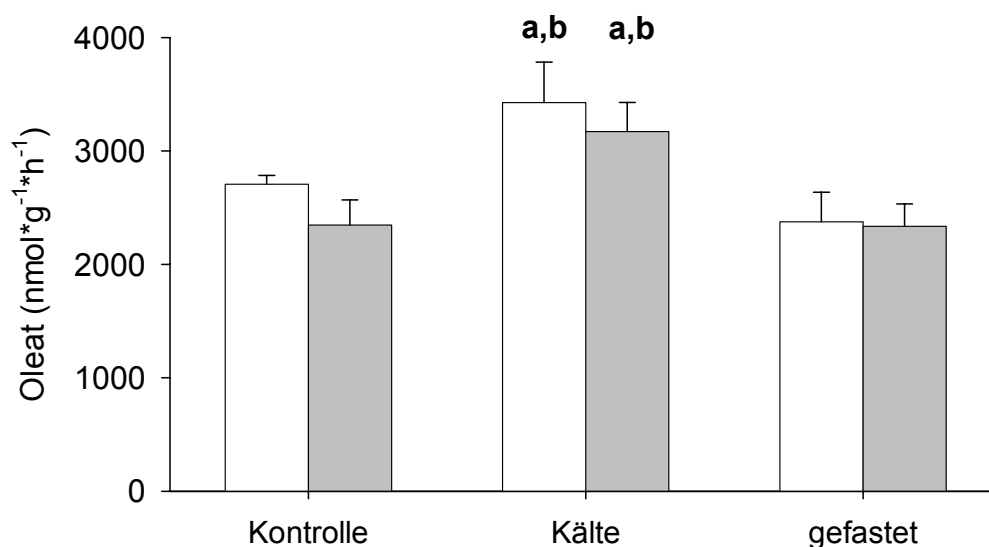


Abb. 33: Mittelwerte (\pm SEM) der aufgenommenen Oleatmengen pro Gramm BAT von Wildtyphamstern (weiße Balken, $n=3-6$) und Mutanten (graue Balken, $n=3-6$) pro Stunde. Die Tiere wurden sieben Tage kälteexponiert, 48 h gefastet oder unter Kontrollbedingungen gehalten (23°C , ad libitum Futter); a: signifikante Änderung gegenüber den Kontrollen; b: signifikante Änderung gegenüber der Fastengruppe; ANOVA, Signifikanzniveau bei $p < 0.05$;

3.4.3 CO₂-Freisetzung des *Tibialis anterior*

Im *Tibialis anterior* von Wildtypen ändert sich die Oleat-Oxidation nach Kälteakklimatisation oder Fasten nicht (Abb. 34). Die freigesetzte CO₂-Menge von Gewebeprobe aus den Kontrolltieren beträgt durchschnittlich $91.2 \pm 34.4 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, bei den kalt akklimatisierten $103.1 \pm 18.5 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und bei den gefasteten Tieren $112.6 \pm 21.8 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Der *Tibialis anterior* von warmakklimatisierten Mutanten setzt durchschnittlich $104.4 \pm 10.5 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ CO₂ frei. Weder Kälte noch Fasten haben einen Einfluss auf die CO₂-Rate, sie beträgt 108.5 ± 16.7 bei Wildtypen bzw. $134.7 \pm 10.7 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei gefasteten Mutanten. Damit unterscheiden sich die Raten der von der Fettsäureoxidation abhängigen CO₂-Produktion weder bei den verschiedenen Behandlungsgruppen, noch bei den beiden Phänotypen signifikant voneinander.

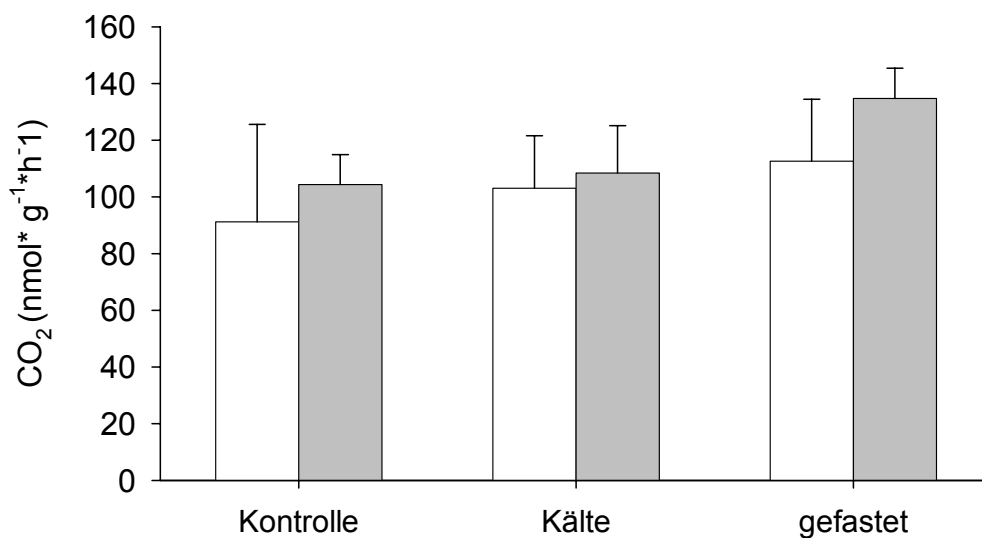


Abb. 34: Mittelwerte (\pm SEM) der CO₂-Freisetzung pro Gramm Skelettmuskel (*Tibialis anterior*) von Wildtypmähstern (weiße Balken, n=3-6) und Mutanten (graue Balken, n=3-6) in einer Stunde. Die Tiere wurden sieben Tage kälteexponiert, 48 h gefastet oder unter Kontrollbedingungen gehalten (23°C, ad libitum Futter).

3.4.4 Oleataufnahme des *Tibialis anterior*

Die gemessene Oleatkonzentration beträgt in Kontrollmuskulgewebe $1510.6 \pm 181.4 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und $1520.6 \pm 248.6 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in Muskelproben aus kaltakklimatisierten Wildtypen. Die Oleataufnahme bei gefasteten Wildtypen ist mit $1957.5 \pm 95.3 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ durchschnittlich etwas höher als bei den Kontrollen und den gefasteten Mutanten, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant (Abb. 35). Auch bei den Mutanten haben die verschiedenen Behandlungen keinen Einfluss auf die Oleataufnahme, sie liegt bei den drei Gruppen zwischen 1542.9 ± 117.3 und $1667.4 \pm 94.3 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

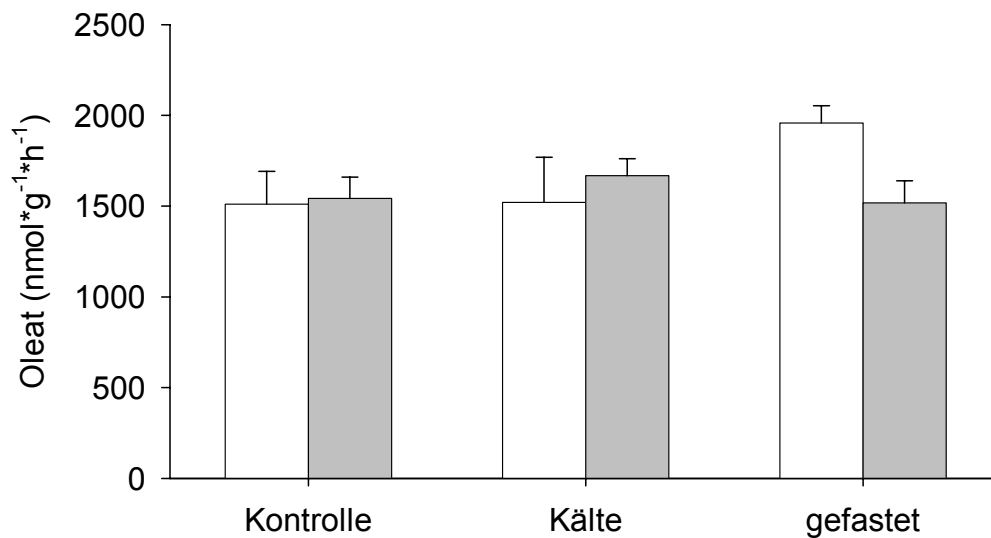


Abb. 35: Mittelwerte (\pm SEM) der aufgenommenen Oleatmengen pro Gramm Skelettmuskel (*Tibialis anterior*) von Wildtyphamstern (weiße Balken, $n=3-6$) und Mutanten (graue Balken, $n=3-6$) pro Stunde. Die Tiere wurden sieben Tage kälteexponiert, 48 h gefastet oder unter Kontrollbedingungen gehalten (23°C , ad libitum Futter).

3.4.5 Vergleich der gesamten Oleataufnahme und Oxidationsrate von BAT und Skelettmuskel

Die gesamte Oleataufnahme der BAT- und Skelettmuskelproben ergibt sich aus der Summe der gemessenen intrazellulären Oleatkonzentration und der CO₂-Rate. Die Oxidationsrate zeigt den prozentualen Anteil des insgesamt aufgenommenen Oleats der zu CO₂ oxidiert wurde.

Man kann feststellen, dass die BAT-Gewebeprouben der Wildtyp- und Mutanten-Kontrollen etwa 10 % der insgesamt aufgenommenen Fettsäuren oxidiert haben (Tab. 5/ A). Bei den gefasteten Tieren, liegt die Oxidationsrate bei durchschnittlich 12.5 %, ist aber nicht signifikant höher. Die kaltakklimatisierten Tiere beider Phänotypen oxidieren weniger als 5 % des aufgenommenen Oleats. Die Oleataufnahme bei diesen Tieren ist zwar insgesamt erhöht, allerdings ist die absolute Menge an freigesetztem CO₂ signifikant niedriger als bei den anderen beiden Behandlungsgruppen.

Im Skelettmuskel unterscheidet sich die gesamte Oleataufnahme nicht zwischen den drei Behandlungsgruppen und den zwei Phänotypen. Die Oxidationsrate beträgt zwischen 5.4 % und 6.3 %. Bei den gefasteten Mutanten ist die Rate mit 8.2 % etwas erhöht, diese Erhöhung ist aber nicht signifikant (Tab. 5/ B).

Man kann feststellen, dass die gesamte Oleataufnahme im BAT von beiden Phänotypen der drei Behandlungsgruppen signifikant höher als im Skelettmuskel ist.

Zudem ist die Oxidationsrate im BAT von Kontrollen und gefasteten Tieren signifikant höher als im Skelettmuskel.

Tab. 5: Mittelwerte der gesamten Oleataufnahme, intrazellulären Oleatkonzentration und CO₂-Rat im BAT (A) und *Tibialis anterior* (B) von Wildtypmüsten und Mutanten nach unterschiedlicher Behandlung. Die Oxidationsrate entspricht dem Anteil der freigesetzten CO₂-Menge von der insgesamt aufgenommenen Fettsäuremenge. Student *t*-Test, signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante einer Behandlungsgruppe bei *p* < 0.05, n.s. = nicht signifikant; WT=Wildtyp, MT=Mutante, Ko=Kontrolltiere, C=kaltakklimatisierte, F=48h gefastet;

A)

<i>nmol*g⁻¹*h⁻¹</i>	<i>WT-Ko</i>	<i>MT-Ko</i>	<i>WT-C</i>	<i>MT-C</i>	<i>WT-F</i>	<i>MT-F</i>
<i>intrazelluläre Oleat-Menge</i>	2707.9	2345.7	3427.1	3170.6	2375.5	2336.5
<i>CO₂</i>	284.5	279.0	155.7	117.5	373.5	303.9
<i>gesamte Oleat-Aufnahme (± SEM)</i>	2992.4 ± 111	2624.7 ± 245	3582.8 ± 376	3288.0 ± 269	2749.1 ± 286	2640.4 ± 215
<i>Oxidationsrate (%)</i>	9.5	10.6	4.3	3.6	13.6	11.5
<i>n</i>	3	5	6	6	6	6
<i>p</i>	n.s.		n.s.		n.s.	

B)

<i>nmol*g⁻¹*h⁻¹</i>	<i>WT-Ko</i>	<i>MT-Ko</i>	<i>WT-C</i>	<i>MT-C</i>	<i>WT-F</i>	<i>MT-F</i>
<i>intrazelluläre Oleat-Menge</i>	1510.6	1542.9	1520.9	1667.4	1957.5	1578.9
<i>CO₂</i>	91.2	104.4	103.1	108.5	112.6	134.7
<i>gesamte Oleat-Aufnahme (± SEM)</i>	1601.8 ± 209	1647.2 ± 122	1624.0 ± 99	1775.8 ± 137	2070.1 ± 255	1652.6 ± 99
<i>Oxidationsrate (%)</i>	5.7	6.3	6.3	6.1	5.4	8.2
<i>n</i>	3	5	6	6	6	6
<i>p</i>	n.s.		n.s.		n.s.	

3.5 β -Oxidation in isolierten BAT-Mitochondrien

Die β -Oxidationskapazität von isolierten BAT-Mitochondrien aus Wildtyp- und Mutantenhamstern wurde durch Messung des Sauerstoffverbrauchs mit einer Clark-Elektrode ermittelt. Drei Wildtyphamster und fünf Mutanten wurden sieben Tage bei 5°C kaltakklimatisiert und anschließend die Mitochondrien des BAT präpariert.

Es wurden drei verschiedene Messreihen durchgeführt.

3.5.1 Glycerol-3-Phosphat-Atmung (Messung I)

Die maximale Atmung von Mutanten- und Wildtypmitochondrien wurde zum einen mit (20 mM) Glycerol-3-Phosphat als Substrat ermittelt. Vorab wurde der Komplex I der Atmungskette durch Rotenon inhibiert, um die Zufuhr von Elektronen durch endogenes NADH zu verhindern. Die Wildtypmitochondrien erreichen mit Glycerol-3-Phosphat als Substrat einen Sauerstoffverbrauch von $84.8 \pm 5.7 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ die Mutantenmitochondrien verbrauchen durchschnittlich $75.7 \pm 8.6 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$. Die Mittelwerte sind nicht signifikant verschieden (Abb. 36). Durch Zugabe von (3 mM) GDP wurde UCP1 inhibiert und die Rate der gekoppelten Atmung ermittelt. Bei den Wildtypmitochondrien wird die Atmung nicht signifikant ($p=0.52$) auf einen O_2 -Verbrauch von $66.1 \pm 4.6 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ reduziert. Der Anteil der UCP1 unabhängigen Atmung ist bei den Mutanten mit $60.1 \pm 2.8 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ vergleichbar ($p=0.51$). Für die Messung der β -Oxidationskapazität wurde den Mitochondrien 40 μM Palmitoyl-Carnitin als Fettsäuresubstrat angeboten. Um auszuschließen, dass an Carnitin gebundenes Palmitat UCP1 aktivieren kann, wurde zu den GDP gekoppelten Mitochondrien zusätzlich Palmitoyl-Carnitin gegeben. Die Nutzung als Substrat war durch die Rotenoninhibition des Komplex I auszuschließen. Palmitoyl-Carnitin bewirkt keinen signifikanten Anstieg in der Atmungsrate von Wildtypen ($77.1 \pm 10.6 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$) und Mutanten ($69.8 \pm 8.4 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$). UCP1 wird demnach nicht durch Palmitoyl-Carnitin aktiviert. Nach Zugabe von freiem Palmitat erfolgt nur bei den Mutantenmitochondrien ein signifikanter Anstieg des Sauerstoffverbrauchs um durchschnittlich $34 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ gegenüber der GDP gekoppelten der Atmung.

Die maximale Atmung der Mitochondrien wurde durch Zugabe von FCCP induziert. Der maximale Sauerstoffverbrauch von Wildtypmitochondrien liegt bei

$103.3 \pm 15.3 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ und bei den Mutanten bei $115.7 \pm 14.5 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Auch die maximal entkoppelte Atmung unterscheidet sich demnach nicht zwischen beiden Phänotypen.

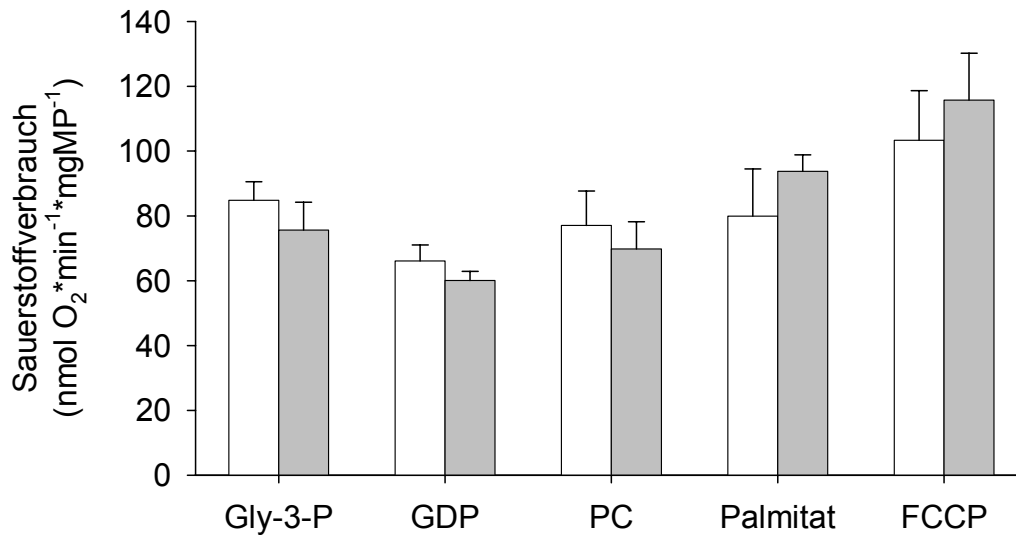


Abb. 36: Mittelwerte (\pm SEM) des Sauerstoffverbrauchs von isolierten BAT-Mitochondrien von Wildtypmäußern (weiße Balken, $n=3$) und Mutanten (graue Balken, $n=5$) nach sukzessiver Zugabe von Glycerol-3-Phosphat (Gly-3-P), GDP, Palmitoyl-Carnitin (PC), Palmitat und FCCP. Die Messungen erfolgten in Anwesenheit von Rotenon.

3.5.2 Relative Atmungsraten Messung I

Betrachtet man den relativen Sauerstoffverbrauch, bezogen auf die maximal entkoppelte Atmung nach FCCP-Zugabe, so kann man feststellen, dass die Mitochondrien der Mutanten mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat als Substrat 70.3 ± 4.2 % der maximalen Atmung erreichen und die Wildtypen 83.7 ± 6.6 % (Abb. 37). Nach Zugabe von GDP beträgt die Atmung der Wildtypmitochondrien noch rund 65 % und die der Mutanten 57 %. Die Reduktion der basalen Atmung nach GDP-Zugabe ist allerdings nicht signifikant. Durch Palmitoyl-Carnitin ist keine Änderung der relativen Atmungsrate festzustellen. Palmitat bewirkt nur bei den Mutanten einen signifikanten Anstieg der GDP-gekoppelten Atmung von 57 % auf 79.3 %.

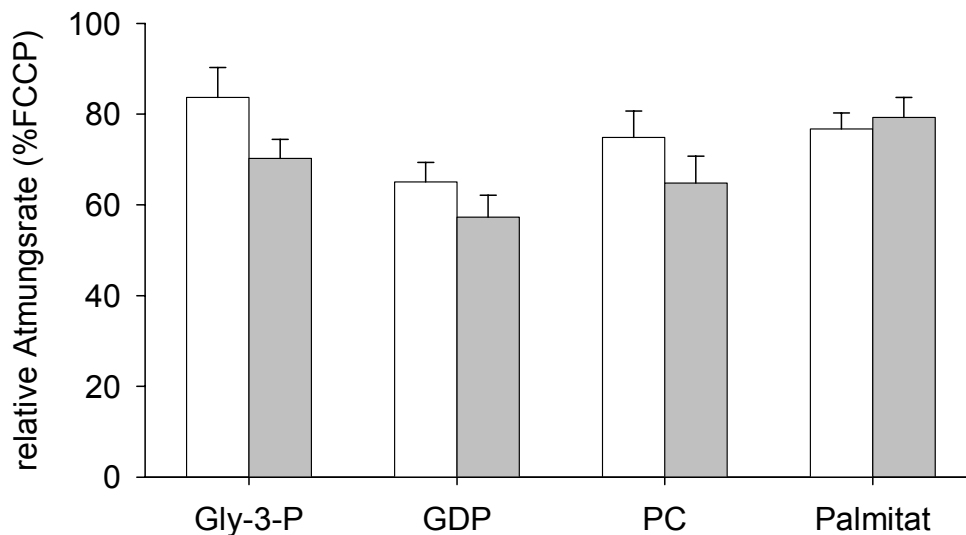


Abb. 37: Mittelwerte (\pm SEM) der relativen Atmungsraten von isolierten BAT-Mitochondrien von Wildtypmäußen (weiße Balken, $n=3$) und Mutanten (graue Balken, $n=5$), nach sukzessiver Zugabe von Glycerol-3-Phosphat (Gly-3-P), GDP, Palmitoyl-Carnitin (PC), Palmitat und FCCP. Die Messungen erfolgten in Anwesenheit von Rotenon. Die relative Atmungsrate zeigt den prozentualen Anteil der Atmung bei verschiedenen Substraten und Inhibitoren, an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %).

3.5.3 Fettsäureatmung (Messung II)

Wird den Mitochondrien (40 μ M) Palmitoyl-Carnitin als Substrat angeboten, erreichen Wildtypen Atmungsraten von 78.2 ± 9.3 nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ und Mutanten 69.7 ± 1.5 nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ (Abb. 38). Der Sauerstoffverbrauch ist damit bei beiden Phänotypen vergleichbar mit der durch *sn*-Glycerol-3-Phosphat erreichte Atmung (Messung I). Die UCP1 unabhängige Atmung nach GDP-Zugabe unterscheidet sich ebenfalls nicht zwischen den beiden Phänotypen. Die Reduktion ist allerdings stärker als bei der *sn*-Glycerol-3-Phosphat-Atmung. Die Wildtypen haben nur noch einen durchschnittlichen O_2 -Verbrauch von 28.6 ± 8.0 nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$, die Mitochondrien ohne UCP3 haben eine Atmungsrate von 25.6 ± 3.8 nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$. Eine fettsäureinduzierte, entkoppelte Atmung nach Palmitatgabe kann bei beiden Mitochondrientypen nicht festgestellt werden. Nach Zugabe von FCCP und *sn*-Glycerol-3-Phosphat erreichen die Mitochondrien wieder ihren maximalen Sauerstoffverbrauch. Dieser beträgt bei den Wildtypen 109.9 ± 17.2 nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$ und 103.4 ± 7.0 nmol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ bei den Mutanten. Die Atmungsraten sind vergleichbar mit dem in Messung I ermittelten maximalen O_2 -Verbrauchsrate.

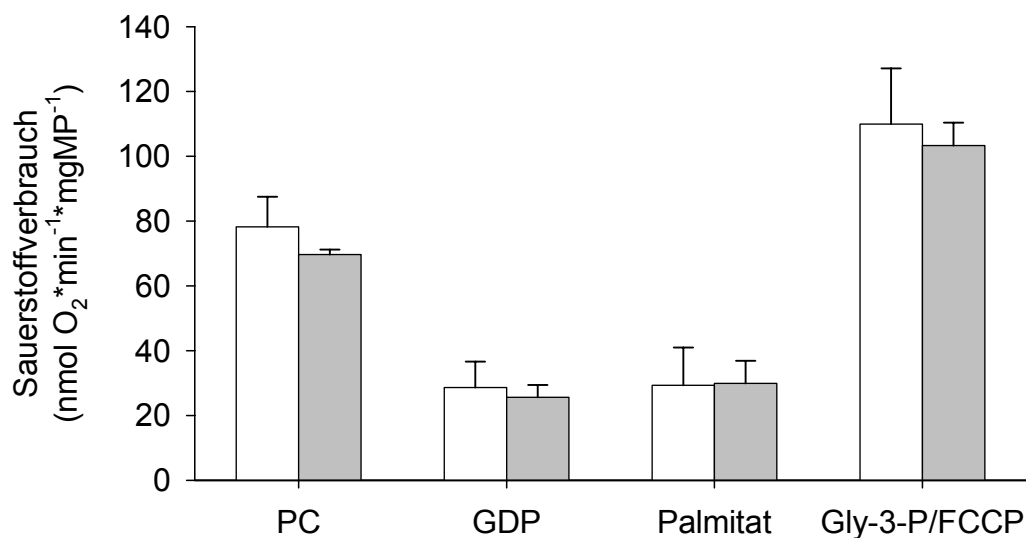


Abb. 38: Mittelwerte (\pm SEM) des Sauerstoffverbrauchs von isolierten BAT-Mitochondrien von Wildtypmännern (weiße Balken, n=3) und Mutanten (graue Balken, n=5) nach sukzessiver Zugabe von Palmitoyl-Carnitin (PC), GDP, Palmitat und Glycerol-3-Phosphat/FCCP.

3.5.4 Relative Atmungsraten Messung II

Um die relative Atmungskapazität der verschiedenen Messreihen vergleichen zu können, wurden die O₂-Raten auf den maximalen O₂-Verbrauch in Anwesenheit von FCCP mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat als Substrat bezogen. Werden den Mitochondrien Fettsäuren in Form von Palmitoyl-Carnitin als Substrat angeboten, so erreichen die der Wildtypen 78.9 ± 7.4 % und die der Mutanten 70.0 ± 5.2 % der maximalen Atmung (Abb. 39). Die Mitochondrien von Wildtypen und Mutanten erreichen mit Fettsäuren oder Glycerol-3-Phosphat als Substrat vergleichbare maximale Atmungsraten (Abb. 37 39).

Wird UCP1 durch GDP inhibiert, reduziert sich die relative Atmung bei den Wildtypen auf 30.0 ± 3.5 % und bei den Mutanten auf 25.0 ± 2.7 %. Durch Palmitat wird keine Änderung in der Atmung bewirkt.

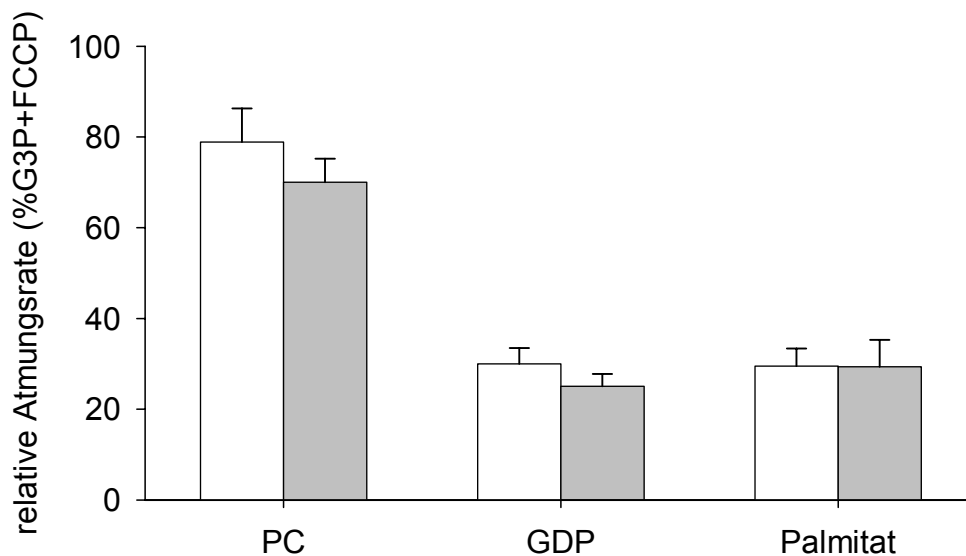


Abb. 39: Mittelwerte (\pm SEM) der relativen Atmungsraten von isolierten BAT-Mitochondrien von Wildtypmammern (weiße Balken, $n=3$) und Mutanten (graue Balken, $n=5$), nach sukzessiver Zugabe von Palmitoyl-Carnitin (PC), GDP und Palmitat. Die relative Atmungsrate zeigt den prozentualen Anteil der Atmung bei verschiedenen Substraten und Inhibitoren, an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP mit Glycerol-3-Phosphat als Substrat (=100 %).

3.5.5 O_2 -Verbrauch bei unterschiedlichen Fettsäurekonzentrationen (Messung III)

In einer weiteren Messreihe wurde geprüft, ob bei einer Konzentration von 40 μM Palmitoyl-Carnitin bereits die maximale Fettsäureatmung erreicht wird. In der Messung wurde die Atmung bei einer Palmitoyl-Carnitin Konzentration von 20 μM und nach Erhöhung auf 60 μM ermittelt. Vergleicht man O_2 -Verbrauch der Mitochondrien bei den beiden Konzentrationen, so sind keine signifikanten Änderungen feststellbar. Die Wildtypmitochondrien verbrauchen bei einer Fettsäurekonzentration von 20 μM $68.6 \pm 5.7 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$, die Mutantenmitochondrien $52.4 \pm 6.3 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$, der Unterschied zwischen beiden Phänotypen ist nicht signifikant (Abb. 40). Wird die Palmitat Konzentration auf 60 μM erhöht, wird die Atmung der Mitochondrien beider Phänotypen nicht weiter gesteigert (Wildtypen $56.8 \pm 13.6 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$, Mutanten $54.7 \pm 7.8 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$). Die bei 20, 40 und 60 μM Palmitoyl-Carnitin gemessenen O_2 -Verbrauchsraten sind vergleichbar, zwischen beiden Phänotypen gibt es keine signifikanten Unterschiede. Wird UCP1 mit GDP inhibiert, verbrauchen die Wildtypmitochondrien noch $19.2 \pm 8.2 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$, die Mutantenmitochondrien noch $21.5 \pm 4.3 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$. Wird der Komplex I der Atmungskette anschließend durch Rotenon inhibiert, wird die Atmung fast vollständig eingestellt. Nach Zugabe von sn-Glycerol-3-Phosphat beginnen die Mitochondrien wieder zu atmen. Die Wildtypmitochondrien erreichen einen O_2 -Verbrauch von $64.0 \pm 5.5 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$, die Mutanten veratmen durchschnittlich $66.6 \pm 5.0 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgMP}^{-1}$. Der gemessene O_2 -Verbrauch entspricht der in Messung I ermittelten UCP1 unabhängigen Atmung in Anwesenheit von GDP. Man kann also feststellen, dass die Effizienz der UCP1-Inhibition durch GDP mit Palmitoyl-Carnitin als Substrat effizienter ist als bei Glycerol-3-Phosphat.

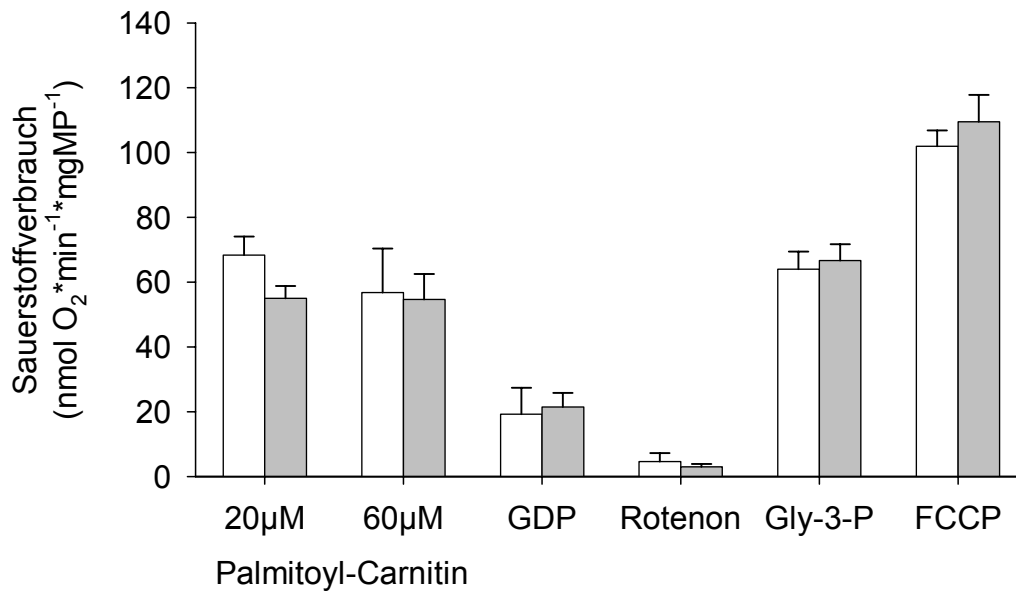


Abb. 40: Mittelwerte (\pm SEM) des Sauerstoffverbrauchs von isolierten BAT-Mitochondrien von Wildtypmäußen (weiße Balken, $n=3$) und Mutanten (graue Balken, $n=5$) nach sukzessiver Zugabe von 20 und 60 μM Palmitoyl-Carnitin, GDP, Rotenon, Glycerol-3-Phosphat (Gly-3-P) und FCCP.

3.5.6 Relative Atmungsraten Messung III

Bei einer Palmitoyl-Carnitin Konzentration von 20 μM werden von Wildtypmitochondrien durchschnittlich $68.6 \pm 7.7\%$ der maximalen Atmung erreicht und von Mutantenmitochondrien etwa $52.4 \pm 6.3\%$, der Unterschied ist nicht signifikant (Abb. 41). Die relative Atmung steigt bei der höheren Substratkonzentration von 60 μM bei beiden Phänotypen nicht an.

Der nach GDP-Zugabe gemessene, von UCP1 unabhängige O₂-Verbrauch, beträgt bei einer Substratkonzentration von 60 μM Palmitat durchschnittlich 20 % des maximalen O₂-Verbrauchs. Durch Rotenongabe kommt die Atmung der Mitochondrien fast vollständig zum Erliegen. Bekommen die Mitochondrien anschließend *sn*-Glycerol-3-Phosphat angeboten, wird von den Wildtypen $63.1 \pm 4.6\%$ und von den Mutanten $61.5 \pm 1.7\%$ des maximalen O₂-Verbrauchs erreicht. Diese relativen Atmungsraten entsprechen den in Messung I ermittelten Raten in Anwesenheit von GDP, Rotenon und Glycerol-3-Posphat.

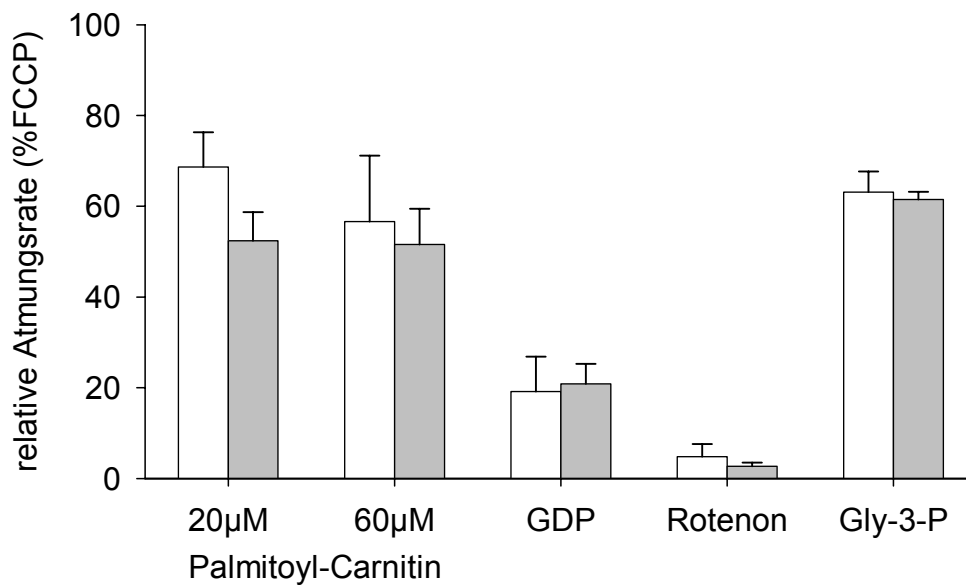


Abb. 41: Mittelwerte (\pm SEM) der relativen Atmungsraten von isolierten BAT-Mitochondrien von Wildtyphamstern (weiße Balken, n=3) und Mutanten (graue Balken, n=5) nach sukzessiver Zugabe von 20 μ M und 60 μ M Palmitoyl-Carnitin, GDP, Rotenon, Glycerol-3-Phosphat (Gly-3-P) und FCCP. Die relative Atmungsrate zeigt den prozentualen Anteil der Atmung bei verschiedenen Substraten und Inhibitoren, an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %).

4 DISKUSSION

4.1 Analyse der Entkopplerfunktion von *mUCP1*, *mUCP2*, *mUCP3*, *dmeUCPx* und *mSOUP*

Die Entkopplerproteine wurden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zum UCP1, der gleichen Proteinfamilie zugeordnet. UCP2 und UCP3 besitzen mit ~59 % bzw. ~57 % die größte Sequenzähnlichkeit zum UCP1 (Ricquier and Bouillaud, 2000). Aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit zum UCP1 ist auch für UCP2 und UCP3 eine Protonentransportfunktion denkbar. Die Bedeutung von UCP2 und UCP3 als Protonentransporter wurde bislang nach Expression und Rekonstitution in heterologen Systemen, in eukaryotischen Zellen und nach transgener Überexpression untersucht. Eine erhöhte Protonendurchlässigkeit der Membran nach Überexpression der UCP1 Homologen konnte in diesen Testsystemen mehrfach gezeigt werden (Garcia-Martinez et al., 2001; Zhang et al., 1999). Vorteil der Analyse der Proteinfunktion nach z.B. Rekonstitution in Proteoliposomen besteht darin, dass die Funktion unabhängig von der komplexen Umgebung der Mitochondrien analysiert werden kann. Der Nachteil der Proteinfunktionsanalyse in einem heterologen System besteht allerdings darin, dass aufgrund der künstlichen Bedingungen meistens nur unzureichend Aufschluss über die tatsächliche physiologische Bedeutung des Proteins in der Zelle gewonnen werden kann. Es ist daher sinnvoll, die physiologische Funktion eines eukaryotischen Proteins in einem eukaryotischen Zellsystem zu testen.

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293-Zellen zur Analyse der Entkopplerfunktion von *mUCP1*, *mUCP2*, *mUCP3* und *dmeUCPx* verwendet, da diese Zelllinie eine hohe Transfektionseffizienz besitzt und keine endogene UCP-Expression erfolgt. In differenzierten Nierenzellen ist UCP2 zwar vorhanden, in der Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen konnte mittels Western-Blots allerdings keine Expression von UCP2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Neben einer mögliche Entkopplerfunktion von *mUCP2*, *mUCP3*, *dmeUCPx*, wurde auch der Einfluss von *mSOUP*, einem potentiellen Regulator der UCP vermittelten Entkopplung nach transienter Expressiom in HEK293-Zellen analysiert. Die fettsäureinduzierte, entkoppelnde Wirkung der Proteine wurde durch Messung des Sauerstoffverbrauchs überprüft.

4.1.1 Einfluss des UCP1-Proteingehalts auf die Zellatmung

Es wurde zunächst überprüft, ob die HEK293-Zellen als Testsystem zum Nachweis einer Entkopplerfunktion der UCPs geeignet sind. Dafür wurden Zellen mit mUCP1 transfiziert und seine Aktivität mittels Sauerstoffverbrauchsmessungen geprüft. Es sollte damit sichergestellt werden, dass die Zellen UCP1 bzw. mitochondriale Transport-Proteine exprimieren können, und dass die Proteine funktionsfähig in die Mitochondrienmembran inseriert werden.

Der UCP1-Proteingehalt in den Zellen wurde durch zwei verschiedene DNA-Inkubationszeiten während der Transfektion variiert und anschließend der basale Sauerstoffverbrauch, die oligomycininsensitive und die entkoppelte Atmung der Zellen nach Palmitatzugabe gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die UCP1-Proteinkonzentration abhängig von der Inkubationszeit mit der Plasmid-DNA ändert. Der UCP1-Proteingehalt in Zellen die 16 h inkubiert wurden, war deutlich höher als nach 6 h Inkubation (Abb. 6).

Die unterschiedlich hohen UCP1-Konzentrationen haben auch die Atmungseigenschaften der Zellen verschieden beeinflusst. Die absoluten, basalen Atmungsraten der Kontroll- und transfizierten Zellen in beiden Gruppen mit Glucose als Substrat unterschieden sich nicht signifikant. Allerdings war der relative basale Sauerstoffverbrauch der Zellen mit hohem UCP1-Gehalt, das heißt, bei Bezug der basalen Raten auf die maximale Atmung in Anwesenheit von FCCP, signifikant erhöht (Abb. 7/ 8). Die maximale Entkopplung durch FCCP wurde als Referenzwert für die eingesetzte Zellzahl verwendet. Dem wurde vorausgesetzt, dass die maximale Atmungskapazität der Zellen nicht von den Entkopplerproteinen beeinflusst wird.

Da sich die FCCP-Raten von Kontroll- und transfizierten Zellen mit 6 h Inkubation nicht wesentlich unterscheiden kann angenommen werden, dass vergleichbare Mengen an Zellen in den Messungen eingesetzt wurden. Bei den 16 h transfizierten Zellen konnte nach Angleichen der basalen Atmungsrate an die FCCP-Rate allerdings ein signifikante, etwa ~10 % höhere Atmung der UCP1 transfizierten Zellen, gegenüber den Kontrollzellen festgestellt werden. Die Atmung der UCP1-Zellen war demnach nicht vollständig gekoppelt.

Der Anteil der UCP1-vermittelten Entkopplung an der basalen Atmung, kann nach Kopplung von UCP1 durch Purinnucleotide, wie ATP, ADP, GTP und GDP ermittelt werden. In Experimenten an isoliert Mitochondrien aus Geweben, sowie in Hefemitochondrien und

Proteoliposomen mit rekonstituiertem UCP1 konnte diese Inhibition *in vitro* gezeigt werden (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2002).

Da die Zellmembran für Purinnucleotide nicht permeabel bzw. kein Transportsystem vorhanden ist, war bei den hier durchgeführten Messungen keine Kopplung des transient exprimierten UCP1 in den HEK293-Zellen durch Zugabe von exogenem GDP möglich. Es ist allerdings denkbar, dass eine Kopplung von UCP1 durch das endogen vorhandene ADP bzw. ATP in den HEK293-Zellen erfolgt ist. Da die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung in Nierenzellen deutlich höher als im BAT ist, ist vermutlich auch eine vergleichsweise hohe Konzentration an freiem ATP in den Zellen vorhanden. Der Anteil der an die ATP-Synthese gekoppelten Atmung in HEK293-Zellen, gemessen nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin, beträgt 70-75 % des basalen Sauerstoffverbrauchs. In BAT-Mitochondrien kann nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin hingegen keine Abnahme in der Atmung beobachtet werden (Liebig, 2000; Liebig et al., 2004). Das BAT besitzt demnach eine niedrigere Phosphorylierungsrate bzw. eine geringe Menge an ATP-Synthase, was auf einen relativ niedrigen ADP/ATP-Gehalt schließen lässt. Die niedrige Phosphorylierungskapazität des BAT kann mit seiner Funktion begründet werden, Energie als Wärme frei zu setzen und nicht in Form von ATP zu speichern. Wie mehrfach gezeigt werden konnte ist die Sensitivität von UCP1 für Purinnucleotide hoch, was ebenfalls auf eine verhältnismäßig niedrige Purinnucleotidkonzentration im BAT schließen lässt; (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2002).

Interessanterweise ist die Kapazität der Nucleotidbindung des UCP1 *in vivo* im BAT von Nagern nicht konstant, sondern erhöht sich spontan bei Kälteexposition (Klingenberg and Huang, 1999; Wiesinger, 1989). Der relativ rasche Anstieg der GDP-Bindungskapazität infolge einer akuten Temperaturerniedrigung wird nicht auf eine *de novo* UCP1 Proteinsynthese zurück geführt, sondern erfolgt offensichtlich durch eine „Demaskierung“ von Nucleotidbindungsstellen des bereits vorhandenen UCP1 (Klingenberg and Huang, 1999). Der Mechanismus der als „*demasking*“ bzw. „*masking*“ bezeichneten Beobachtungen ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Vermutungen, dass durch Konformationsänderungen des Proteins oder Dimerisierung vermehrt GDP-Bindungsstellen auftreten (Wiesinger, 1989), auch eine durch ATP-Bindung erfolgende Maskierung von GDP-Bindungsstellen wird diskutiert (Klingenberg and Huang, 1999). Eine Maskierung oder Demaskierung von rekonstituiertem oder transient exprimiertem UCP1 wurde bislang nicht beschrieben.

Ob UCP1 eine höhere Sensitivität für Di- oder Trinucleotide besitzt ist bisher auch nicht eindeutig nachgewiesen worden (Jaburek et al., 1999; Echtay et al., 2002).

Nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin kommt es in der Zelle zu einem Anstieg des intrazellulären ADP-Spiegels. Da beide Gruppen der UCP1 transfizierten Zellen in der vorliegenden Arbeit, in Anwesenheit von Oligomycin signifikant weniger gekoppelt sind als die Kontrollzellen, ist eine effiziente Kopplung durch ADP allerdings fraglich.

Als Aktivator für UCP1 wirken freie Fettsäuren, da dem Messmedium aber keine freien Fettsäuren zugegeben wurden, könnte die Aktivität von UCP1 höchstens durch endogen in den Zellen vorhandene Fettsäuren induziert worden sein.

Es ist allerdings eher anzunehmen, dass die erhöhte Atmung auf eine nicht regulierte Entkopplung zurückzuführen ist. Ursache für die erhöhte entkoppelte Atmung bei den UCP1 transfizierten Zellen in Anwesenheit von Oligomycin könnten nicht funktionsfähige, fehlerhaft gefaltete oder falsch in die Mitochondrienmembran inkorporierte Proteine sein. Dass eine Entkopplung offensichtlich durch defekte Proteine induziert werden kann, wurde aus Analysen der entkoppelnden Wirkung von transient exprimiertem UCP1 in Hefemitochondrien geschlossen (Stuart et al., 2001). Bei einer hohen UCP1-Expression war keine vollständige Kopplung der mitochondrialen Atmung durch GDP möglich. Es wurde daraus gefolgert, dass infolge der hohen UCP1-Expression ein zweites Protonen-Leck entstanden ist, welches durch falsch in die Mitochondrienmembran inkorporierte Proteine erzeugt wurde. Eine Inhibition der „defekten“ UCP1-Proteine mit GDP war offenbar nicht möglich und führte zu einer nicht regulierten Entkopplung.

Demnach könnte man vermuten, dass bei den hier transfizierten HEK293-Zellen, das funktionsfähige UCP1 möglicherweise doch durch ADP oder ATP gekoppelt wurde.

Es ist anzunehmen, dass in den HEK293-Zellen mit geringem UCP1-Gehalt der Anteil an defektem UCP1 geringer ist, als in den Zellen mit hohem Protein-Gehalt, in denen bereits der relative basale O₂-Verbrauch signifikant höherer war. Ob die erhöhte oligomycininsensitive Atmung in den UCP1-Zellen tatsächlich auf defekte Proteine zurückzuführen ist, oder ob nur eine unzureichende Kopplung von UCP1 durch endogenes ADP bzw. eine Entkopplung durch Fettsäuren erfolgte, kann an dieser Stelle aber nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden.

Durch Zugabe von Palmitat kommt es bei den UCP1 transfizierten Zellen zu einem signifikanten Anstieg in der Atmung. Das bedeutet, dass auch funktionell intaktes UCP1 in den HEK293-Zellen exprimiert wurde, da eine Aktivierung der Entkopplung durch Fettsäuren möglich war. Die Kontrollzellen zeigten keinen Anstieg im Sauerstoffverbrauch nach

Fettsäurezugabe, demnach ist die Entkopplung tatsächlich auf UCP1 zurückzuführen. Der absolute O_2 -Verbrauch stieg bei den Zellen mit wenig UCP1 um etwa $10 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$, bei den Zellen mit viel UCP1 nur um rund $6.5 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$. Der Anstieg der relativen Atmung beträgt allerdings in beiden Gruppen 15 % gegenüber der oligomycininsensitiven Atmung. Die Menge an funktionsfähigem UCP1 war demnach, trotz unterschiedlich hohem Gesamtproteingehalt in beiden Gruppen etwa vergleichbar. Damit wird wiederum die Annahme gestützt, dass bei einer hohen Expressionsrate von UCP1 entweder vermehrt defekte Proteine synthetisiert und in die Mitochondrienmembran inkorporiert werden, oder zumindest keine optimale Regulation der Proteinaktivität bzw. Kopplung erfolgen kann.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich feststellen, dass embryonale Nierenzellen als Testsystem für die Analyse einer fettsäurevermittelten Entkopplung der UCPs bedingt geeignet sind. Bei der Analyse der Sauerstoffraten muss berücksichtigt werden, dass besonders bei hohem Expressionslevel die Möglichkeit einer nicht regulierten, entkoppelten Atmung durch defekte Proteine besteht. Zudem muss bei der Analyse und Bewertung der Ergebnisse bedacht werden, dass die Vorgänge innerhalb der Zelle nur bedingt kontrollierbar bzw. messbar sind.

4.1.2 Atmungseigenschaften von mUCP2 und mUCP3 transfizierten Zellen

Die Überexpression von UCP2 und UCP3 in heterologen Systemen wie Hefemitochondrien und Proteoliposomen bewirkt nachweislich eine erhöhte Protonendurchlässigkeit der Membran (Jaburek et al., 1999; Zhang et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde (Maus-) UCP2 und UCP3 in eukaryotischen Nierenzellen exprimiert und ihre entkoppelnde Wirkung auf die mitochondriale Atmung getestet.

Die Expression und Inkorporation von UCP3 in die Mitochondrien von HEK293-Zellen konnte durch Western Blot Analyse von isolierten Mitochondrien bestätigt werden (Abb. 9). Endogenes UCP3 konnte, wie erwartet, nicht nachgewiesen werden. Für den Nachweis der UCP2-Expression stand derzeit kein Antikörper zur Verfügung. Da die Zellen allerdings mit GFP-kotransfiziert wurden (vergl. 2.3), konnte eine erfolgreiche Transfektion anhand der Anzahl von grün-fluoreszierenden Zellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Messung der Sauerstoffverbrauchsdaten von Kontroll-, sowie von mUCP2 und mUCP3 transfizierten Zellen ergab keine Unterschiede zwischen den drei Zelltypen (Abb. 10/11). Die basale und oligomycininsensitive Atmung wurde durch mUCP2 und mUCP3 nicht beeinflusst. Die Expression der beiden UCPs bewirkte also keine, wie bei UCP1 beobachtete Entkopplung der Atmung. Der Gehalt an UCP2- und UCP3-Protein in den Zellen wurde nicht quantitativ untersucht, es kann daher nicht gesagt werden, ob die Proteine überexprimiert wurden oder ob die Expressionslevel physiologischen Mengen entsprechen. Es kann aber festgestellt werden, dass offenbar keine unregulierte Entkopplung durch defekte UCP2 und UCP3 Proteine erfolgt ist, wie bei den UCP1 transfizierten Zellen nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin beobachtet werden konnte.

Nach adenoviralen Überexpression von UCP2 und UCP3 in den Mitochondrien von Insulinomazellen (INS), konnte zumindest bei den UCP2 transfizierten Zellen, eine signifikant erhöhte Atmung nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin festgestellt werden (Hong et al., 2001). Die Mitochondrien wurden demnach infolge der Überexpression entkoppelt. Eine Inhibition von UCP2 und UCP3 durch anschließende Zugabe von ADP war jedoch nicht möglich. Es ist anzunehmen, dass der erhöhte Sauerstoffverbrauch in den INS-Zellen auf eine nicht regulierte, entkoppelte Atmung zurückzuführen ist, wie z.B. für UCP1 transfizierten Hefen nachgewiesen wurde (Stuart et al., 2001). Offensichtlich kann eine Überexpression aller UCPs zu einer nicht regulierten, unphysiologischen Entkopplung führen. Die Expressionsrate von UCP2 und UCP3 in den HEK-293-Zellen war also möglicherweise moderat, wodurch keine unregulierte Entkopplung der Atmung stattfand.

Die fehlende entkoppelnde Wirkung könnte auch auf eine Inhibition durch endogenes ADP oder andere unbekannte inhibierende oder regulierende Faktoren zurückzuführen sein. Die Analyse mit rekonstituiertem UCP3 in Proteoliposomen hat Hinweise darauf gegeben, dass die Effizienz der Nucleotid-Inhibition von UCP3 mit ansteigender ATP/ADP-Ratio zunimmt (Echtay et al., 1999). Übertragen auf die transfizierten HEK293-Zellen würde das bedeuten, dass das transient exprimierte UCP3 nach Inhibition der ATP-Synthase aufgrund des ansteigenden ADP-Gehaltes gekoppelt wurde. Die beiden Proteine befanden sich also möglicherweise unter den gegebenen Bedingungen in einem inaktiven Zustand.

Eine Induktion einer Entkopplung von UCP2 und UCP3 in den HEK293-Zellen durch Palmitat war nicht möglich. Das bedeutet, dass die Regulation bzw. Aktivierung der beiden UCPs demnach nicht direkt über Fettsäuren erfolgt oder zumindest unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich war. Eine Protonentransportfunktion kann dennoch nicht

ausgeschlossen werden. In Muskelmitochondrien aus gefasteten Ratten konnte beispielsweise eine fettsäureabhängige Zunahme in der Protonendurchlässigkeit der Membran bei erhöhter Superoxidkonzentration festgestellt werden, während in Mitochondrien von Mäusen ohne UCP3 unter gleichen Bedingungen keine Entkopplung induziert wurde (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2002). Es wäre also denkbar, dass das transient exprimierte UCP3 nur in Anwesenheit von Superoxid eine fettsäureabhängige Entkopplung zeigt. Das Superoxid könnte also ein wichtiger, regulierender Kofaktor für die UCP2 und/ oder UCP3 vermittelte Entkopplung sein.

Man kann zusammenfassend sagen, dass die Expression von mUCP2 und mUCP3 in eukaryotischen Nierenzellen keine mit UCP1 vergleichbare Entkopplung der mitochondrialen Atmung bewirkt. Es kann vermutet werden, dass aufgrund einer moderaten Expressionsrate in den Zellen eine artifizielle, nicht regulierte Entkopplung ausgeblieben ist. Hinweise auf Änderungen im Membranpotential infolge der Expression konnten anhand der Sauerstoffverbrauchsraten der Zellen ebenfalls nicht festgestellt werden. Es konnte keine wie für UCP1 gezeigte Aktivierung der UCPs durch Fettsäuren bewirkt werden, womit Fettsäuren als alleinige (direkte) Aktivierungsfaktoren der Proteine offensichtlich keine Relevanz haben.

4.1.3 Einfluss von *dmeUCPx* und *mSOUP* auf die mitochondriale Atmung

In Zusammenarbeit mit der Firma Develogen in Göttingen, sollte in einem weiteren Experiment, eine entkoppelnde Wirkung von *dmeUCPx*, einem UCP4-Ortholog aus *Drosophila melanogaster* untersucht und mit der Aktivität von mUCP1 verglichen werden. Das UCP4 wird zwar auch zur Entkopplerprotein-Familie gezählt, stellt allerdings aufgrund der geringen Homologie zum UCP1 und den anderen UCPs nur ein entferntes Mitglied der Familie dar (Ricquier and Bouillaud, 2000).

Als weiteres sollte ein möglicherweise regulierender Einfluss von SOUP, einem mitochondrialen Folat-Transportprotein (MFT) (Titus and Moran, 2000), auf die *dmeUCPx* vermittelte Entkopplung geprüft werden. Grundlage für die Annahme, dass SOUP eine Bedeutung in der Regulation von *dmeUCPx* besitzt, lieferten Befunde aus Studien an transgenen Fliegen (*Drosophila melanogaster*), die von der Firma Develogen durchgeführt wurden (unveröffentlicht). Eine Überexpression von *dmeUCPx* in verschiedenen Geweben

der Fliegen führte zu einem letalen Phänotyp. Es wurde vermutet, dass eine Entkopplung der Mitochondrien nach massiver Überexpression des UCP1-paralogen *dmeUCPx* erfolgte und schließlich zum Zelltod führte. Es wurde daraufhin eine selektive Überexpression von *dmeUCPx* unter dem augenspezifischen Promotor *eye-less* von *Drosophila* induziert. Die Folge der Überexpression war die Zerstörung der Augen, die Fliegen waren aber lebensfähig. Diese *dmeUCPx* überexprimierenden Fliegen wurden anschließend mit transgenen Fliegen gekreuzt, die jeweils eines der Gene aus dem gesamten, vollständig bekannten Genpool von *Drosophila melanogaster* unter Kontrolle des *eye-less* Promotors exprimierten. Mit diesem Kreuzungsexperiment sollten Gene identifiziert werden, die den letalen oder pathologischen Effekt von *dmeUCPx* verhindern. Dabei wurde das Gen SOUP („suppressor“) als *rescue*-Gen für den offenbar durch *dmeUCPx* bewirkten, letalen Phänotypen entdeckt. Nach Koexpression von SOUP besaßen die Fliegen wieder gesunde Augen.

Um die Hypothesen zu bestätigen, dass *dmeUCPx* zum einen eine Entkopplung der Mitochondrien bewirkt und zum anderen SOUP als Regulator der entkoppelten Atmung fungiert, wurden die Atmungseigenschaften in *dmeUCPx*-, SOUP- und kotransfizierten HEK293-Zellen gemessen.

Für die Transfektion wurde die cDNA des Maus-Orthologs von *dmeSOUP* verwendet. Es konnte mittels Northern-Blots nachgewiesen werden, dass SOUP in der Maus ubiquitär exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Befunde über quantitative Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Geweben gibt es bislang nicht.

In den Transfektionsexperimenten in HEK293-Zellen wurde zunächst geprüft, ob *dmeUCPx* eine entkoppelnde Wirkung besitzt bzw. ob die Expression in HEK293-Zellen auch den beobachteten Zelltod zur Folge hat. Nach den Befunden in der Fliege hätte man vermuten können, dass eine (Über-) Expression von *dmeUCPx* in den HEK293-Zellen eine letale Wirkung hat. Nach der Transfektion konnte allerdings keine höhere Mortalität bei den *dmeUCPx*-Zellen beobachtet werden. Die nach Überexpression in *Drosophila* erhaltenen Befunde, konnten in den Nierenzellen nicht bestätigt werden. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs in *dmeUCPx* transfizierten Zellen widerlegte zudem die Vermutung, dass die Zellen durch *dmeUCPx* entkoppelt werden. Die oligomycininsensitive Atmung und der Sauerstoffverbrauch nach Fettsäurezugabe waren mit den Kontrollzellen vergleichbar (Abb. 12/ 14). Wie bereits für *mUCP2* und *mUCP3* festgestellt wurde, besitzt *dmeUCPx* also entweder keine Entkopplerfunktion oder eine Aktivierung konnte unter den gegebenen Bedingungen bzw. in diesem Zellsystem nicht erfolgen.

Der vermutete, regulierende Einfluss von mSOUP auf dmeUCP_x kann nach den Ergebnissen aus den O₂-Verbrauchsmessungen nach Koexpression der Proteine auch nicht bestätigt werden. Die Atmung in Anwesenheit von Oligomycin oder Palmitat wurde durch die exprimierten Gene nicht beeinflusst.

Um auszuschließen, dass Maus-SOUP und dmeUCP_x aus *Drosophila melanogaster* aufgrund der Spezies Unterschiede nicht interagieren konnten und daher keine Regulation erfolgte, wurde in einem weiteren Versuchsansatz eine mögliche inhibierende Wirkung von mSOUP auf die Entkopplung durch Maus-UCP1 nach Koexpression getestet. Die Messungen ergaben allerdings, dass weder die erhöhte oligomycininsensitive Atmung bei UCP1-Überexpression, noch die fettsäurevermittelte Entkopplung durch SOUP beeinflusst wurden. Auch die Expression von SOUP allein hatte keine Konsequenzen für die Zellatmung (Abb. 16).

Die bei den Kreuzungsexperimenten festgestellten Effekte der dmeUCP_x Überexpression, sowie des „rescues“ bei Koexpression von dmeUCP_x und SOUP konnte nach Expression der Proteine *in vitro* in einem eukaryotischen Zellsystem nicht nachgewiesen werden.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Funktion von SOUP als mitochondrialer Folat-Carrier noch nicht bekannt. Erst kurz darauf wurde das Protein als Folat-Carrier hMFT (*human mitochondrial folat transporter*) annotiert und charakterisiert (Titus and Moran, 2000).

Nach Aussage von Titus et al. (2000) besitzt SOUP/ hMTF die höchste Homologie zum Flavin-Nucleotid-Carrier in Hefen, allerdings auch eine deutliche Homologie zu dem ATP/ADP-Carrier und dem UCP1 von Säugern. Eine eigene Analyse der Verwandtschaftsgrade von SOUP und dem UCP1 ergab allerdings, dass SOUP phylogenetisch weiter entfernt ist von der UCP-Familie als der Oxoglutarat-Transporter, ein entferntes Mitglied der mitochondrialen Anion-Transporterfamilie, der als „Outgroup“ bei der Erstellung des UCP-Stammbaums eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Damit kann SOUP lediglich als eindeutiges Mitglied der mitochondrialen Transporterfamilie charakterisiert werden.

Die Bedeutung von SOUP für den zellulären oder mitochondrialen Stoffwechsel ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Folat, ein Vitamin der B₂-Gruppe dient in seiner reduzierten Form, dem Tetrahydrofolat, unter anderem als Coenzym in der Purinnucleotid-Biosynthese. Als Kofaktor von z.B. C₁-Transferasen katalysiert es die Übertragung von Methyl- und teilweise auch von Methylgruppen (Nelson und Cox, 2001). Der Folattransporter SOUP oder hMTF wurde als erstes (humanes) Protein charakterisiert, welches ein Vitamin über die innere

Mitochondrienmembran transportiert. Die Bedeutung des Transports besteht vermutlich darin, dass in den Mitochondrien synthetisierte Folat-Polyglutamat zu exportieren, um den Folatstoffwechsel im Cytosol von Säugerzellen zu unterstützen (Titus and Moran, 2000).

Warum und wie SOUP in den *dmeUCPx* überexprimierenden Augen bei *Drosophila melanogaster* eine offensichtliche Inhibition der unbekanntes *dmeUCPx* Aktivität bewirkte, kann anhand seiner Funktion als Folat-Transporter nicht direkt abgeleitet werden.

4.1.4 Fazit der Funktionsanalyse von *mUCP2*, *mUCP3*, *dmeUCPx* und *mSOUP*

Die in dieser Arbeit an HEK293-Zellen durchgeführten Messungen, sowie die Resultate aus Untersuchungen in anderen Systemen verdeutlichen, dass die Analyse einer Proteinfunktion in einem „fremden“ Zellsystem, egal ob homo- oder heterolog, nur eingeschränkt möglich ist bzw. nicht unbedingt Hinweise auf die physiologische Funktion des untersuchten Proteins gibt. Das Fehlen der Proteinaktivität kann durch das nicht vorhanden sein essentieller, (zell-) spezifischer Kofaktoren begründet sein.

Ein generelles Problem bei der Analyse der Funktion von mitochondrialen Transportproteinen besteht außerdem darin, dass bei massiver Überexpression offensichtlich viele der mitochondrialen Transportproteine eine Erniedrigung des Membranpotentials bzw. eine Entkopplung bewirken. Nicht nur für UCP2 und UCP3, sondern auch beim Oxoglutarat-Transporter konnte dieses gezeigt werden (Yu et al., 2001). Ob es sich dabei um ein methodisches Artefakt handelt oder ob tatsächlich eine physiologische Bedeutung des Protonentransports für den mitochondrialen Stoffwechsel besteht, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Für ein Artefakt spricht, dass ein regulierter Anstieg der UCP2 oder UCP3-Expression im Gewebe (*in vivo*) offensichtlich nicht immer mit einer erhöhten Entkopplung verbunden ist (Cadenas et al., 1999; Yu et al., 2001).

Das Ausschalten eines Gens (*knock out*) stellt eine mögliche Alternative zur Überexpression dar. Allerdings besteht dabei das Problem, dass möglicherweise durch alternative Mechanismen die fehlende Proteinaktivität kompensiert wird.

4.2 Genotypanalyse von Wildtyphamstern und Mutanten

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hamstermutanten exprimieren aufgrund einer bislang unbekanntem Mutation gewebespezifisch keine UCP3-mRNA im BAT (Abb. 18/ 19). Die Expression im Skelettmuskel ist weitgehend normal. Bislang konnten die Mutanten nur anhand einer Analyse der UCP3 mRNA-Expression im BAT *post mortem* phänotypisiert werden.

Das Fehlen von UCP3 kann entweder durch eine direkte Mutation im UCP3 Gen oder durch eine Mutation in einem anderen regulativen Gen verursacht sein. Es wäre beispielsweise möglich, dass das gewebespezifische *Splicing* der mRNA durch eine Mutation in einer BAT-spezifischen *Splice Site* betroffen ist. Dies würde letztlich zur Synthese einer funktionslosen mRNA führen, die infolgedessen rasch wieder abgebaut würde.

In einem Kooperationsprojekt mit dem IMB in Jena (2003) wurde begonnen die UCP3-Gen-Sequenz von Wildtypen und Mutanten zu analysieren. Zunächst wurden 7167 bp des gesamte 5'-Bereichs des Gens durchsequenziert. Dieser Bereich umfasst Exon 1 und Exon 2, sowie Intron 1. Bei der Sequenzierung wurden zwei Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs) im ersten Introns des UCP3-Gens entdeckt. Erste Analysen haben gezeigt, dass offenbar ein Zusammenhang des Genotyps bzw. der SNPs mit dem Phänotyp besteht. Demnach sind alle Tiere mit einem homozygoten Genotyp (A/A)//(G/G) (= SNP1//SNP2) phänotypisch Mutanten ohne UCP3-Expression im BAT. Tiere mit homozygotem (G/G)//(A/A)-Genotyp oder heterozygotem (A/G)//(G/A)-Genotyp exprimieren UCP3 im BAT.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der vermutete Zusammenhang des SNP2 mit dem Phänotyp, nach der Genotypanalyse der 34 Wildtypen und sechs Mutanten bestätigt werden. Bei allen Tieren die homozygot für das (A)-Allel oder heterozygot (A/G) waren, konnte UCP3 im BAT nachgewiesen werden. Hamster die homozygot (G/G) waren, exprimierten kein UCP3 im BAT.

Zudem hat die Analyse des SNP1 von 16 Tieren der Wildtypgruppe (n=34) und vier der Mutanten (n=6) gezeigt, dass wie vermutet wurde, offensichtlich eine Kopplung von SNP1 und SNP2 besteht. Das heißt, alle Tiere die homozygot ((A/A) oder (G/G)) bzw. heterozygot (A/G) für SNP2 waren, waren auch homozygot ((G/G) oder (A/A)) bzw. heterozygot (G/A) für SNP1.

Eine Analyse der UCP3 mRNA-Expression bei den verschiedenen Genotypen hat ergeben, dass es scheinbar keinen intermediären Phänotyp gibt. Die UCP3 mRNA-Spiegel der

Wildtypen mit heterozygotem Genotyp sind zwar tendenziell niedriger als bei den Homozygoten, der Unterschied ist aber nicht signifikant. (Abb. 22).

Ob die gefundenen Polymorphismen für die Fehlende UCP3-Expression im BAT der Mutanten direkt verantwortlich sind oder als polymorphe Marker mit der funktionell relevanten Mutation gekoppelt vererbt werden, gilt es jedoch noch zu klären.

Da die Mutation zu einem gewebespezifischen Verlust der UCP3 Expression führt ist anzunehmen, dass ein Defekt in einem regulativen Bereich z.B. im Promotor des UCP3 Gens vorliegt. Möglicherweise kann aufgrund der Mutation keine Bindung von Transkriptionsfaktoren oder anderen regulierenden Elementen erfolgen. Die Regulation des UCP3-Gens wird derzeit mittels Promotorstudien analysiert. Zudem werden verschiedene Kandidaten (Transkriptionsfaktoren) getestet, die als potentielle Regulatoren der UCP3-Promotoraktivität in Frage kommen.

Wie bereits bekannt ist, wird die unterschiedliche Regulation der UCP3-Expression in BAT und Skelettmuskel unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie (*peroxisome proliferator activated factor*) gesteuert (Kelly et al., 1998).

Untersuchungen in BAT-Primärzellkultur von Wildtypen und Mutanten haben ergeben, dass die PPAR-Agonisten Troglitazon (PPAR α) und Wy14.643 (PPAR γ) eine Induktion der UCP3 Expression in den Wildtypzellen bewirken, nicht aber in Zellen von Mutanten (Liebig et al., 2004). Die Expression von PPAR α oder PPAR γ im BAT von Mutanten konnte mittels Northern-Blots nachgewiesen werden, ein Fehlen der Faktoren ist demnach nicht Grund des UCP3 Defizits im BAT. Da PPARs unter anderem wichtige Regulationselemente des Fettsäurestoffwechsels sind, hätte ein Fehlen von diesen Transkriptionsfaktoren auch deutliche Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel und die Adipozytendifferenzierung gehabt und damit zu einem klaren Phänotyp geführt (Gervois et al., 2000). Die Tatsache, dass auch die Primärzellen der Mutanten nach PPAR-Zugabe kein UCP3 exprimieren zeigt, dass die Mutation offensichtlich intrinsisch für die BAT-Zellen ist. Das schließt nicht aus, dass die PPAR vermittelte Transkriptionskontrolle bei den Mutanten gestört ist.

Die vollständige Sequenzierung des UCP3-Gens von Wildtypen und Mutanten, sowie die derzeit laufenden Promotorstudien werden sicherlich einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Mutation bzw. der Ursache des gewebespezifischen UCP3 Defizits im BAT der Hamster liefern.

4.3 *Genexpressionsanalyse*

Eine Analyse der Expression von UCP1 und UCP3, sowie von Schlüsselenzymen des mitochondrialen Fettsäurestoffwechsels (MTE-I und CPT-I) und der SOD2, einem wichtigen Enzym zum Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies in Mitochondrien, wurde in Hamstern mit fehlender UCP3 Expression im BAT durchgeführt. Die Analyse sollte Hinweise erbringen, welche die postulierten Funktionen von UCP3 im Fettsäurestoffwechsel oder der Radikalabwehr unterstützen.

4.3.1 *UCP3 mRNA-Expression und Proteinspiegel*

Mittels Western- und Northern-Blot Analysen konnte bestätigt werden, dass die Mutanten weder das UCP3 Protein, noch die mRNA im BAT exprimieren. Auch Kälteexposition und Fasten haben keinen Einfluss.

Die UCP3 mRNA-Expression wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten Wildtyphamstern nach sieben Tagen Kälte nicht signifikant erhöht gegenüber Kontrolltieren. In einer anderen Expressionsstudie konnte hingegen bei Wildtyphamstern ein signifikanter Anstieg in der UCP3-Expression im braunen Fettgewebe nach Kälteexposition festgestellt werden (von Praun et al., 2001). Nach zwei Tagen Kälteexposition wurde die Expression um das dreifache erhöht, nach sieben Tagen erfolgte keine weitere Steigerung der Expression.

Betrachtet man allerdings die UCP3-Proteinlevel der Wildtyphamster aus der vorliegenden Arbeit, so kann ein durchschnittlich 2.8-fach höherer UCP3-Proteingehalt in den Mitochondrien von kälteexponierten Tieren festgestellt werden. Damit entsprechen die Proteinlevel in etwa der beschriebenen dreifachen Induktion der mRNA nach sieben Tagen Kälteexposition (von Praun et al., 2001). Wie hier gezeigt wurde, korrespondieren also RNA und Protein-Level in Geweben nicht generell miteinander. Bei einer Expressionsanalyse muss daher beachtet werden, dass die RNA-Daten keine eindeutige Aussage über die tatsächliche Proteinausstattung erlauben.

Bei der Western-Blot Analyse der BAT-Mitochondrien von Wildtyphamstern und Mutanten wurde UCP3 als ein etwa 33 kDA großes Protein detektiert, bei den Mutanten fehlte diese Proteinbande. Allerdings tauchten bei beiden Phänotypen zwei weitere, etwas kleinere Banden unterhalb von UCP3 auf. Die beiden Proteine unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Größe. Mit welchen Proteinen der Antikörper kreuzreagierte wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt. Es handelt sich aber offensichtlich nicht um eine Kreuzreaktion

mit UCP1 oder UCP2, da eine Detektion von UCP1 und UCP2 mit dem UCP3-Antikörper in Mitochondrien aus transfizierten HEK293-Zellen nicht möglich war.

Infolge von Fasten wird die Expression von UCP3 im BAT reduziert, wie die Proteinspiegel der 48 h gefasteten Hamstern zeigten (Abb. 20). Auch bei Ratten und Mäusen wird die UCP3-Expression im BAT nach Fasten nachweislich reduziert (Samec et al., 1998). Das Regulationsprofil von UCP3 lässt den Schluss zu, dass die UCP3-Expression abhängig von der Stoffwechselaktivität des Gewebes erfolgt. Bei erhöhter Stoffwechselaktivität in Kälte wird UCP3 induziert, bei reduzierter Aktivität im Fastenzustand wird die Expression herabreguliert. Diese Expressionsregulation im BAT unterstützt die Hypothese einer möglichen Bedeutung von UCP3 für die Regulation des Fettsäurestoffwechsels. Auch die mögliche Funktion in der Radikalabwehr könnte durch diese Befunde gestützt werden. Bei Kälte kommt es zu einem Anstieg im Fettsäure- und Glucosestoffwechsel im BAT (Wiesinger, 1989), was letztlich einen Anstieg im mitochondrialen Membranpotential zur Folge hat. Als Folge davon und der erhöhten Aktivität der Atmungskette, kann es zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen kommen (Petrosillo et al., 2001; Kokoszka et al., 2001).

Im Skelettmuskel war die UCP3 Expression bei Mutanten und Wildtypen vergleichbar. Damit wird noch einmal bestätigt, dass die Mutation nur die UCP3-Expression im BAT betrifft, und die Regulation der Expression in den beiden Geweben unabhängig erfolgt. Die gegenläufige Expressionsregulation von UCP3 im Skelettmuskel und BAT stützt wiederum die Vermutung eines möglicherweise funktionellen Zusammenhangs von UCP3 und dem Fettsäurestoffwechsel. Bei Fasten kommt es zu einer erhöhten Fettsäureoxidation im Muskel und zu einer Induktion von UCP3. Die Expression von UCP3 im *Biceps femoris* wurde nach 48 h Fasten bei Hamstern beider Phänotypen um etwa das dreifache gesteigert. Expressionsstudien in Mäusen haben ergeben, dass die Höhe der UCP3 Expression offensichtlich von der Muskelzusammensetzung abhängig ist. Dabei ist der Expressionsanstieg von UCP3 in glycolytischen Muskel bei Fasten vielfach höher als in oxidativen (Dulloo et al., 2001). Glycolytische und glycolytisch-oxidative Fasern, zu denen auch der *Biceps femoris* gehört, machen den Hauptanteil der Muskulatur aus (Samec et al., 1999). Der Anteil an oxidativen Muskeln an der gesamten Muskulatur ist hingegen gering. Die oxidativen Muskeln nutzen überwiegend Fettsäuren als Substrat, in glycolytischen wird

vermehrt Glucose verstoffwechselt. Generell besitzen die verschiedenen Muskeltypen allerdings die Möglichkeit, je nach Verfügbarkeit, beide Substrate zu oxidieren

Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Fettsäurespiegel bzw. der Fettsäureoxidationsrate und der Induktion der UCP3 Expression im Skelettmuskel (Gong et al., 1997; Samec et al., 1999). Die fettsäurevermittelte Regulation der Expression von UCP3 in verschiedenen Muskeltypen erfolgt offenbar über unterschiedliche Signalwege. Die Expression in oxidativen Fasern wird weitgehend durch den Fettsäuregehalt im Serum bestimmt, während in den glycolytischen und glycolytisch-oxidativen Muskeltypen die Expression durch den Fettsäureflux in die mitochondriale β -Oxidation induziert wird (Samec et al., 1999). Generell ist die Induktion von UCP3 in glycolytischen Muskeln stärker als in oxidativen, was damit zusammenhängen könnte, dass dieser Muskeltyp generell eine geringere Fettsäureoxidationskapazität besitzt. Wenn UCP3 eine Bedeutung im Fettsäurestoffwechsel zukommt, könnte die Expressionsinduktion beispielsweise eine Verbesserung der Fettsäureoxidationskapazität für diesen Muskeltyp bedeuten.

Die Abhängigkeit der UCP3-Expression von der Fettsäurestoffwechselaktivität im Gewebe wird durch die Tatsache gestützt, dass die UCP3-Expression im Skelettmuskel in Kälte, trotz erhöhtem peripheren Fettsäurespiegel nicht induziert wird, da dem Muskel offenbar ausreichend Glucose als Substrat zur Verfügung steht.

Man kann also festhalten, dass die unterschiedliche Regulation von UCP3 im BAT und Skelettmuskel angepasst an die Stoffwechselaktivität des Gewebes erfolgt. Bei einer Erhöhung des Fettsäurestoffwechsels im Gewebe wird die Expression von UCP3 offensichtlich induziert, was die Annahme einer Funktion von UCP3 im Fettsäurestoffwechsel unterstützen würde.

4.3.2 *MTE-I mRNA Expression*

Die mRNA-Expression der mitochondrialen Thioesterase (MTE-I), einem Protein des mitochondrialen Fettsäurestoffwechsels, wurde im BAT und Skelettmuskel von Wildtypen und Mutanten analysiert. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Koregulation der MTE-I- und UCP3-Expression erfolgt und ein funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Proteinen besteht (Clapham et al., 2001; Himms-Hagen and Harper, 2001).

Die MTE-I katalysiert die Hydrolyse von Acyl-CoA in den Mitochondrien. Welche physiologische Bedeutung diese Hydrolyse hat, ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich besteht die Aufgabe der MTE-I darin den endogenen Coenzym A-Pools zu regulieren. Man weiß, dass Coenzym A ein limitierender Faktor für den Citrat-Zyklus und die β -Oxidation darstellt (Rock et al., 2000). Bei erhöhtem Fettsäureimport und Oxidation in den Mitochondrien kann es zu einem Mangel an Coenzym A kommen, wenn dieses überwiegend an Acyl-Reste gebunden vorliegt. Durch Hydrolyse von Acyl-CoA könnte demnach Coenzym A bei akutem Mangel, für den Citrat-Zyklus und die β -Oxidation zur Verfügung gestellt werden.

Nach Himms-Hagen und Harper (2001) besteht der regulative und funktionelle Zusammenhang zwischen der MTE-I und UCP3 darin, dass mittels UCP3 die aus der MTE-I katalysierten Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren aus den Mitochondrien exportiert werden, da diese nicht über den β -Oxidationsweg abgebaut werden können (Abb. 2). Die Expressionsregulation der MTE-I und UCP3 unterstützen ihre mögliche funktionelle Bedeutung im Fettsäurekatabolismus. Bei Fasten erhöht sich der Fettsäurespiegel in den Muskelzellen und es kommt zur vermehrten Fettsäureoxidation, was schließlich zu einer verstärkten Expression von sowohl der MTE-I, als auch von UCP3 führt (Moreno et al., 2003). Auch im Skelettmuskel von Wildtypmäußen und Mutanten konnte ein 3.5- bis 4.6-facher Anstieg der MTE-I und eine etwa zweifache Steigerung der UCP3-Expression nach 48 h Futterentzug festgestellt werden.

Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang von UCP3 und der MTE lieferten auch Expressionsstudien an UCP3 überexprimierenden, transgenen Mäusen (UCP3tg). Da UCP3tg-Mäuse einen schlanken Phänotyp aufweisen wurde vermutet, dass diese Tiere vermehrt Fettsäureoxidation betreiben (Clapham et al., 2000). Die Analyse von verschiedenen, am Fettsäurestoffwechsel beteiligten Genen ergab, dass letztlich nur die Lipoprotein-Lipase, ein Protein welches die Fettsäureaufnahme in die Zelle reguliert (Braun and Severson, 1992), und vor allem die MTE-I Expression im Muskel der Mäuse mehrfach induziert wurden. Die

mögliche Koregulation von UCP3 und der MTE-I im Skelettmuskel konnte darüber hinaus anhand anderer Expressionsstudien an Mäusen und Ratten gestützt werden (Clapham et al., 2001; Moreno et al., 2003).

Allerdings stellt die hier durchgeführte Expressionsanalyse im BAT von Wildtyp- und Mutantenhamstern diesen postulierten direkten regulativen Zusammenhang von UCP3 und MTE-I in Frage. Wie die mRNA-Analysen gezeigt haben, wird die Expression der MTE-I nicht durch das Fehlen von UCP3 beeinflusst. Nur im BAT von Wildtypen erfolgte bei Kälteexposition eine Induktion von UCP3. Die MTE-I mRNA wurde allerdings bei beiden Phänotypen etwa zweifach erhöht. Bei Fasten wurde die MTE-I im BAT, wie auch im Skelettmuskel drei- bis vierfach erhöht exprimiert. Allerdings korreliert diese Induktion wiederum nicht mit dem UCP3-Proteingehalt, da bei Fasten eine Absenkung des UCP3-Proteingehaltes im BAT erfolgte. Außerdem haben Wildtypen und Mutanten ohne UCP3 vergleichbare MTE-I mRNA-Mengen.

Die Feststellung, dass im BAT keine Korrelation zwischen UCP3 und MTE-I besteht, konnte auch in db/db-Mäusen gemacht werden (Clapham et al., 2001). Die Mäuse sind aufgrund eines Defekts im Leptinrezeptor stark adipös und leiden unter Insulinresistenz. Diese Tiere befinden sich trotz hohem Serumglucosespiegel im Fastenzustand, da keine oder nur eine verminderte Glucoseaufnahme in die Zellen erfolgen kann. Wie auch in den gefasteten Hamstern beobachtet wurde, ist die Expression der MTE-I und UCP3 im Skelettmuskel dieser Tiere stark erhöht, im BAT ist nur die MTE-I signifikant induziert.

Da die MTE-I im BAT und Skelettmuskel von Hamstern infolge von Futterentzug verstärkt exprimiert wird und im BAT zudem eine Induktion in Kälte erfolgt, wird auch die MTE-I Expression offensichtlich abhängig vom Fettsäurestoffwechsel in den Geweben reguliert.

In Muskeln von gefasteten Tieren, findet aufgrund des sinkenden Glucosespiegels ein Wechsel von Glucose zur Fettsäureoxidation statt. Die Expression von MTE-I wird unter diesen Bedingungen deutlich erhöht. Bei Kälte erfolgt im Skelettmuskel hingegen keine MTE-I Induktion. Dies wäre damit zu erklären, dass die Fettsäurekonzentration im Serum bei Kälte zwar erhöht ist, aber anders als beim Fasten den glycolytischen und gemischten Muskeln ausreichend Glucose als Substrat zur Verfügung steht.

Das braune Fettgewebe nutzt in Kälte zwar sowohl Fettsäuren als auch Glucose als Substrat (Daikoku et al., 2000; Yu et al., 2002), die Fettsäureoxidationsrate wird in Kälte aber nachweislich erhöht, woraufhin es zu einer Induktion der MTE-I Expression kommt. Der Anstieg der MTE-I im BAT der Hamster infolge von Fasten war unerwartet, da die

Stoffwechselaktivität im BAT bei Fasten im allgemeinen herabreguliert wird (Nagashima et al., 1995). Allerdings wird die basale BAT-Aktivität aufgrund des Glucosemangels vermutlich durch Fettsäureoxidation aufrechterhalten.

Der Zusammenhang von MTE-I und der Fettsäureoxidationskapazität eines Gewebes wird auch daran deutlich, dass nicht nur nach Fasten, sondern bereits bei *ad libitum* gefütterten Hamstern ist die basale MTE-I Konzentration im BAT sehr viel höher als im Skelettmuskel (Abb. 26). Man kann also davon ausgehen, dass die MTE-I eine wichtige Funktion im mitochondrialen Fettsäurestoffwechsel besitzt und die Expressionsregulation abhängig von der Fettsäureoxidationsrate oder der Kapazität des Gewebes erfolgt.

Die Analyse der MTE-I- und UCP3-Expression in Wildtypmüshamstern und Mutanten hat gezeigt, dass keine gekoppelte Regulation der Expression im BAT und Skelettmuskel erfolgt und möglicherweise keine direkte funktionelle Kopplung zwischen beiden Proteinen besteht. Zum einen ist die MTE-I-Expression bei Mutanten ohne UCP3 nicht beeinflusst, zum anderen besteht im BAT eine gegenläufige Expression der MTE-I und UCP3 nach Fasten. Allerdings wäre eine Bestätigung der MTE-I Induktion durch eine quantitative Analyse des tatsächlichen Proteingehaltes wünschenswert.

Man kann jedoch feststellen, dass die Regulation der beiden Proteine offensichtlich abhängig vom Fettsäurestoffwechsel im Gewebe erfolgt. Damit ist eine Bedeutung beider Proteine im Fettsäurestoffwechsel anzunehmen.

4.3.3 CPT-I mRNA-Expression

Mögliche Auswirkungen des UCP3 Defizits auf die Fettsäureoxidationskapazität im BAT, wurden durch eine Analyse der Carnitin-Palmitoyltransferase I (CPT-I) Expression von Wildtypen und Mutanten untersucht.

Die CPT-I gilt als eines der Schlüsselenzyme für die mitochondriale Fettsäureoxidation (Kerner and Hoppel, 2000). Sie ist an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und vermittelt den Import von aktivierten Fettsäuren in das Mitochondrium. Die CPT-I katalysiert die Übertragung der an Coenzym A gebundenen Acyl-Reste auf Carnitin. Es gibt verschiedene Isoformen dieses Enzyms, unter anderem eine so genannte *liver-like* und *muscle-like* Form. Im BAT der Hamster wurde die Expression der *muscle-like* Form überprüft. Die Northern-Blot Analyse ergab, dass offensichtlich weder durch Fasten noch durch Kälteexposition eine Induktion der CPT-I im BAT der Hamster beider Phänotypen erfolgt. Die Expressionsspiegel in Mutanten und Wildtypen waren gleich. Da man davon ausgehen kann, dass infolge von Kälteexposition der Fettsäurestoffwechsel im BAT induziert wird, wäre eine Induktion der CPT-I zu erwarten gewesen. In Ratten und Mäusen konnte nach 48 h Kälteexposition eine deutliche Induktion der mCPT-I auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Daikoku et al., 2000; Yu et al., 2002). Eine mögliche Erklärung der fehlenden Induktion bei den Hamstern könnte zum einen darin bestehen, dass die mRNA-Expression nach längerer Kälteexposition wieder herab reguliert wird. Die Expressionsanalyse wurde nach sieben Tagen Kälteexposition durchgeführt. Die Expressionsdaten von Ratten und Mäusen stammten hingegen von Tieren, die nur 48 h kälteexponiert wurden. Akute Kälteexposition von Mäusen und Ratten induziert zudem anders als beim Dsungarischen Zwerghamster, eine vermehrte Zellproliferation im braunen Fettgewebe (Klingenspor et al., 1996). Die CPT-I mRNA-Expression in den Hamstern spiegelt demnach deren Regulation in vollständig ausdifferenzierten Zellen wider, während die Expressionsstudien bei Mäusen und Ratten in einem Stadium von Zellproliferation und Differenzierung durchgeführt wurden. Es wäre also denkbar, dass das BAT von Hamstern unter thermoneutralen Bedingungen bereits ausreichend mit CPT-I ausgestattet ist. Die Anpassung der Aktivität bei erhöhter Fettsäureoxidationsrate erfolgt bei dieser Spezies vermutlich durch posttranslationale Regulationsmechanismen. Im Muskel stellt beispielsweise das Malonyl-CoA einen wichtigen inhibierenden Regulationsfaktor der CPT-I Aktivität dar (Kerner and Hoppel, 2000). Die Transkription der CPT-I wird durch Fettsäuren und PPARs induziert (Mascaro et al., 1998).

Die CPT-I Expression im Skelettmuskel wurde bei Wildtypmüshen und Mutanten nicht untersucht. Im Muskel ist eine Induktion der CPT-I nach Fasten anzunehmen, wenn ein erhöhter Fettsäurestoffwechsel erfolgt. Interessanterweise ist ein direkter Zusammenhang der Expression mit der Fettsäureoxidationskapazität aber in den bislang veröffentlichten Studien nicht immer eindeutig erkennbar. Im *Soleus*, *Gastrocnemius* und *Tibialis anterior* von gefasteten Ratten wird beispielsweise sowohl die Expression als auch die Aktivität der CPT-I gesteigert (Moreno et al., 2003; Samec et al., 2002). Im *Vastus lateralis* ist keine Induktion der Expression bei Fasten beobachtet worden (Tunstall et al., 2002). Auch in Mäusen die UCP3 überexprimieren und bei denen ein erhöhter Fettsäurestoffwechsel postuliert wird, konnte kein Anstieg in der CPT-I Expression nachgewiesen werden (Moore et al., 2001).

Man kann zusammenfassend sagen, dass die CPT-I zwar als Schlüsselenzym der mitochondrialen β -Oxidation gilt, die mRNA-Expressionsspiegel von CPT-I lassen aber nach den vorliegenden Ergebnissen keinen direkten Rückschluss auf die Oxidationskapazität des Gewebes zu. Die Expression der CPT-I in Mitochondrien von Mäusen ohne UCP3 war nicht vermindert, damit ergibt sich kein Hinweis auf einen veränderten, mitochondrialen Fettsäurestoffwechsel gegeben. Aufschluss über eine verminderte oder erhöhte Aktivität der CPT-I können daraus allerdings nicht direkt abgeleitet werden.

4.3.4 UCP1 mRNA-Expression

Infolge von Kälteexposition erfolgt nachweislich eine Induktion von sowohl UCP3, als auch der UCP1 mRNA-Expression im BAT. Die Hamster aus den hier durchgeführten Experimenten wurden für sieben Tage bei 5°C kaltakklimatisiert. Der Zeitraum von sieben Tagen bei dieser Temperatur ist normalerweise ausreichend für eine Kaltakklimatisierung beim Hamster (Klingenspor, 1994).

Eine Induktion der UCP3 mRNA Expression konnte bei den Wildtyphamstern jedoch nicht bestätigt werden. Die Analyse der UCP1 Expression sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die Hamster tatsächlich in einem Zustand der Kaltakklimatisierung befanden. Die UCP1 Expressionslevel bei beiden Phänotypen lagen zweifach über den Kontrollen (Abb. 28). In vorangegangenen Expressionsstudien am Hamster konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmaximum von UCP1 beim Hamster nach zwei Tagen Kälteexposition erreicht wird, mit einer vierfachen Steigerung der mRNA-Expression gegenüber den bei 23°C gehaltenen Kontrollen (von Praun et al., 2001). Danach wird die Expression wieder herabreguliert, die mRNA-Konzentration liegt aber weiterhin zweifach über dem Kontrollniveau. Demnach kann man davon ausgehen, dass die Tiere aus den Experimenten tatsächlich kaltakklimatisiert waren.

Eine anschließende Analyse des Proteingehaltes konnte schließlich eine Induktion von UCP3 nach Kälteexposition bestätigen. Es kann also bestätigt werden, dass die untersuchten Hamster sich in einem kaltakklimatisierten Zustand befanden. Eine kompensatorische Steigerung der UCP1-Expression bei den Mutanten zum Ausgleich des UCP3-Mangels konnte nicht festgestellt werden.

Bei Fasten wird die Stoffwechselaktivität des BAT generell herabreguliert (Nagashima et al., 1995), dies hat aber wie hier gezeigt wurde, offenbar keine Auswirkung auf die UCP1 Expressionsrate. Die mRNA-Konzentrationen entsprechen den von Kontrolltieren.

4.3.5 SOD2 mRNA-Expression

Die Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) mRNA-Expression wurde geprüft, da eine Funktionshypothese eine Bedeutung von UCP3 in der Abwehr von Sauerstoffradikalen durch „milde“ Entkopplung postuliert (Skulachev, 1998). Auch für UCP2 wird eine Bedeutung bei der Radikalabwehr vermutet (Negresalvayre et al., 1997).

Die SOD2 oder MnSOD ist ein ~24kDA großes kernkodiertes Protein, dass in der inneren Mitochondrienmembran von eukaryotischen Zellen lokalisiert ist (Hanak and Jezek, 2001; Harris, 1992). Man geht davon aus, dass 0.4-4 % des von den Mitochondrien verbrauchten, molekularen O₂ durch eine „Fehltransfer“ von Elektronen zum zelltoxischen Superoxidanion (O₂^{•-}) reduziert wird (Kokoszka et al., 2001). Die SOD2 katalysiert die Reduktion des O₂^{•-} zu H₂O₂, welches schließlich über Katalasen zu H₂O abgebaut wird.

Die Analyse der SOD2 Expression in Hamstern mit fehlendem UCP3 sollte zeigen, ob die Mitochondrien möglicherweise einer höheren Superoxidbelastung ausgesetzt sind, da keine Radikalabwehr durch Entkopplung über UCP3 erfolgen kann. Es wäre daher denkbar gewesen, dass die Expression der SOD2 in diesen Tieren erhöht sind. Die Expression der SOD2 wurde mittels Northern-Blots mit gepoolten BAT und Skelettmuskel mRNA-Proben von Wildtypen und Mutanten aus einer früheren Studie durchgeführt. Die Tiere waren 28 Tage bei 5°C kaltakklimatisiert worden. Zwischen den beiden Phänotypen konnten keine Unterschiede im Expressionslevel festgestellt werden. Nur ein gewebespezifischer Unterschied in der Expression zwischen BAT und Muskel wurde deutlich. Der SOD2 mRNA-Spiegel ist im BAT deutlich höher als im Skelettmuskel. Ein direkter quantitativer Vergleich war aber hier nicht möglich, da es sich um gepoolte RNA-Proben handelte. Da die SOD2 mRNA-Konzentrationen im BAT gegenüber dem Muskel erhöht sind kann man schließen, dass im BAT aufgrund der hohen Atmungskapazität der Mitochondrien, besonders nach Kaltakklimatisierung, offensichtlich eine generell höhere Radikalbelastung herrscht.

Bei der Analyse einer Entkopplung durch Superoxid in Hamster-Mitochondrien mit und ohne UCP3 konnte bei erhöhter exogener Superoxidkonzentration, nach Behandlung mit Xanthin/Xanthin-Oxidase, kein Unterschied im Membranpotential festgestellt werden (von Praun, unveröffentlicht). Dies spricht gegen eine entkoppelnde Wirkung von UCP3 im Zusammenhang mit der Radikalabwehr. Eine Aktivierung von UCP3 in Anwesenheit von Superoxid und Fettsäuren konnte jedoch in Skelettmuskelmitochondrien von Ratten nachgewiesen werden. Diese Entkopplung konnte durch geringe Purinnucleotid-

Konzentrationen inhibiert werden, was für eine UCP3 vermittelte Entkopplung sprechen könnte (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2002).

Die Hypothese der Radikalabwehr durch UCP3 und UCP2 basiert auf verschiedenen Untersuchungen. Unter anderem wurden Experimente an isolierten Mitochondrien aus Skelettmuskel, Niere, BAT und Milz durchgeführt (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2002). Bei erhöhter exogener Superoxidkonzentration zeigten die Mitochondrien dieser Gewebe eine erhöhte Protonendurchlässigkeit, während Lebermitochondrien die keine UCPs exprimieren, sowie Mitochondrien aus UCP3^{-/-}-Mäusen nicht entkoppelt wurden. Die durch Superoxid vermittelte Entkopplung konnte allerdings nur in Anwesenheit von freien Fettsäuren festgestellt werden und wurde durch BSA inhibiert. Die Wirkung von Superoxid auf Mitochondrien von Hamstern mit und ohne UCP3 müssten daher in Anwesenheit von Fettsäuren überprüft werden.

Wenn UCP2 und UCP3 tatsächlich an der Abwehr von Sauerstoffradikalen beteiligt sind ist allerdings anzunehmen, dass die Regulation und Funktion der beiden Proteine dabei unterschiedlich ist, da beide in BAT- und Skelettmuskelmitochondrien kolokalisiert sind und bei gleicher Funktion redundant wären.

Nach einer von Schrauwen et al. beschriebenen Hypothese zur Funktion von UCP3 bei der Radikalabwehr, besteht die Aufgabe des Proteins darin, freie Fettsäuren aus den Mitochondrien zu transportieren, aus denen durch Lipid-Peroxidation zelltoxisch Radikale generiert werden können (Schrauwen et al., 2003; Brand et al., 2002). Die Regulation von UCP3 und die gewebespezifische Expression in BAT und Skelettmuskel, zwei Geweben mit hoher Fettsäurestoffwechselkapazität, unterstützen diese Bedeutung von UCP3 bei der Radikalabwehr.

Die Funktion von UCP2 in der Abwehr von Sauerstoffradikalen wird zum einen durch die mehrfach beobachtete entkoppelnde Wirkung, besonders in Anwesenheit von Superoxid unterstützt (Echtay and Brand, 2001; Negresalvayre et al., 1997). Zum anderen unterstützt seine ubiquitäre Verbreitung diese Funktion, da in den Mitochondrien von allen Geweben, bei erhöhter Atmungskettenaktivität eine Entstehung von Sauerstoffradikalen erfolgen kann (Echtay and Brand, 2001; Petrosillo et al., 2001). Ein wichtiges Argument für die vermutete Funktion liefern zudem Befunde aus der phänotypischen Charakterisierung von UCP2^{-/-}-Mäusen. Diese Tiere besitzen vermutlich aufgrund einer nachweislich erhöhten ROS-

Produktion in den Macrophagen, eine Resistenz gegen eine Infektion mit *Toxoplasma gondii* (Arsenijevic et al., 2000).

Bei den Hamstermutanten mit fehlender UCP3-Expression im BAT konnte eine etwa fünffach erhöhte UCP2 mRNA-Expression im BAT nachgewiesen werden, was wiederum bedeuten könnte, dass die Mitochondrien unter einer erhöhten Radikalbelastung leiden (Liebig et al., 2004). Ein Ausbleiben der SOD2-Induktion im BAT der Mutanten könnte demnach damit begründet werden, dass die vielfach erhöhte UCP2-Expression im BAT der Mutanten möglicherweise das Fehlen von UCP3 kompensieren könnte (Liebig et al., 2004). Die Mitochondrien wären demzufolge keiner erhöhten Superoxidbelastung ausgesetzt, weshalb auch keine erhöhte SOD2-Expression erfolgt ist.

Des Weiteren gibt es allerdings auch Hinweise darauf, dass die Aktivität der SOD2 nicht durch Änderungen in der Expression, sondern durch direkte Regulierung der Enzymaktivität bestimmt wird (Halliwell and Gutteridge, 2000; Hanak and Jezek, 2001). Als Folge von erhöhter Radikalbelastung muss also nicht notwendigerweise eine Induktion des Proteins erfolgen.

4.4 Fettsäurestoffwechsel von Wildtyphamstern und Mutanten

4.4.1 *In vitro* Fettsäurestoffwechsel in BAT-Gewebeproben

Die β -Oxidationskapazität in BAT und Skelettmuskel-Gewebeproben der Hamster wurde *in vitro* analysiert, um Hinweise auf die von (Himms-Hagen and Harper, 2001) postulierte Funktion von UCP3 als mitochondrialer Fettsäureexporter zu prüfen. Es wird angenommen, dass der Export von freien Fettsäuren aus der Mitochondrienmatrix durch UCP3 erfolgt und das Protein damit eine Bedeutung bei der Regulation des Fettsäurestoffwechsels besitzt. Die freien Fettsäuren in den Mitochondrien könnten aus der MTE-I-katalysierten Hydrolyse von Acyl-CoAs stammen. Würde diese Hypothese stimmen, wäre zu erwarten, dass beim Fehlen von UCP3 die Fettsäureoxidationskapazität der Mitochondrien beeinträchtigt ist. Daher wurde der Fettsäurestoffwechsel zum einen in BAT-Gewebeproben von Wildtyphamster und Mutanten ohne UCP3 Expression analysiert. Außerdem wurde die Oxidationskapazität bei unterschiedlicher Regulation bzw. UCP3-Konzentration im BAT und Skelettmuskel nach Kälteakklimatisierung und nach Fasten untersucht. Hamster beider Phänotypen wurden für diese Experimente sieben Tage bei 5°C kaltakklimatisiert, 48 h gefastet oder als Kontrolle bei 23°C mit *ad libitum* Futter gehalten.

Die Kapazität des Fettsäurestoffwechsels wurde anhand der CO₂-Produktion und der Fettsäureaufnahme der Gewebeproben *in vitro* ermittelt. Den Geweben wurde Oleat angeboten, von dem 2 % radioaktiv markiert vorlagen. Da jeweils nur das C₁-Atom der eingesetzten Oleatmoleküle radioaktiv markiert war, konnte hier keine Aussage über eine vollständige Oxidation der Fettsäuren gemacht werden. Für die Analyse wurde aber angenommen, dass jedes Oleatmolekül vollständig oxidiert wurde. Die im folgenden diskutierten CO₂-Produktionsraten stehen demnach repräsentativ für die oxidierten Oleatmengen. Bei den ermittelten intrazellulären Fettsäurekonzentration wurde nicht zwischen freien oder CoA-gebundenen Fettsäuren und Stoffwechselzwischenprodukten differenziert.

Der Vergleich der CO₂-Produktion der Gewebeproben von Wildtypen und Mutanten der drei Behandlungsgruppen hat keine Unterschiede zwischen den beiden Phänotypen ergeben. Auch die Fettsäureaufnahme bzw. die endogenen Fettsäurekonzentration war bei beiden Phänotypen vergleichbar (Tab. 5). Es scheint demnach offensichtlich, dass UCP3 keinen direkten Einfluss auf den Fettsäurestoffwechsel besitzt. Die intrazellulären

Fettsäurekonzentrationen geben keine Hinweise darauf, dass es in Mitochondrien ohne UCP3 zu einer Akkumulation von Fettsäuren kommt. Allerdings kann nicht geklärt werden, ob sich die von den BAT-Gewebeproben aufgenommenen Fettsäuren in den Zellen der beiden Phänotypen unterschiedlich verteilen. Bei den Mutanten wäre eine vermehrte Akkumulation von Fettsäuren in den Mitochondrien denkbar. Um diesen Punkt zu klären müsste die Fettsäurekonzentration bzw. die Fettsäurezusammensetzung von isolierten Mitochondrien bestimmt werden. Analysen der Fettsäurezusammensetzung in Skelettmuskel-Mitochondrien von UCP3^{-/-}-Mäusen deuten allerdings darauf hin, dass keine Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen Mitochondrien mit und ohne UCP3 bestehen (Bezaire et al., 2001).

Wie die Hamster mit fehlender UCP3 Expression im BAT, zeigen auch UCP3^{-/-}-Mäuse keinen klaren, veränderten Phänotyp (Gong et al., 2000). Die Funktionshypothese von UCP3 als Fettsäuretransporter beruht vorwiegend auf Erkenntnissen die bei der phänotypischen Charakterisierung von transgenen Mäusen gewonnen wurden, die (humanes) UCP3 im Skelettmuskel überexprimieren. Die Tiere besaßen trotz Hyperphagie ein geringeres Körpergewicht als Wildtypen und einen reduzierten Körperfettgehalt (Clapham et al., 2000). Dieser schlanke Phänotyp deutet auf einen erhöhten Fettsäurekatabolismus (β -Oxidationsrate) und eine reduzierte Fettsäurespeicherung hin. Entgegen der Erwartungen zeigten allerdings die UCP3^{-/-}-Mäuse keine Erhöhung im Fettgehalt oder Körpergewicht (Gong et al., 2000). Auch nach Gabe einer hochkalorischen Diät war die Gewichtsentwicklung vergleichbar mit Wildtypen (Gong et al., 2000).

Ein Vergleich der Körpergewichte von weiblichen Wildtyphamstern und Mutanten der Versuchsgruppen aus dieser Arbeit hat ergeben, dass die Mutanten mit durchschnittlich 44.3 ± 1.5 g ein signifikant höheres Körpergewicht als Wildtypen mit 33.8 ± 2.1 g besaßen (Abb. 44). Eine Analyse der Körperzusammensetzung von Wildtypen und Mutanten in einer früheren Arbeit hat allerdings gezeigt, dass das erhöhte Gewicht offensichtlich nicht auf eine höhere Fettmasse zurückzuführen ist, sondern auf eine insgesamt größere Körpermasse und Länge der Mutanten (Liebig, 2000; von Praun, unveröffentlicht). Diese morphologische Veränderung ist nicht unbedingt im Zusammenhang mit der Mutation bzw. dem Fehlen von UCP3 zu sehen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das erhöhte Körpergewicht der Mutanten auf einen Gründereffekt zurückzuführen ist, da die Mutantenlinie aus einem einzigen Elternpaar hervorgegangen ist.

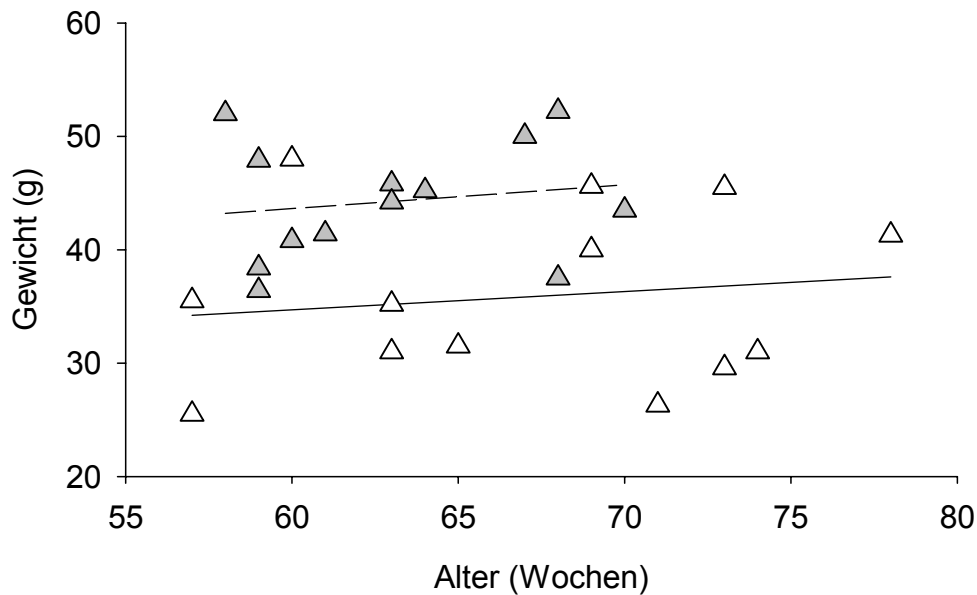


Abb. 44: Körpergewichte von (weiblichen) Wildtyphamstern (weiß, n=13) und Mutanten (grau, n=13) im Alter von 57-78 Wochen. Bei beiden Phänotypen erfolgt keine altersabhängige Änderung im Körpergewicht ((- -)=Mutante, $r_s = 0.05$, $p > 0.05$; (—)= Wildtyp, $r_s = 0.108$, $p > 0.05$);

Obwohl sich das UCP3 Defizit anders als bei den UCP3^{-/-}-Mäusen nur auf das BAT beschränkt, wäre trotzdem eine Änderung in der Körperzusammensetzung möglich gewesen, wenn UCP3 eine entscheidende Rolle in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels besitzt. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass das braune Fettgewebe eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Energiehomeostase in Mäusen besitzt, weil die Tiere nach Verlust des Gewebes eine starke Gewichtszunahme zeigen (Lowell et al., 1993). Welche Mechanismen im BAT an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt sind, ist aber noch nicht vollständig geklärt

Einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang von UCP3 und dem Fettsäurestoffwechsel haben *in vivo* Stoffwechselanalysen bei UCP3^{-/-}-Mäuse ergeben. Der Respiratorischen Quotienten (RQ) der Mäuse war bei *ad libitum* Fütterung etwas höher als bei Wildtypen (Bezaire et al., 2001), was auf einen höheren Glucosestoffwechsel hindeutet. Allerdings sank bei beiden Phänotypen der RQ bei Fasten gleichermaßen. Eine Absenkung des RQ zeigt eine Erhöhung des Fettsäurestoffwechsels. Es sind demzufolge keine klaren Aussagen bezüglich eines veränderten Stoffwechsels bei den UCP3^{-/-}-Mäuse zu machen.

Auch die *in vitro* Stoffwechselfmessungen im BAT vom Hamster liefern keine Hinweise auf einen veränderten Stoffwechsel, da zumindest die Fettsäureoxidation im BAT der Mutanten gegenüber den Wildtypen nicht beeinträchtigt scheint.

Die in dieser Arbeit am Hamster durchgeführten Expressionsanalysen haben gezeigt, dass die UCP3 Expression offensichtlich abhängig von der Fettsäurestoffwechselaktivität im Gewebe reguliert wird. Daher wurde die Fettsäurestoffwechselaktivität bei unterschiedlich hohem „natürlichen“ UCP3-Proteingehalt von kaltakklimatisierten und gefasteten Wildtyphamstern betrachtet. Im BAT erfolgt nach Kälteexposition eine Erhöhung der UCP3-Expression, bei Fasten wird die Expression reduziert (Abb. 20).

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Fettsäureoxidationskapazität bzw. die Fettsäureaufnahme des BAT vom Hamster infolge der Kaltakklimatisierung erhöht (Tab. 5/ A). Die CO₂-Produktion in den Gewebeproben von kaltakklimatisierten Hamstern, in denen eine höhere UCP3 Konzentration nachgewiesen wurde, war um mehr als die Hälfte reduziert gegenüber dem BAT aus Kontroll- und gefasteten Tieren. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da nach bisherigen Befunden die Oxidationskapazität im BAT infolge von Kälteexposition erhöht wird (Yu et al., 2002). Betrachtet man wie viel Prozent der vom BAT der Hamster insgesamt aufgenommenen Oleatmenge oxidiert wurde, so ist festzustellen, dass vom BAT der Kontrollen und gefasteten Hamster zwischen 9.5 % und 13.6 % der aufgenommenen Fettsäuren oxidiert wurden, bei den kaltakklimatisierten waren es weniger als 5 %.

Interessanterweise unterscheidet sich die Fettsäureoxidationskapazität von Kontrollgewebe und BAT aus gefasteten Hamstern nicht voneinander. Auch die Fettsäureaufnahme ist bei Proben aus Kontroll- und gefasteten Tieren vergleichbar. Um die „Verschwendung“ von Energie bei Nahrungsmangel zu minimieren, wird die BAT Aktivität *in vivo* bei Fasten normalerweise herabreguliert (Nagashima et al.; 1995). Da die Aktivität des BAT sympathischer Kontrolle unterliegt und der Stoffwechsel des Gewebes bei Fasten aktiv herabreguliert wird, wäre demzufolge eine regulierte Deaktivierung nach der Denervierung *in vitro* nicht mehr möglich. Die gemessene Aktivität in den Gewebeproben zeigt demnach eine „basale“ von der neuronalen Kontrolle unabhängige Aktivität, die z.B. abhängig vom Substratangebot erfolgt.

Bei den kälteexponierten Tieren war die insgesamt aufgenommene Fettsäuremenge erwartungsgemäß erhöht. Sie ist um rund 20 % höher als bei den Kontrollen und gefasteten Tieren. Eine erhöhte Fettsäureaufnahme konnte auch bei der Untersuchung des Fettsäurestoffwechsels (*in vivo*) in BAT-Gewebeproben von kälteexponierten Mäusen festgestellt werden (Yu et al., 2002). Im BAT der Mäuse war nach 48 h Kälteexposition eine Zunahme der Fettsäureaufnahme von etwa 40 % über dem Kontrollniveau von warmakklimatisierten Mäusen festgestellt worden. Es wurde daraus geschlossen, dass die erhöhte Fettsäurekonzentration auch eine Erhöhung der β -Oxidationsrate bedeutet. Die Rate der CO_2 -Produktion im BAT der Mäuse wurde nicht direkt ermittelt. Die erhöhte Fettsäureaufnahme im BAT der Mäuse und der Kälte exponierten Hamster deutet auf eine gesteigerte Fettsäureoxidation hin. Die beim Hamster in dieser Arbeit gemessene CO_2 -Produktion zeigt allerdings, dass die β -Oxidationsrate offenbar reduziert ist.

Nach dem von Yu et al. (2002) gezeigten, aktivierenden Einfluss von Kälte auf den Stoffwechsel im BAT von Mäusen wurde erwartet, dass auch in den BAT-Mitochondrien von kaltakklimatisierten Hamstern eine verstärkte β -Oxidation stattfindet. Eine höhere Oxidationsrate als in Proben von Kontrollen und gefasteten Tieren wäre schon allein deshalb zu erwarten gewesen, da bei Kaltakklimatisierung eine erhöhte Mitochondrienproliferation im BAT zur Verbesserung der Thermogenesekapazität erfolgt (Wiesinger, 1989). Die Zusammensetzung des BAT bei den drei Gruppen wurde nicht direkt untersucht und bei der Analyse nicht berücksichtigt. Es ist jedoch bekannt, dass der Fettgehalt im BAT von warmakklimatisierten Tieren höher ist als in kälteexponierten Hamstern, der Mitochondrienproteingehalt von warmakklimatisierten Tieren aber vielfach geringer ist (Wiesinger, 1989).

Ein Unterschied im Mitochondrienproteingehalt zwischen Mutanten und Wildtypen besteht nicht, was in einer früheren Untersuchung von 28 Tagen kaltakklimatisierten Hamstern gezeigt werden konnte. Auch die Thermogenesekapazität des BAT der Mutanten ist mit den Wildtypen vergleichbar (Liebig et al., 2004).

Die erhöhte Thermogeneseleistung des BAT in Kälte steht in direktem Zusammenhang mit dem Fettsäurestoffwechsel. Im braunen Fettgewebe vom Hamster wird durch β -adrenerge Stimulation die Lipolyse induziert, indem durch Aktivierung der hormonsensitive Lipase (HSL) Fettsäuren aus den endogenen Lipidspeichern des BAT frei gesetzt werden. Vom BAT wird außerdem die Lipoprotein-Lipase ins Serum sezerniert, welche gebundene Fettsäuren aus *very low density* Lipoproteinen und Chylomikronen hydrolysiert und für deren Import in die Mitochondrien sorgt (Braun and Severson, 1992). Den braunen Fettzellen stehen demnach

infolge eines Kältestimulus vermehrt freie Fettsäuren zur Aktivierung von UCP1 und/ oder zur Oxidation zur Verfügung.

Die hohe Oleat-Konzentration im Messmedium bedeutet also letztlich einen Kältestimulus für die Mitochondrien. Die erhöhte Atmungsrate und Stoffwechselaktivität bei Entkopplung durch UCP1 wird allerdings nicht nur durch einen erhöhten Fettsäurestoffwechsel, sondern auch durch die Nutzung von Glucose als Substrat ermöglicht. Neben Pyruvat, stellt beispielsweise auch das aus der Glycolyse und dem Triglyceridabbau stammende Glycerol-3-Phosphat ein schnell verfügbares Substrat dar.

Die vermehrte Fettsäureaufnahme in Kälte, die auch in den Gewebeproben der Hamster nachgewiesen werden konnte, führt also neben der Aktivierung von UCP1 auch zu einer Erhöhung des Fettsäurestoffwechsels im BAT. Die UCP1 Aktivität wird unter anderem durch die endogene Fettsäurekonzentration reguliert. Das Ende eines Kältestimulus wird dem UCP1 durch die Reduktion der Konzentration an freien Fettsäuren signalisiert, indem diese vermehrt als Acyl-Carnitin gebunden vorliegen und schließlich über den β -Oxidationsweg abgebaut werden. Die Affinität der Mitochondrien zur Aktivierung von Fettsäuren zu Acyl-Carnitin ist höher, als die fettsäurevermittelte Aktivierung von UCP1 (Nicholls and Rial, 1999). Dieser Umstand würde die Erwartung einer erhöhten β -Oxidation in den kaltakklimatisierten Mitochondrien mit hohem UCP1-Gehalt stützen.

Da eine Reduktion der β -Oxidationsrate bei Kälteanpassung nach den geschilderten Befunden eher unwahrscheinlich ist, ist die geringe CO_2 -Produktion möglicherweise auf ein methodisches Problem zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass der Stoffwechsel in den Gewebeproben durch Sauerstoffmangel während der Messung zum Erliegen gekommen ist. Durch die hohe Mitochondrienzahl und UCP1-Konzentration in den kaltakklimatisierten BAT-Gewebeproben, erfolgt in Anwesenheit von Fettsäuren eine stark erhöhte entkoppelte Atmung. Infolgedessen wurde der Sauerstoff im Messmedium schnell verbraucht und nach kurzer Zeit konnte keine Oxidation mehr stattfinden. Die Messungen erfolgten in einem abgeschlossenen System, welches nicht durch exogene Sauerstoffzufuhr versorgt wurde.

Aus den hier durchgeführten *in vitro* Analysen kann dennoch festgestellt werden, dass die Fettsäureaufnahme und damit vermutlich auch die Kapazität der β -Oxidation im BAT infolge von Kaltakklimatisierung beim Hamster erhöht wird. Ein tatsächlicher, quantitativer Vergleich der Kapazität des Fettsäurestoffwechsels ist leider nicht möglich, da zumindest bei

den Kälteproben davon ausgegangen werden kann, dass bereits vor Ablauf der Inkubationszeit der Stoffwechsel in den Geweben zum Erliegen gekommen ist.

Man kann zudem feststellen, dass die β -Oxidationskapazität des braunen Fettgewebes bzw. die Erhöhung der Fettsäureaufnahme nach Kälteexposition offensichtlich kein UCP3 abhängiger Prozess ist, da Hamster ohne UCP3 im BAT eine vergleichbare Fettsäureaufnahme zeigen wie Wildtypen.

4.4.2 *In vitro* Fettsäurestoffwechsel im *Tibialis anterior*

Die Funktionsanalysen von UCP3 in transgenen oder *knock out* Mäusen, beschränken sich fast ausschließlich auf Untersuchungen im Skelettmuskel. Die Expression von UCP3 im Skelettmuskel der Mutantenhamster ist nicht verändert. Die Analyse der Oxidationskapazität des Skelettmuskels (*Tibialis anterior*) von Wildtypen und Mutanten sollte zeigen, ob sich der Fettsäurestoffwechsel möglicherweise abhängig von der unterschiedlichen UCP3-Konzentration in Kontroll-, gefasteten und kaltakklimatisierten Hamstern ändert, also infolge der natürlichen Regulation. Zudem wurde die Oxidationskapazität von Muskel und BAT verglichen.

Die Expressionsregulation von UCP3 im Muskel erfolgt praktisch gegenläufig zum BAT. Nach Fasten wird UCP3 im Muskel beider Phänotypen verstärkt exprimiert, während bei Kälte kein Expressionsänderung erfolgt (Abb. 23). Die Oxidationsraten und Fettsäurelevel im *Tibialis anterior* der drei Behandlungsgruppen sind allerdings entgegen der Erwartungen nicht verschieden. In dem untersuchten gemischten Muskel war kein Einfluss von Kälteexposition oder Fasten auf die Oxidationskapazität des Gewebes festzustellen. Zwischen den Geweben aus Mutanten und Wildtypen bestand kein Unterschied, was aber hinsichtlich der normalen UCP3 Expression im Muskel zu erwarten war.

Ein Vergleich der Fettsäureoxidation von BAT und Skelettmuskel zeigt, dass die Oxidationsrate und die Fettsäureaufnahme im Muskel deutlich geringer sind als im braunen Fettgewebe. Im BAT von Kontrollhamstern und Mutanten wurden rund 10 % der aufgenommenen Fettsäuren oxidiert, bei gefasteten durchschnittlich 12.5 %. Bei den untersuchten Muskelproben wurden hingegen nur rund 6 % der aufgenommenen Fettsäuren oxidiert. Zudem war die gesamte Menge an aufgenommenen Fettsäuren im Muskel bis zu 50 % niedriger als im BAT (Tab. 5/ B).

Die hier gezeigte erhöhte Fettsäurestoffwechselaktivität bzw. Fettsäureaufnahme im BAT, korreliert mit der vielfach höheren MTE-I Expression im BAT im Vergleich zum Muskel (Abb. 26). Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass die MTE-I eine regulative Bedeutung im Fettsäurestoffwechsel besitzt.

Allerdings wäre im gefasteten Skelettmuskel aufgrund der Induktion der MTE-I auch ein erhöhter Fettsäurestoffwechsel zu erwarten gewesen, wenn die MTE-I tatsächlich eine Bedeutung in der Regulation des mitochondrialen Stoffwechsels besitzt. Diese Erwartung wurde jedoch nicht bestätigt.

Ein möglicher Grund dafür, dass sich die Fettsäureoxidationsraten in den Muskeln aus unterschiedlich behandelten Tieren nicht unterscheiden, könnte mit den Messbedingungen zusammenhängen. Beim *Tibialis anterior* handelt es sich um einen gemischten Muskeltypen, der sowohl aus oxidativen als auch glycolytischen Fasern besteht. Bei Fasten herrscht in der Regel ein Glucosemangel bzw. wird die Glucose anderen Organen, besonders dem Gehirn zur Verfügung gestellt. Der Muskel wechselt deshalb zur Fettsäureoxidation. Da bei den gegebenen Messbedingungen eine physiologische Glucosemenge im Medium vorhanden war, könnte der Muskel auch Glucose als bevorzugtes Substrat genutzt haben. Ein Glucosespiegel von 5 mM entspricht dem physiologischen Serumgehalt von 4-6 mM. Es ist daher fraglich, ob die Messungen tatsächlich unter „Fastenbedingungen“ erfolgten. Möglicherweise erfolgt *in vitro* auch keine Inhibition bzw. Regulation der Glucoseaufnahme in die Gewebe, wie bei Fasten *in vivo*.

Andererseits konnte infolge einer UCP3-Überexpression im Muskel von UCP3tg-Mäusen, eine bevorzugte Fettsäureoxidation nachgewiesen werden. Im *Soleus*, einem oxidativen Muskel konnte *in vitro* eine deutlich höhere Palmitatoxidationsrate gegenüber Wildtypen festgestellt werden (Dulloo et al., 2001; Wang et al., 2003). Die Pyruvatoxidation war hingegen nicht verschieden zwischen den beiden Phänotypen. Bei Wildtypmäusen konnte bei gleichzeitigem Fettsäure- und Pyruvatangebot, eine Absenkung im Pyruvatstoffwechsel beobachtet werden, während im *Soleus* der UCP3tg Mäuse keine Erniedrigung erfolgte (Dulloo et al., 2001; Wang et al., 2003). Die Fettsäureoxidation wurde also auch bei einem zusätzlichen Glucose- und Insulin-Angebot vorrangig betrieben. Auch in UCP3 transfizierten, humanen Primärmuskellzellen konnte sowohl ein erhöhter Fettsäure-, als auch Glucosestoffwechsel nachgewiesen werden (Garcia-Martinez et al., 2001). Die erhöhte Glucoseatmung wurde bei gleichzeitiger Gabe von Oleat reduziert.

Die Befunde zur Fettsäureoxidation im Muskel von Mäusen mit UCP3-Überexpression und beim Hamster mit natürlich erhöhter UCP3-Expression nach Fasten zeigen, dass der Stoffwechsel in transgenen Tieren offenbar grundlegend verändert wird. Es wird deutlich, dass infolge einer regulierten Erhöhung des UCP3-Spiegels nicht zwangsweise der Fettsäurestoffwechsel bevorzugt betrieben wird, wenn Glucose als alternatives Substrat vorhanden ist.

Wie bereits bei der Analyse der entkoppelnden Wirkung von UCP3 in transfizierten Zellen und Hefen deutlich wurde, gibt eine Überexpression eines Proteins nicht unbedingt Aufschluss über die tatsächliche Proteinfunktion. Die Wahrscheinlichkeit, dass nichtphysiologische Artefakte auftreten ist groß. Beispielsweise steht die erhöhte

Fettsäurestoffwechselaktivität und Protonendurchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran bei den UCP3tg-Mäusen mit 20-fach höherem UCP3-Gehalt offensichtlich im Zusammenhang mit dem UCP3, allerdings ist die physiologische Relevanz eher fraglich (Cadenas et al.; 2002).

Die Messung des Fettsäurestoffwechsels im BAT von Wildtypen und Hamstern ohne UCP3, sowie der Vergleich des Fettsäurestoffwechsels bei natürlicher Regulation der UCP3-Expression im BAT und Skelettmuskel in Kälte und nach Fasten, hat weder im Skelettmuskel noch im BAT einen direkten, regulativen Zusammenhang von UCP3 und dem Fettsäurestoffwechsel gezeigt. Die Oxidationskapazität im BAT wird nicht von der UCP3-Anwesenheit oder der Menge bestimmt. Trotz einiger methodischer Kritik kann man sagen, dass die Hypothese von Himms-Hagen und Harper (2001) nach den hier erhaltenen Ergebnissen keine Unterstützung finden kann.

4.4.3 Fettsäurestoffwechsel in isolierten Mitochondrien

Der Vergleich der CO₂-Produktion und der Fettsäureaufnahme in BAT-Gewebeproben aus Hamstern mit normaler und fehlender UCP3 Expression hat keine Unterschiede im Fettsäurestoffwechsel der beiden Phänotypen ergeben. Da möglicherweise durch unerwünschte hypoxische Bedingungen während der Messungen, der Fettsäurestoffwechsel in den Proben beeinträchtigt wurde und somit kein direkter quantitativer Vergleich möglich war, wurde die Oxidationskapazität von isolierten Mitochondrien anhand des O₂-Verbrauchs ermittelt. Die β -Oxidationskapazität kann *in vitro* sowohl anhand der CO₂-Produktion als auch durch Messung des Sauerstoffverbrauchs bestimmt werden. Die Messung der Mitochondrienatmung ermöglichte es, die Befunde aus den CO₂-Messungen im Gewebe zu überprüfen. Des Weiteren konnte die Glycerol-3-Phosphat (glucoseabhängige) und die Fettsäureatmung verglichen werden. Die Messung der Atmungskapazität in isolierten Mitochondrien hat gegenüber den Gewebeproben den Vorteil, dass der O₂-Verbrauch der gleichen Mitochondrienmenge verglichen werden kann.

Da sich die UCP3 Konzentration bei Kaltakklimatisierung im BAT erhöht, wurden Mitochondrien von sieben Tage kaltakklimatisierten Wildtypen und Mutanten verglichen. Ein Einfluss von UCP3 auf die mitochondriale Atmung bzw. den Fettsäurestoffwechsel wäre bei diesem Konzentrationsunterschied am ehesten zu erwarten gewesen.

Ermittelt wurde zunächst die Atmungsrate mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat als Substrat, da neben dem Fettsäurestoffwechsel auch der Glucosestoffwechsel bei Kaltakklimatisierung erhöht wird (Daikoku et al., 2000; Yu et al., 2002; Wiesinger, 1989). Das aus der Glycolyse und dem Triglyceridabbau stammende Glycerol-3-Phosphat ist neben Fettsäuren ein wichtiges Substrat zur Aufrechterhaltung der erhöhten Atmungsrate und Stoffwechselaktivität bei Entkopplung der Mitochondrien in Kälte. Die Bedeutung von Glycerol-3-Phosphat als Substrat wird daran deutlich, dass die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase in BAT-Mitochondrien in hoher Konzentration vorhanden ist und in Kälte verstärkt exprimiert wird (Yu et al., 2002; DosSantos et al., 2003). Über die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, die an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, werden Elektronen über FADH₂ direkt auf Ubichinon bzw. den Komplex III übertragen. Das Glycerol-3-Phosphat muss also zur Oxidation nicht in die Mitochondrien transportiert werden und stellt somit ein schnell verfügbares Substrat dar.

Um die Glycerol-3-Phosphat abhängige Atmung zu messen, wurde der Komplex I der Atmungskette mit Rotenon inhibiert. Die Einspeisung von Elektronen in die Atmungskette über Reduktionsäquivalente aus der β -Oxidation oder über den Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) war nicht zu erwarten, da durch Akkumulation von NADH_2 die NADH/NAD^+ -Ratio ansteigt, was eine rückkoppelnde Inhibition des Citrat-Zyklus und der β -Oxidation bewirkt.

Die Atmungskapazität der Wildtyp- und Mutantenmitochondrien mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat als Substrat war vergleichbar (Abb. 36/37). Da isolierte BAT-Mitochondrien grundsätzlich entkoppelt sind (Cannon and Lindberg, 1979), wurde nach *sn*-Glycerol-3-Phosphat-Zugabe letztlich die entkoppelte Atmung der Mitochondrien gemessen. Erst nach Zugabe von GDP konnte schließlich die UCP1 unabhängige Atmung ermittelt werden. Warum sich präparierte BAT-Mitochondrien in einem entkoppelten Zustand befinden, ist nicht geklärt. Die Aktivierung von UCP1 erfolgt durch freie Fettsäuren, daher wurden während der Präparation und der Messung freie Fettsäuren durch Zugabe von BSA gebunden. Allerdings kann die Verfügbarkeit von Fettsäuren für die Mitochondrien nicht vollständig vermieden werden, da z.B. durch aktive Lipolyse von adherenten Triglyceriden oder durch Phospholipasen innerhalb der Mitochondrien Fettsäuren freigesetzt werden können (Klingenberg and Huang, 1999).

Dass sich die isolierten BAT-Mitochondrien vom Hamster in einem entkoppelten Zustand befinden wird daran deutlich, dass der Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von *sn*-Glycerol-3-Phosphat mit der Atmungsrate nach Aktivierung von UCP1 durch Palmitat vergleichbar ist, wie in einer früheren Arbeit festgestellt werden konnte (Liebig et al., 2004). In den hier durchgeführten Messungen konnte allerdings durch Palmitatzugabe keine Erhöhung der Atmung bzw. kein mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat vergleichbarer O_2 -Verbrauch festgestellt werden (Abb. 36/ 38). Es ist denkbar, dass durch die relativ hohe Albuminkonzentration (1 %) im Messpuffer die freien Fettsäuren weitgehend abgefangen wurden.

Wie bereits in früheren Messungen beobachtet werden konnte, beeinträchtigt das Fehlen von UCP3 die entkoppelte, Glycerol-3-Phosphat vermittelte Atmung nicht (Liebig, 2000; Liebig et al., 2004). Die damaligen Messungen wurden allerdings bei einer Messtemperatur von 25°C durchgeführt, während die hier beschriebenen Messungen bei 37°C , also unter physiologischen Temperaturbedingungen erfolgten. Die Atmungsraten der Mitochondrien mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat als Substrat sind jedoch bei beiden Umgebungstemperaturen vergleichbar. Da die Enzymaktivität aber im Allgemeinen temperaturabhängig ist, wäre eine erhöhte Atmung bei 37°C zu erwarten gewesen. Man könnte spekulieren, dass durch die

UCP1 vermittelte Wärmebildung die lokale Temperatur um die Mitochondrien höher war, als die extern eingestellte Messtemperatur. Beispielsweise steigt bei aktiver Thermogenese *in vivo* die Temperatur des braunen Fettgewebes deutlich an und erreicht Werte von über 40°C (Böckler, 1985). Es wäre demnach auch plausibel, dass eine höhere Aktivität bei niedrigen Temperaturen erfolgt, da die Funktion des braunen Fettgewebes darin besteht, bei einem Absinken der Umgebungstemperatur Wärme zu produzieren. Unterstützt wird diese Vermutung durch Beobachtung an BAT-Mitochondrien aus winteradaptierten Hamstern. Bei einer Messtemperatur von 15°C besaßen die Mitochondrien eine höhere Atmungskapazität als bei 30°C (Bräulke, 2003).

Betrachtet man die ungekoppelte Fettsäureatmung der Wildtyp- und Mutantenmitochondrien nach Gabe von Palmitoyl-Carnitin, so haben die Mitochondrien beider Phänotypen vergleichbare O₂-Verbrauchsraten (Abb. 38). Die Fettsäureoxidation in den BAT-Mitochondrien von UCP3-defizienten Hamstern scheint demnach nicht beeinträchtigt. Der Sauerstoffverbrauch mit Glycerol-3-Phosphat und Palmitat als Substrat ist zudem vergleichbar. Man kann also sagen, dass die Kapazität der Glucose- und Fettsäureatmung gleich ist und nicht von UCP3 beeinflusst wird.

Das *sn*-Glycerol-3-Phosphat wurde im Überschuss mit einer Konzentration von 20 mM eingesetzt. Bei dieser Konzentration wird die maximale Substratatmung induziert (Liebig, 2000; Liebig et al., 2004). Die Titration von Palmitoyl-Carnitin hat gezeigt, dass bereits bei einer Konzentration von 20 µM eine nahezu maximale Fettsäureoxidationsrate erreicht wird (Abb. 40). Bei einer weiteren Steigerung der Palmitatkonzentration auf 60 µM wird die Atmung tendenziell sogar eher reduziert. Möglicherweise führt ein Fettsäureüberschuss zu einer Inhibition der Atmung durch regulative Rückkopplungsmechanismen. Wie bereits erwähnt wurde wirkt beispielsweise ein erhöhter NADH-Spiegel inhibierend auf den mitochondrialen Stoffwechsel.

Obwohl kein signifikanter Unterschied zwischen dem O₂-Verbrauch von Wildtyp- und Mutantenmitochondrien mit Palmitoyl-Carnitin und Glycerol-3-Phosphat als Substrat festgestellt werden kann, so fällt bei Betrachtung der relativen basalen Atmung dennoch auf, dass die Raten der Mutanten bei den drei Palmitoyl-Carnitin Konzentrationen und mit Glycerol-3-Phosphat als Substrat tendenziell immer etwas niedriger sind, als bei den Wildtypen (Abb. 45).

Ob der tendenziell reduzierte O_2 -Verbrauch der Mutantenmitochondrien auf das UCP3 Defizit zurückzuführen ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Da die Messwerte generell eine relativ hohe Streuung aufweisen, könnte durch eine Erhöhung der Stichproben die mögliche Tendenz eines etwas erniedrigten O_2 -Verbrauchs bei den Mitochondrien ohne UCP3 bestätigt werden.

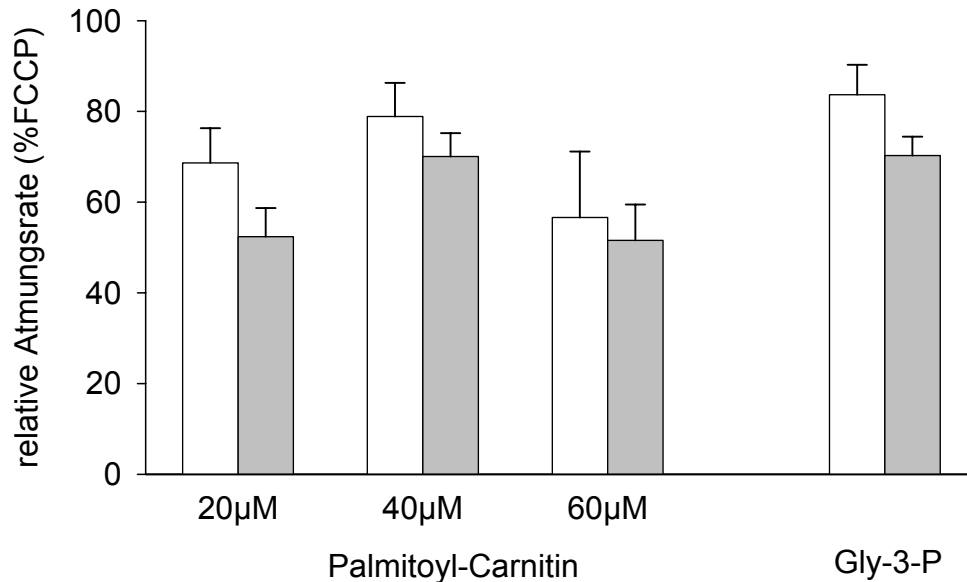


Abb. 45: Mittelwerte (\pm SEM) der relativen Atmungsraten von isolierten BAT-Mitochondrien von Wildtypmammstern (weiße Balken, $n=3$) und Mutanten (graue Balken, $n=5$) mit 20, 40 und 60 μ M Palmitoyl-Carnitin oder 20 mM Glycerol-3-Phosphat (Gly-3-P) als Substrat. Die Messung der Glycerol-3-Phosphat-Atmung erfolgte in Anwesenheit von Rotenon. Die relative Atmungsrate zeigt den prozentualen Anteil der Atmung bei verschiedenen Substraten und Inhibitoren, an der maximalen Atmung nach Entkopplung durch FCCP (=100 %).

Neben der maximalen (entkoppelten) Atmung wurde auch die von UCP1 bzw. von der ATP-Synthese unabhängige Atmung gemessen. Der als *state 4*-Atmung bezeichnete Sauerstoffverbrauch wird nach Inhibition der ATP-Synthase mit Oligomycin gemessen. *In vivo* wird die *state 4*-Atmung erreicht, wenn ADP vollständig zu ATP phosphoryliert wurde und die ATP-Synthase nicht aktiv ist. Die dann noch erfolgende Restatmung repräsentiert die so genannte „leak“- oder Leck-Atmung. Der Anteil der Leck-Atmung ist in den Mitochondrien aus unterschiedlichen Geweben verschieden (Rolfe and Brand, 1996). Im Skelettmuskel trägt das Protonenleck zu 17-21 % des basalen Sauerstoffverbrauchs bei, in der Leber beträgt der Anteil nur 3-5 %. Es wird angenommen, dass das Protonenleck einen Beitrag zum Grundumsatz bzw. der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur im Ruhezustand von endothermen Tieren liefert. In der Summe trägt das Protonenleck von allen Geweben

oder Organen vermutlich zu 17-31 % des Grundumsatzes bei. Die Ursache für die durch das Protonenleck bewirkte Entkopplung der Atmung konnte jedoch bislang nicht geklärt werden. Auch eine Beteiligung der Entkopplerproteine an der Erzeugung der Leckatmung wird diskutiert.

Durch Zugabe von GDP zu den BAT-Mitochondrien wird UCP1 inhibiert und es findet demzufolge nur noch die an die ATP-Synthese gekoppelte Atmung bzw. die Leck-Atmung statt. Bei den BAT-Mitochondrien wurde auf die Zugabe von Oligomycin zur Ermittlung der *state 4*-Atmung verzichtet, da mehrfach gezeigt werden konnte, dass die Konzentration bzw. die Aktivität der ATP-Synthase in BAT-Mitochondrien so gering ist, dass nach Oligomycinzugabe keine Änderung im Sauerstoffverbrauch erfolgt (Liebig, 2000; Liebig et al., 2004). Die *state 4*-Atmung in den BAT-Mitochondrien der Hamster wird also durch den Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von GDP repräsentiert.

Nach Zugabe von GDP betrug die UCP1 unabhängige Atmung noch rund 60 % der maximalen Glycerol-3-Phosphat Atmung. Die GDP gekoppelte Atmung bei Wildtyp und Mutantenmitochondrien unterschied sich nicht.

Vergleicht man die Raten der UCP1 unabhängigen Atmung mit Palmitoyl-Carnitin als Substrat, so ist wie mit Glycerol-3-Phosphat kein Unterschied zwischen den beiden Phänotypen feststellbar. Es ist demnach nicht wahrscheinlich, dass UCP3 einen bedeutenden Beitrag zur Leck-Atmung leistet. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass nicht nur UCP1, sondern auch UCP3 in den Wildtypmitochondrien durch GDP inhibiert wurde und daher kein Unterschied in der Atmung zwischen Wildtypen und Mutanten messbar war. Es gibt verschiedene Untersuchungen in heterologen Systemen, in denen eine Kopplung des Protonentransports über UCP3 durch Purinnucleotide inhibiert wurde (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2002). In einer Studie konnte sogar gezeigt werden, dass UCP3 durch GDP offensichtlich effizienter gekoppelt wird als UCP1 (Echtay et al. 1999).

Interessanterweise war die Effizienz der Kopplung von UCP1 durch GDP bei Fettsäureveratmung wesentlich höher als mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat. Die maximale Atmung mit Palmitoyl-Carnitin als Substrat wurde durch GDP-Zugabe auf eine Restatmung von durchschnittlich 30 % reduziert, während mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat noch 60 % der Atmung erfolgten. Die Atmungsrate nach Kopplung von UCP1 durch GDP mit Palmitoyl-Carnitin als Substrat war mit der Rate der gekoppelten Atmung vergleichbar, die bei 25°C mit *sn*-Glycerol-3-Phosphat als Substrat gemessen wurde (~40 %) (Liebig et al 2004). Demzufolge scheint die Kopplung von UCP1 durch GDP temperatur- und substratabhängig zu sein.

Bestätigt wird die Substratabhängigkeit der UCP1-Kopplung durch GDP zudem dadurch, dass nach Inhibition der Fettsäureatmung durch Rotenon und anschließender Zugabe von Glycerol-3-Phosphat der Sauerstoffverbrauch wiederum auf etwa 60 % der maximalen Atmung anstieg. Es konnte damit in zwei unabhängigen Messungen (Abb. 36/37 und 40/41) der substratabhängige Unterschied der Kopplungseffizienz von UCP1 durch GDP beobachtet werde. Die geringere GDP-Sensitivität von UCP1 in den BAT-Mitochondrien vom Hamster bei Temperaturen über 25°C konnte zudem auch in anderen Experimenten festgestellt werden (Braulke, 2003).

Eine mögliche Erklärung der substratabhängigen Kopplungseffizienz des GDP könnte mit Unterschieden im Membranpotential zusammenhängen. Würde Glycerol-3-Phosphat zum Aufbau eines höheren Membranpotentials führen, so wäre es denkbar, dass es zu einer verstärkten UCP1-vermittelten Entkopplung kommt. Das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran beeinflusst nachweislich die H⁺-Transportfunktion von UCP1 (Klingenberg and Huang, 1999). Die Elektronen aus der Glycerol-3-Phosphat-Oxidation werden erst im Komplex III eingespeist und in der Bilanz weniger Protonen gepumpt, als bei der Oxidation von Substraten in den Mitochondrien. Die rasche Verfügbarkeit des Substrats und die Unabhängigkeit der Oxidation vom mitochondrialen Stoffwechsel könnte diese geringere Effizienz aber kompensieren. Wenn die Glycerol-3-Phosphat-Oxidation zu einem erhöhten Membranpotential führen würde, könnte dies wiederum die Bildung von Sauerstoffradikalen fördern. Eine Erniedrigung des Membranpotentials durch UCP1 oder möglicherweise durch andere UCPs könnte die Mitochondrien letztlich vor übermäßiger ROS Belastung schützen, was die geringere Kopplung nach GDP-Zugabe erklären könnte.

Parallele Messungen des Membranpotentials und der Atmung bei Wildtyp- und Mutantenmitochondrien mit Glycerol-3-Phosphat oder Palmitoyl-Carnitin als Substrat in Anwesenheit von GDP, haben allerdings keine eindeutigen Hinweise auf Unterschiede im Membranpotential ergeben, welche diese Annahmen stützen würden (von Praun, unveröffentlicht).

Die Ursachen für die substratabhängigen Unterschiede in der GDP-Kopplung von UCP1 können an dieser Stelle also nicht geklärt werden. Es wird aber deutlich, dass die Regulation der UCP1 vermittelten Entkopplung nicht nur von zwei Faktoren, also von Fettsäuren und Purinnucleotiden beeinflusst wird, sondern auch noch andere Regulationsmechanismen existieren. Wichtige bekannte Parameter sind beispielsweise neben Fettsäuren und dem

Membranpotential, auch die ATP⁴⁻-Konzentration und der pH-Wert (Klingenberg and Huang, 1999).

Anders als bei den BAT-Mitochondrien der Hamster ohne UCP3 konnte in Skelettmuskel-Mitochondrien von UCP3^{-/-}-Mäusen eine Erniedrigung der *state 4*-Atmung mit Malat/Succinat als Substrat festgestellt werden (Bezaire et al., 2001; Vidal-Puig et al., 2000). Das Membranpotential in diesen Mitochondrien war zudem erhöht. Die stärkere Kopplung der Mitochondrien aus UCP3^{-/-}-Mäusen würde die Hypothese einer Beteiligung von UCP3 am basalen Protonenleck stützen.

Wie schon die Messungen der Fettsäureoxidation in Gewebeproben angedeutet haben, wird die β -Oxidation in den BAT-Mitochondrien vom Hamster offensichtlich nicht UCP3 abhängig reguliert. Bei Abwesenheit von UCP3 wird die β -Oxidationskapazität nicht beeinträchtigt. Diese Resultate widersprechen Rückschlüssen, die aus Analysen der Oxidation in Muskelmitochondrien gemacht wurden (Moreno et al., 2003).

Die Oxidation in Ratten-Mitochondrien aus dem *Gastrocnemius*, einem überwiegend aus glycolytischen Fasern bestehendem Muskel, wurde bei unterschiedlich hohem UCP3-Gehalt verglichen. Die UCP3 Expression im Skelettmuskel der Ratten wurde durch Fasten und zusätzliche T₃-Behandlung induziert bzw. der UCP3-Gehalt variiert. Thyroidhormon besitzt neben der Stimulation der Thermogenese auch eine entscheidende Funktion bei der Regulation des Energiehaushaltes (Moreno et al., 2003; Muller, 1997). Infolge von Fasten wurde die Expression von UCP3 gegenüber Muskeln aus *ad libitum* gefütterten Tieren um das 2.6-fache erhöht, bei zusätzlicher T₃-Gabe erfolgt eine weitere Verdopplung des Expressionslevels. Die Messung der Oxidationskapazität in den drei Mitochondrientypen mit Palmitoyl-Carnitin als Substrat ergab einen signifikanten Unterschied im Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien aus gefasteten und T₃-behandelten Ratten. In den Mitochondrien aus gefasteten Ratten war eine etwa 50 % ige Erhöhung gegenüber den Kontrollen messbar, nach zusätzlicher T₃-Behandlung war die Atmungsrate mehr als dreifach erhöht. Allerdings kann anhand der vorgestellten Daten kein direkter, funktioneller Zusammenhang mit dem erhöhten UCP3-Gehalt gesehen werden, da eine T₃-Behandlung von UCP3^{-/-}-Mäusen einen mit Wildtypen vergleichbaren Anstiege im Ruheumsatz bewirkt (Gong et al 2000). Der T₃-abhängige Anstieg in der Stoffwechselaktivität erfolgt demnach unabhängig von UCP3.

Beim Vergleich der Befunde aus den gefasteten, T₃ behandelten Ratten und UCP3^{-/-}-Mäusen und den Ergebnissen aus den Experimenten an Hamstern muss bedacht werden, dass ein

Vergleich nur bedingt möglich ist, da Skelettmuskel- und BAT-Mitochondrien sich in ihrer Proteinausstattung und Funktion bedeutend unterscheiden.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die *in vitro* Messungen der β -Oxidationskapazität in BAT- und Skelettmuskel-Gewebeproben mit entweder fehlender oder unterschiedlich hoher UCP3-Expression, sowie die Messung der Oxidation in isolierten BAT-Mitochondrien, keinerlei Hinweise auf einen regulativen Zusammenhang der Fettsäureoxidation und UCP3 geben. Weder Änderungen in der UCP3-Proteinkonzentration, noch das Fehlen des Proteins beeinflusst die Stoffwechselaktivität von BAT und Skelettmuskel. Eine Rolle von UCP3 im Fettsäurestoffwechsel wird damit nicht generell ausgeschlossen, jedoch ist eine direkte, regulative Funktion nicht anzunehmen.

4.5 Fazit zur UCP3 Funktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Bedeutung von UCP3 für den Fettsäurestoffwechsel, sowie eine mögliche Entkopplerfunktion des Proteins untersucht. Die gewonnenen Resultate der Expressionsstudien und der *in vitro* Fettsäurestoffwechselfmessungen in Hamstern mit UCP3 Defizit im BAT haben gezeigt, dass UCP3 zwar offensichtlich eine Funktion im Fettsäurestoffwechsel besitzt, eine direkte Regulation der mitochondrialen β -Oxidation durch UCP3 erfolgt allerdings nicht. Eine fettsäureabhängige, entkoppelnde Wirkung von UCP3 konnte nach Expression in HEK293 nicht bestätigt werden.

Betrachtet man die Analysen der Entkopplerfunktion in heterologen bzw. homologen Expressionssystemen, sowie die Untersuchungen des Stoffwechsels *in vivo* und *in vitro* in transgenen und *knock out* Tieren so wird deutlich, dass eine UCP3-Aktivität bislang fast ausschließlich nach Überexpression gezeigt werden konnte (Tab. 6). Nach Überexpression konnte sowohl ein erhöhter Fettsäurestoffwechsel, als auch eine erhöhte Protonendurchlässigkeit der Mitochondrienmembran festgestellt werden.

Die Resultate aus diesen Studien liefern allerdings keine überzeugenden Argumente bezüglich der Funktion von UCP3. Die Analyse der Bedeutung von UCP3 für den Stoffwechsel bei natürlicher Regulation des Proteins, sowie nach einem *knock out* des Gens gibt wahrscheinlich eher Aufschluss über seine physiologische Funktion.

Analysen der Expressionsregulation von UCP3 haben eindeutig gezeigt, dass die Expression von UCP3 abhängig von der Aktivität des Fettsäurestoffwechsels im Gewebe reguliert wird. Zudem wird UCP3 ausschließlich im BAT und Skelettmuskel exprimiert, also in Geweben, die eine hohe (Fettsäure-) Stoffwechselaktivität bzw. Kapazität besitzen. Eine Funktion von UCP3 im Fettsäurestoffwechsel ist demnach sehr offensichtlich.

Überzeugende Hinweise auf eine Bedeutung von UCP3 in der Radikalabwehr, konnten an Skelettmuskelmitochondrien gewonnen werden (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2002). Infolge einer natürlichen Induktion der UCP3 Expression nach Fasten, konnte bei Superoxid-Zugabe eine fettsäureabhängige, GDP-sensitive Protonendurchlässigkeit der Membran beobachtet werden, während in Mitochondrien aus UCP3^{-/-}-Mäusen dieser Effekt ausblieb. Ohne Fettsäuren und Superoxid erfolgt offenbar keine UCP3 abhängige Entkopplung (Cadenas et al., 1999); von Praun, unveröffentlicht).

Tab. 6: Zusammenfassung der bisherigen Befunde zum Einfluss von UCP3 auf den mitochondrialen O_2 -Verbrauch (VO_2), das Membranpotential ($\Delta\Psi$) und den Fettsäurekatabolismus nach Überexpression in heterologen und homologen Systemen, in transgenen Mäusen (UCP3tg), sowie bei natürlicher Induktion (Fasten, T_3) und in *knock out* Mäusen (UCP3^{-/-}) und Hamstern (*P.S.*). FS=Fettsäuren, ROS=Superoxid, TF= transfiziert, T_3 =Triiodthyronin; *Referenzen über Fettsäurestoffwechselanalysen;

<i>UCP3 mRNA</i>	<i>System/Behandlung</i>	VO_2	$\Delta\Psi$	<i>FS-Stoffwechsel*</i>	<i>Referenz</i>
↑	Hefemitochondrien	↑	↓		<i>Zhang et al. 1999</i>
↑	Hefemitochondrien + ROS	↑	↓		<i>Echtay et al 2002</i>
↑	TF INS-Zellen	↑		↑	<i>*Hong et al 2001</i>
↑	TF primäre Myoblasten			↑	<i>*Garcia-Martinez et al. 2001</i>
↑	TF HEK293	→			<i>diese Arbeit</i>
↑	SkM Mitochondrien UCP3tg Mäuse		↓	↑	<i>*Wang et al. 2003 Cadenas et al. 2002</i>
↑	SkM Mitochondrien gefastet (vs <i>ad lib</i>)	→	→		<i>Cadenas et al 1999 Echtay et al 2002</i>
→	SkM Mitochondrien +ROS+FS		↓		<i>Echtay et al 2002</i>
↑	SkM Mitochondrien gefastet +ROS+FS		↓		<i>Echtay et al 2002</i>
↑	SkM Mitochondrien gefastet + T_3	↑	↓	↑	<i>*Moreno et al. 2003</i>
-	SkM Mitochondrien UCP3 ^{-/-} -Mäuse	→↓	→↓	↓ (RQ↑)	<i>Vidal-Puig et al. 200, Gong et al. 2000 *Bezaire 2002</i>
-	SkM Mitochondrien UCP3 ^{-/-} + ROS		→		<i>Echtay et al 2002</i>
-	UCP3^{-/-} BAT Mitochondrien <i>P.S.</i>	→	→	→	<i>Liebig et al. 2004 *diese Arbeit von Praun (unveröffentlicht)</i>
-	UCP3^{-/-} BAT Gewebe <i>P.S.</i>			→	<i>*diese Arbeit</i>

Auf diesen Befunden, nach denen sowohl ein möglicher funktioneller Zusammenhang von UCP3 mit dem Fettsäurestoffwechsel, als auch mit der Radikalabwehr besteht, fußt eine (kürzlich) von Schrauwen et al. vorgestellte Hypothese (Schrauwen et al., 2001; Schrauwen et al., 2003). Darin wird dem UCP3 eine Funktion als Fettsäureexporter zugewiesen, der freie Fettsäuren aus den Mitochondrien transportiert, um letztlich die Bildung von Sauerstoffradikalen zu verhindern.

Freien Fettsäuren können durch einen so genannten „flip-flop“-Mechanismus in die Mitochondrien gelangen. Die innere Mitochondrienmembran ist für unveresterte Fettsäuren weitgehend undurchlässig, allerdings können neutrale Fettsäuren in die Mitochondrienmembran inkorporiert werden und schließlich in die Mitochondrienmatrix gelangen (Wojtczak et al., 1998). In der Matrix werden die Fettsäuren aufgrund des pH-Gradienten deprotoniert, was letztlich einen Entkopplungseffekt durch einen H^+ -Import bedeutet. Daraus resultiert letztlich eine Erniedrigung des Membranpotentials bzw. des Protonengradienten. Die freien Fettsäuren können nicht über den β -Oxidationsweg abgebaut werden und akkumulieren folglich in der Matrix. Freie Fettsäuren sind potentiell zelltoxisch, da sie zur Lipid-Peroxydation tendieren und somit Radikale generieren bzw. selber als Radikal den Zellorganellen schaden können (Halliwell and Gutteridge, 2000; Brand et al., 2002). Die von Schrauwen et al. beschriebene Bedeutung von UCP3 besteht also nicht in der direkten Regulation der mitochondrialen β -Oxidation, sondern letztlich in der Vermeidung der Radikalbildung durch Fettsäureperoxydation in den Mitochondrien. Die Hypothese schließt nicht aus, dass auch die nach Himms-Hagen und Harper aus der MTE-I-katalysierten Hydrolyse stammenden Fettsäuren über UCP3 heraustransportiert werden.

Des Weiteren wird die Hypothese dadurch gestützt, dass besonders in glycolytischen Muskelzellen mit geringerer Fettsäureoxidationskapazität, die UCP3-Expression bei erhöhtem intrazellulären Fettsäurespiegel deutlich induziert wird. Bei hohen Fettsäurekonzentrationen besteht eher das Problem des unerwünschten „flip-flops“ von Fettsäuren in die Mitochondrien.

Auch Untersuchungen an hFABP *knock out* Mäusen liefern unterstützende Befunde für die Rolle des UCP3 als Fettsäureexporter. Das *heart type fatty acid binding protein* (hFABP) bindet frei im Cytosol vorliegende Fettsäuren. Es kontrolliert damit die intrazelluläre Fettsäurekonzentration und sorgt für eine erleichterte Fettsäureaufnahme in die Zelle. Im BAT wird die hFABP nach Kälteexposition bei Ratten verstärkt exprimiert (Daikoku et al., 2000). In hFABP *knock out* Mäusen ist die intrazelluläre Konzentration an freien Fettsäuren durch das Fehlen von hFABP stark erhöht (Schrauwen et al., 2003). Bei diesen Mäusen konnte auch

eine vielfach erhöhte UCP3-Expression nachgewiesen werden. Der offensichtliche Zusammenhang von Fettsäurekonzentration und UCP3-Expression im Skelettmuskel und BAT kann demnach wieder bestätigt werden.

Die von Schrauwen et al. postulierte Hypothese könnte durch weitere Experimente an den Hamstern mit UCP3 Defizit im BAT Bestätigung finden. Entscheidend ist zum einen die Aufklärung der gewebespezifischen Promotorregulation. Des Weiteren könnte eine direkte Messung der SOD2-Aktivität in den Mitochondrien von Mutanten und Wildtypen Hinweise auf eine erhöhte Radikalbelastung geben. Daneben müsste die Wirkung von (exogenen) Sauerstoffradikalen auf die Entkopplung der mitochondrialen Atmung und das Membranpotential in Anwesenheit von Fettsäuren überprüft werden.

Es wäre außerdem interessant zu klären, ob tatsächlich eine verstärkte Akkumulation von Fettsäuren in den Mitochondrien von Hamstern ohne UCP3 erfolgt und ob demzufolge vermehrt Lipidperoxide in diesen Mitochondrien nachweisbar sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen eine mögliche Funktion der mitochondrialen Transportproteine mUCP2, mUCP3 und dmeUCPx als Protonentransporter bzw. Entkopplerprotein untersucht. Für diese Analysen wurde ein Testsystem etabliert, mit dem ein möglicher Einfluss der Entkopplerproteine auf die Atmung von HEK293-Zellen nach transienter Expression nachgewiesen werden konnte. Da UCP1 das bislang einzige funktionell charakterisierte Mitglied der Entkopplerproteinfamilie ist, wurde das Messverfahren zunächst mit UCP1 transfizierten HEK293-Zellen validiert. Es wurden zwei Zellgruppen mit unterschiedlich hohem UCP1-Proteingehalt mit Kontrollzellen verglichen, die mit dem leeren Vektor transfiziert waren. Die Expression und Inkorporation von UCP1 und von UCP3 in die Mitochondrien von HEK293-Zellen konnte mittels Western-Blots bestätigt werden.

Die O₂-Verbrauchsmessungen haben gezeigt, dass bei einer hohen UCP1-Konzentration die basale Atmung der Zellen signifikant höher ist als bei Kontrollen bzw. Zellen mit geringerem UCP1-Gehalt. Nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin wurde der Sauerstoffverbrauch bei den Kontrollzellen um ~75 % gesenkt. Die Atmung der Zellen mit wenig UCP1 wurde um ~65 % und von Zellen mit hoher UCP1-Konzentration nur um ~48 % gesenkt, demnach waren die UCP1-Zellen weniger gekoppelt. Es ist denkbar, dass diese nicht regulierte Entkopplung durch defekte UCP1-Proteine verursacht wurde.

Nach Fettsäurezugabe erhöhte sich die Atmungsrate der UCP1-Zellen signifikant, während bei den Kontrollen keine Steigerung der Atmung erfolgte. Unabhängig vom Proteingehalt wurde die relative Atmung, bezogen auf die maximale Atmung in Anwesenheit von FCCP, bei den UCP1-Zellen durch Palmitat um durchschnittlich 15 % gegenüber der oligomycininsensitiven Atmung gesteigert. Damit wurde bestätigt, dass auch funktionsfähiges UCP1 exprimiert wurde, da eine regulierte fettsäureabhängige Aktivierung erfolgte.

Bei den Zellen die mit mUCP2 und mUCP3 transfizierten waren, konnte weder eine erhöhte entkoppelte Atmung in Anwesenheit von Oligomycin, noch eine durch Fettsäuren induzierte Entkopplung festgestellt werden. Eine mit UCP1 vergleichbare Entkopplerfunktion von mUCP2 und mUCP3 konnte mit den hier durchgeführten Messungen nicht bestätigt werden. Offensichtlich haben Fettsäuren allein keinen aktivierenden Einfluss auf die Proteine. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass mUCP2 und mUCP3 unter den gegebenen Versuchsbedingungen deaktiviert waren.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Firma Develogen (Göttingen) wurde des Weiteren mit dem hier etablierten Messsystem, eine mögliche Entkopplerfunktion des dmeUCPx, einem UCP4-Ortholog aus *Drosophila melanogaster* in HEK293-Zellen untersucht. Zudem wurde ein vermuteter regulatorischer bzw. inhibitorischer Einfluss des mitochondrialen Folat-Carriers mSOUP auf die UCP vermittelte Entkopplung, nach Koexpression mit dmeUCPx und mUCP1 in HEK293-Zellen geprüft.

Die Messungen haben ergeben, dass transient exprimiertes dmeUCPx unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Atmung von HEK293-Zellen hat. Es konnte weder eine fettsäureinduzierte, noch eine fettsäureunabhängige Entkopplung nachgewiesen werden. Die Koexpression von mSOUP mit dmeUCPx oder mUCP1 hat zudem keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmung der Zellen bzw. auf die UCP1 vermittelte Entkopplung gezeigt. Es gab keine Hinweise auf eine regulative Funktion von mSOUP.

In einem zweiten Versuchsteil dieser Arbeit wurde die Funktion bzw. die Bedeutung von UCP3 als Regulator des mitochondrialen Fettsäurestoffwechsels in Dsungarischen Zwerghamstern mit UCP3 Defizit im BAT untersucht.

Die Mutanten exprimieren aufgrund einer bislang noch unbekanntes, spontanen Mutation kein UCP3 im braunen Fettgewebe, die Expression im Skelettmuskel der Tiere ist nicht beeinträchtigt. Der Phänotyp der Hamster konnte bislang nur anhand von Analysen der UCP3 mRNA-Expression im BAT eindeutig nachgewiesen werden. Eine kürzlich begonnene Analyse der UCP3-Gensequenz von Wildtypen und Mutanten hat zwei Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNP1//SNP2) im ersten Intron des UCP3-Gens aufgedeckt, die möglicherweise für das Fehlen der UCP3-Expression im BAT verantwortlich sind. Die Genotypanalyse von 34 Wildtypen und sechs Mutanten in der vorliegenden Arbeit hat die Vermutung gestützt, dass ein Zusammenhang der SNPs mit dem Phänotyp besteht. Es konnte gezeigt werden, dass Tiere, die nachweislich für SNP2 oder beide SNPs homozygot (G/G//A/A) oder heterozygot (A/G//G/A) waren UCP3 im BAT exprimierten. Hamster die phänotypisch als Mutanten charakterisiert wurden besaßen den (A/A//G/G)-Genotyp.

Zur Analyse einer möglichen Funktion oder regulativen Bedeutung von UCP3 im Fettsäurestoffwechsel wurden Wildtyphamster und Mutanten sieben Tage kälteexponiert, 48 h gefastet oder unter Kontrollbedingungen bei 23°C mit *ad libitum* Futter gehalten.

Von Wildtypen und Mutanten wurde die Genexpression von UCP3, sowie von der mitochondriale Thioesterase (MTE-I) und der Carnitin-Palmitoyltransferase-I (CPT-I) nach Fasten oder Kälteexposition im BAT analysiert und mit Kontrollen verglichen. Die Expressionsanalyse sollte Hinweise auf eine mögliche Störung des Fettsäurestoffwechsels bei den Mutanten geben. Zudem wurde die UCP3 und die MTE-I mRNA-Expression im Skelettmuskel analysiert.

Bei den Mutanten konnten weder das UCP3-Protein noch die mRNA im BAT nachgewiesen werden. Bei Wildtypen waren keine Unterschiede im mRNA-Spiegel zwischen Kontrollen, gefasteten und kaltakklimatisierten Hamstern feststellbar. Der Proteingehalt der kalteexponierten Tiere war allerdings 3-fach höher und bei den gefasteten Tieren tendenziell erniedrigt gegenüber den Kontrollen.

Die MTE-I katalysiert die Hydrolyse von Acyl-CoA in den Mitochondrien und reguliert so vermutlich den mitochondrialen Coenzym A-Pool. Die Analyse mRNA-Expression der MTE-I in Wildtyphamstern und Mutanten hat gezeigt, dass offenbar keine gekoppelte Regulation der Expression der MTE-I und UCP3 im BAT und Skelettmuskel erfolgt. Zum einen ist die MTE-I-Expression bei Mutanten ohne UCP3 nicht beeinflusst, zum anderen besteht im BAT eine gegenläufige Expressionsregulation der MTE-I und UCP3 nach Fasten. Demnach besteht offensichtlich keine direkte funktionelle Kopplung zwischen beiden Proteinen. Man kann jedoch feststellen, dass die Regulation von UCP3 und der MTE-I offenbar abhängig vom Fettsäurestoffwechsel im Gewebe erfolgt.

Die CPT-I ist ein Schlüsselenzym des mitochondrialen Fettsäurestoffwechsels. Sie katalysiert den Transport von Fettsäuren als Acyl-Carnitin in die Mitochondrien. Die mRNA-Expression der CPT-I im BAT der Wildtypen und Mutanten war weder nach Fasten noch bei Kaltakklimatisierung verändert gegenüber den Kontrolltieren. Demzufolge gab es keine Anzeichen für eine veränderte Regulation oder eine Inhibition des Fettsäureimports in die Mitochondrien der Mutanten.

Die Fettsäureoxidationskapazität des BAT und des *Tibialis anterior* von Wildtyphamstern und Mutanten wurde *in vitro* von Gewebeproben aus gefasteten, kaltakklimatisierten und Kontrollhamster analysiert, sowie von isolierten BAT-Mitochondrien aus kalteexponierten Wildtypen und Mutanten bestimmt.

Diese Messungen haben ergeben, dass die mitochondriale β -Oxidationskapazität des BAT offensichtlich nicht durch das Fehlen von UCP3 beeinträchtigt wird. In Geweben von kaltakklimatisierten Wildtypen, bei denen eine dreifache UCP3-Proteininduktion nachgewiesen wurde und in Mutanten ohne UCP3, konnte eine $\sim 20\%$ höhere Fettsäureaufnahme gemessen werden. Infolge von Kälteexposition erfolgt demnach eine Steigerung des Fettsäurestoffwechsels im BAT. Gewebe der 48 h gefasteten und von Kontrolltiere unterschieden sich nicht.

Der Fettsäurestoffwechsel im *Tibialis anterior* ist signifikant bis zu 50 % niedriger als im BAT. Kälteexposition oder Fasten haben bei beiden Phänotypen keinen Einfluss auf die Fettsäureoxidationsrate in diesem Gewebe. Die nachgewiesene 3-fache Induktion der UCP3-mRNA-Expression bei Fasten hat demnach keine direkte Auswirkung auf den Fettsäurestoffwechsel des *Tibialis anterior*.

Auch die Messung des Fettsäurestoffwechsels in isolierten BAT-Mitochondrien von sieben Tage kaltakklimatisierten Wildtypen und Mutanten hat keine eindeutigen Hinweise auf eine Störung der mitochondrialen β -Oxidation durch das UCP3 Defizit ergeben. Der O_2 -Verbrauch mit Palmitoyl-Carnitin ist nicht signifikant verschieden zwischen Wildtyp- und Mutantenmitochondrien. Die Atmungsrate mit Fettsäuren oder mit Glycerol-3-Phosphat als Substrat sind bei beiden Phänotypen vergleichbar. Es konnte festgestellt werden, dass offensichtlich eine Substrat- und Temperaturabhängigkeit der Kopplungseffizienz des UCP1 durch GDP besteht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Messungen des Fettsäurestoffwechsels und die Genexpressionsstudien haben keinen direkten funktionellen Zusammenhang oder einen regulativen Einfluss von UCP3 auf den Fettsäurestoffwechsel bestätigen können

Eine postulierte Bedeutung von UCP3 bei der Radikalabwehr wurde anhand der mRNA-Expression der mitochondrialen Superoxid-Dismutase 2 in 28 Tage kaltakklimatisierten Wildtypmännern und Mutanten geprüft. Es konnte allerdings keine erhöhte mRNA-Expression der SOD2 im BAT der Mutanten festgestellt werden. Eine erhöhte Radikalbelastung ist dennoch nicht auszuschließen, da die mRNA-Expression allein keinen Rückschluss auf den tatsächlichen Proteingehalt oder die Enzymaktivität zulässt.

6 LITERATUR

Aquila,H., Link,T.A., and Klingenberg,M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *Embo J* 4, 2369-2376.

Arsenijevic,D., Onuma,H., Pecqueur,C., Raimbault,S., Manning,B.S., Miroux,B., Couplan,E., Alves-Guerra,M.C., Gubern,M., Surwit,R., Bouillaud,F., Richard,D., Collins,S., and Ricquier,D. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435-439.

Bezaire,V., Hofmann,W., Kramer,J.K., Kozak,L.P., and Harper,M.E. (2001). Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in Ucp3(-/-) and wild-type mice. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 281, E975-E982.

Böckler, H. Topographie der Wärmebildung und Hierarchie Thermoregulatorischer Mechanismen im Jahreszeitlichen Verlauf beim Dsungarischen Zwerghamster, *Phodopus sungorus sungorus* (Pallas). 1985. (Dissertation)

Boss,O., Muzzin,P., and Giacobino,J.P. (1998). The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinology* 139, 1-9.

Boss,O., Samec,S., Paolonigiacobino,A., Rossier,C., Dulloo,A.G., Seydoux,J., Muzzin,P., and Giacobino,J.P. (1997). Uncoupling protein-3: A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408, 39-42.

Bouillaud,F., Arechaga,I., Petit,P.X., Raimbault,S., Levimeyrueis,C., Casteilla,L., Laurent,M., Rial,E., and Ricquier,D. (1994). A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *EMBO Journal* 13, 1990-1997.

Bouillaud,F., Weissenbach,J., and Ricquier,D. (1986). Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J Biol Chem* 261, 1487-1490.

Brand,M.D., Pamplona,R., Portero-Otin,M., Requena,J.R., Roebuck,S.J., Buckingham,J.A., Clapham,J.C., and Cadenas,S. (2002). Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem. J* 368, 597-603.

Braulke, L. Der Einfluß von zweifach und dreifach ungesättigter Fettsäuren auf das Torporverhalten und die mitochondriale Respiration des Dsungarischen Zwerghamsters *Phodopus sungorus*. 2003. (Diplomarbeit)

Braun,J.E.A. and Severson,D.L. (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* 287, 337-347.

Cadenas,S., Buckingham,J.A., Samec,S., Seydoux,J., Din,N., Dulloo,A.G., and Brand,M.D. (1999). UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS. Lett.* 462, 257-260.

- Cadenas,S., Echtay,K.S., Harper,J.A., Jekabsons,M.B., Buckingham,J.A., Grau, E., Abuin,A., Chapman,H., Clapham,J.C., and Brand,M.D. (202). The Basal Protonconductance of Skeletal Muscle Mitochondria from Transgenic Mice Overexpressing or Lacking Uncoupling Protein-3. *J.Biol.Chem.* 277, 2773-2778.
- Cannon,B. and Lindberg,O. (1979). Mitochondria from brown adipose tissue: isolation and properties. *Methods Enzymol.* 55, 65-78.
- Chomczynski,P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201, 134-139.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clapham,J.C., Arch,J.R., Chapman,H., Haynes,A., Lister,C., Moore,G.B., Piercy,V., Carter,S.A., Lehner,I., Smith,S.A., Beeley,L.J., Godden,R.J., Herrity,N., Skehel,M., Changani,K.K., Hockings,P.D., Reid,D.G., Squires,S.M., Hatcher,J., Trail,B., Latcham,J., Rastan,S., Harper,A.J., Cadenas,S., Buckingham,J.A., Brand,M.D., and Abuin,A. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406, 415-418.
- Clapham,J.C., Coulthard,V.H., and Moore,G.B. (2001). Concordant mRNA expression of UCP-3, but not UCP-2, with mitochondrial thioesterase-1 in brown adipose tissue and skeletal muscle in db/db diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 1058-1062.
- Cormack,B.P., Valdivia,R.H., and Falkow,S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Daikoku,T., Shinohara,Y., Shima,A., Yamazaki,N., and Terada,H. (2000). Specific elevation of transcript levels of particular protein subtypes induced in brown adipose tissue by cold exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 263-272.
- DosSantos,R.A., Alfadda,A., Eto,K., Kadowaki,T., and Silva,J.E. (2003). Evidence for a compensated thermogenic defect in transgenic mice lacking the mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene. *Endocrinology*.
- Dulloo,A.G., Samec,S., and Seydoux,J. (2001). Uncoupling protein 3 and fatty acid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 785-791.
- Echtay,K.S. and Brand,M.D. (2001). Coenzyme Q induces GDP-sensitive proton conductance in kidney mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 763-768.
- Echtay,K.S., Liu,Q.Y., Caskey,T., Winkler,E., Frischmuth,K., Bienengraber,M., and Klingenberg,M. (1999). Regulation of UCP3 by nucleotides is different from regulation of UCP1. *FEBS Lett* 450, 8-12.
- Echtay,K.S., Roussel,D., St Pierre,J., Jekabsons,M.B., Cadenas,S., Stuart,J.A., Harper,J.A., Roebuck,S.J., Morrison,A., Pickering,S., Clapham,J.C., and Brand,M.D. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96-99.
- Echtay,K.S., Winkler,E., Frischmuth,K., and Klingenberg,M. (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1416-1421.

- Echtay, K.S., Winkler, E., and Klingenberg, M. (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408, 609-613.
- Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., and Kozak, L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94.
- Figala, J., Hoffmann, K., and Goldau, G. (1973). Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodopus sungorus* Pallas. *Oecologia* 12, 89-118.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., and Warden, C.H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 15, 269-272.
- Flint, W.E. (1966). Der Zwerghamster der Präarktischen Fauna. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg).
- Fromme, T. Regulation des UCP3-Gens in *Phodopus sungorus*. 2003. (Diplomarbeit)
- Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E., and Lodish, H.F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2005-2010.
- Garcia-Martinez, C., Sibille, B., Solanes, G., Darimont, C., Mace, K., Villarroya, F., and Gomez-Foix, A.M. (2001). Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation. *FASEB J.* 15, 2033-2035.
- Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modriansky, M., Vassanelli, S., and Jezek, P. (1996). On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* 271, 2615-2620.
- Gervois, P., Torra, I.P., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2000). Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin. Chem. Lab Med.* 38, 3-11.
- Gong, D.W., He, Y.F., Karas, M., and Reitman, M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta 3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 272, 24129-24132.
- Gong, D.W., Monemdjou, S., Gavrilova, O., Leon, L.R., Marcus-Samuels, B., Chou, C.J., Everett, C., Kozak, L.P., Li, C., Deng, C., Harper, M.E., and Reitman, M.L. (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem.* 2000. May. 26;275(21):16251-7. 275, 16251-16257.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.

- Hagen,T. and Lowell,B.B. (2000). Chimeric proteins between UCP1 and UCP3: the middle third of UCP1 is necessary and sufficient for activation by fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 642-648.
- Hagen,T., Zhang,C.Y., Vianna,C.R., and Lowell,B.B. (2000). Uncoupling proteins 1 and 3 are regulated differently. *Biochemistry* 39, 5845-5851.
- Halliwell,B. and Gutteridge,J.M.C. (2000). *Free Radicals in Biology and Medicin.* Oxford Science Publications).
- Hanak,P. and Jezek,P. (2001). Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis--UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett.* 495, 137-141.
- Harris,E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6, 2675-2683.
- Heldmaier,G. and Steinlechner,S. (1981a). Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), living in natural photoperiod. *J Comp Physiol* 142, 429-437.
- Heldmaier,G. and Steinlechner,S. (1981b). Seasonal pattern and energetics of short daily torpor in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Oecologia* 48, 265-270.
- Himms-Hagen,J. and Harper,M.E. (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 226, 78-84.
- Hong,Y., Fink,B.D., Dillon,J.S., and Sivitz,W.I. (2001). Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology* 142, 249-256.
- Jaburek,M., Varecha,M., Gimeno,R.E., Dembski,M., Jezek,P., Zhang,M., Burn,P., Tartaglia,L.A., and Garlid,K.D. (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem.* 274, 26003-26007.
- Jastroch M., Withers K. and Klingenspor M. Identification of Uncoupling Protein 2 in Two Marsupial Species. (2003a) . 96.Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 2003.
- Ref Type: Report
- Jastroch, M. Identifikation von Entkopplerproteinen in Marsupialia und Monotremata: Gewebespezifische Expression und physiologische Regulation von uncoupling protein 2 (UCP2) in *Antechinus flavipes*. (2003b). (Diplomarbeit)
- Kelly,L.J., Vicario,P.P., Thompson,G.M., Candelore,M.R., Doebber,T.W., Ventre,J., Wu,M.S., Meurer,R., Forrest,M.J., Conner,M.W., Cascieri,M.A., and Moller,D.E. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 139, 4920-4927.
- Kerner,J. and Hoppel,C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 1-17.

- Klingenberg, M. and Huang, S.G. (1999). Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 1415, 271-296.
- Klingenspor, M. Genexpression im braunen und weißen Fettgewebe des Dsungarischen Zwerghamsters: Kälteakklimatisierung, Saisonalität und neuronale Kontrolle. 1994. (Dissertation)
- Klingenspor, M., Ivemeyer, M., Wiesinger, H., Haas, K., Heldmaier, G., and Wiesner, R.J. (1996). Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochem. J.* 316, 607-613.
- Kokoszka, J.E., Coskun, P., Esposito, L.A., and Wallace, D.C. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2278-2283.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., and Goglia, F. (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 543, 5-10.
- Ledesma, A., de Lacoba, M.G., and Rial, E. (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* 3, REVIEWS3015.
- Liebig, M. Zitterfreie Thermogenese bei Dsungarischen Zwerghamstern (*Phodopus sungorus*) mit UCP3 Defizit im braunen Fettgewebe. 2000.
- Liebig, M., von Praun, C., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair non-shivering thermogenesis. *Physiological And Biochemical Zoology* . 2004.
- Ref Type: In Press
- Lowell, B.B., Susulic, V.S., Hamann, A., Lawitts, J.A., Himms-Hagen, J., Boyer, B.B., Kozak, L.P., and Flier, J.S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740-742.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H., and Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS. Lett.* 443, 326-330.
- Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J.A., Marrero, P.F., Hegardt, F.G., and Haro, D. (1998). Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* 273, 8560-8563.
- Moore, G.B., Himms-Hagen, J., Harper, M.E., and Clapham, J.C. (2001). Overexpression of UCP-3 in skeletal muscle of mice results in increased expression of mitochondrial thioesterase mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 785-790.
- Moreno, M., Lombardi, A., De Lange, P., Silvestri, E., Ragni, M., Lanni, A., and Goglia, F. (2003). Fasting, lipid metabolism, and triiodothyronine in rat gastrocnemius muscle: interrelated roles of uncoupling protein 3, mitochondrial thioesterase, and coenzyme Q. *FASEB J.* 17, 1112-1114.

- Muller, M.J. (1997). Thyroid hormones and energy and fat balance. *Eur J Endocrinology* 136, 267-268.
- Muoio, D.M., Seefeld, K., Witters, L.A., and Coleman, R.A. (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem. J.* 338 (Pt 3), 783-791.
- Nagashima, Y., Ohno, T., Ogawa, K., and Kuroshima, A. (1995). Effects of fasting and refeeding on some metabolic characteristics of rat brown adipose tissue. *Jpn J Physiol* 45, 645-658.
- Nedergaard, J. and Cannon, B. (1979). Overview-preparation and properties of mitochondria from different sources. *Methods in enzymology*, Vol LV, 3-28.
- Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L., and Casteilla, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11, 809-815.
- Negresalvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L., and Casteilla, L. (1997). Role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11, 809-815.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2001). *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage; Springer Verlag).
- Nicholls, D.G. and Rial, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 399-406.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., and Paradies, G. (2001). Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett.* 509, 435-438.
- Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J. Physiol* 529 Pt 1, 3-10.
- Ricquier, D. and Kader, J.C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 577-583.
- Rock, C.O., Calder, R.B., Karim, M.A., and Jackowski, S. (2000). Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of coenzyme A. *J Biol Chem.* 275, 1377-1383.
- Rolfe, D.F.S. and Brand, M.D. (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Amer J Physiol-Cell Physiol* 40, C1380-C1389.
- Samec, S., Seydoux, J., and Dulloo, A.G. (1998). Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *FASEB J* 12, 715-724.

- Samec,S., Seydoux,J., and Dulloo,A.G. (1999). Skeletal muscle UCP3 and UCP2 gene expression in response to inhibition of free fatty acid flux through mitochondrial beta-oxidation. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 438, 452-457.
- Samec,S., Seydoux,J., Russell,A.P., Montani,J.P., and Dulloo,A.G. (2002). Skeletal muscle heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3, PPARgamma and key enzymes of lipid oxidation. *Pflugers Arch.* 445, 80-86.
- Sanchis,D., Fleury,C., Chomiki,N., Gubern,M., Huang,Q., Neverova,M., Gregoire,F.M., Easlick,J., Raimbault,S., Levi-Meyrueis,C., Miroux,B., Collins,S., Seldin,M.F., Richard,D., Warden,C., Bouillaud,F., and Ricquier,D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 273, 34611-34615.
- Schrauwen,P., Hoeks,J., Schaart,G., Kornips,E., Binas,B., Van De Vusse,G.J., Van Bilsen,M., Luiken,J.J., Coort,S.L., Glatz,J.F., Saris,W.H., and Hesselink,M.K. (2003). Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J.*
- Schrauwen,P., Saris,W.H., and Hesselink,M.K. (2001). An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *FASEB J* 15, 2497-2502.
- Serra,S. and Morgante,L. (1980). [Method of determination of proteins with Coomassie brilliant blue G 250. I. General characteristics and comparative analysis with the biuret method and Lowry's method]. *Boll. Soc. Ital. Biol Sper.* 56, 160-165.
- Skulachev,V.P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100-124.
- Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goeke,N.M., Olson,B.J., and Klenk,D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Stuart,J.A., Harper,J.A., Brindle,K.M., Jekabsons,M.B., and Brand,M.D. (2001). A mitochondrial uncoupling artifact can be caused by expression of uncoupling protein 1 in yeast. *Biochem. J.* 356, 779-789.
- Titus,S.A. and Moran,R.G. (2000). Retrovirally mediated complementation of the glyB phenotype. Cloning of a human gene encoding the carrier for entry of folates into mitochondria. *J Biol Chem.* 275, 36811-36817.
- Tunstall,R.J., Mehan,K.A., Hargreaves,M., Spriet,L.L., and Cameron-Smith,D. (2002). Fasting activates the gene expression of UCP3 independent of genes necessary for lipid transport and oxidation in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 301-308.
- Vidal-Puig,A.J., Grujic,D., Zhang,C.Y., Hagen,T., Boss,O., Ido,Y., Szczepanik,A., Wade,J., Mootha,V., Cortright,R., Muoio,D.M., and Lowell,B.B. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 2000. May. 26;275(21):16258-66. 275, 16258-16266.
- von Praun,C., Burkert,M., Gessner,M., and Klingenspor,M. (2001). Tissue-specific expression and cold-induced mRNA levels of uncoupling proteins in the Djungarian hamster. *Physiol Biochem. Zool.* 74, 203-211.

Wang,S., Subramaniam,A., Cawthorne,M.A., and Clapham,J.C. (2003). Increased fatty acid oxidation in transgenic mice overexpressing UCP3 in skeletal muscle. *Diabetes Obes. Metab* 5, 295-301.

Wiesinger, H. Kälteakklimatisation beim Dsungarischen Zwerghamster, *Phodopus sungorus*. 1989.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Wojtczak,L., Wieckowski,M.R., and Schonfeld,P. (1998). Protonophoric activity of fatty acid analogs and derivatives in the inner mitochondrial membrane: a further argument for the fatty acid cycling model. *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 76-84.

Yu,X.X., Lewin,D.A., Forrest,W., and Adams,S.H. (2002). Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. *FASEB J* 16, 155-168.

Yu,X.X., Lewin,D.A., Zhong,A., Brush,J., Schow,P.W., Sherwood,S.W., Pan,G., and Adams,S.H. (2001). Overexpression of the human 2-oxoglutarate carrier lowers mitochondrial membrane potential in HEK-293 cells: contrast with the unique cold-induced mitochondrial carrier CGI-69. *Biochem. J* 353, 369-375.

Zhang,C.Y., Hagen,T., Mootha,V.K., Sliker,L.J., and Lowell,B.B. (1999). Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system. *FEBS Lett.* 449, 129-134.

LEBENS LAUF

Michaela Liebig

geboren am 22.12.1974 in Bielefeld/ Nordrhein-Westfalen

Schulbildung

1980 bis 1984

Grundschule in Bielefeld

1984 bis 1994

Max-Planck-Gymnasium Bielefeld, Abitur

Hochschulstudium

Oktober 1994

bis April 1997

Biologie-Grundstudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Vordiplom (Dezember 1996)

April 1997

bis Juni 2000

Biologie Hauptstudium an der Philipps-Universität Marburg

Juni 1999

bis Juni 2000

Anfertigung der Diplomarbeit im Fachgebiet Tierphysiologie

Juli bis

Dezember 2000

Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft bei H.D. Dr. M. Klingenspor (Philipps-Universität Marburg)

Januar 2001

Beginn des Promotionsstudiums nach Erhalt eines Stipendiums vom Hessischen Ministerium für Kunst und Wissenschaft

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt HD Dr. Martin Klingenspor der mir ermöglicht hat diese Arbeit anzufertigen und ein hervorragender, geduldiger Betreuer war.

Ein besonderes Dankeschön an Carola und Christa für die Korrektur und die produktive Kritik an dieser Arbeit.

Zudem möchte ich allen danken die durch fachliche Ratschläge und Diskussionen meiner Daten an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt oder mich bei der Laborarbeit unterstützt haben.

Außerdem möchte ich natürlich der gesamten *AG-Heldmaier* für die erholsamen Teepausen und die schöne Zeit an der Uni-Marburg danken.

Besonderen Dank natürlich auch an *Inge*, der mir „in großer Not“ die Hardware für die Fertigstellung der Arbeit zur Verfügung gestellt hat.