

**Regulation der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1
im Verlauf einer Kalorienrestriktion**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Christine Sabine Lörz

Kiel, 2017

Erster Gutacher: Herr Prof. Dr. Edmund Maser

Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2017

Zum Druck genehmigt: 6. Juli 2017

gez. Frau Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltssverzeichnis	i
Abstract	iv
Zusammenfassung	vi
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Das Metabolische Syndrom	1
1.2 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen	3
1.2.1 Cortisol und 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen	3
1.2.2 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1	4
1.3 Regulation der 11 β -HSD1 in unterschiedlichen Gewebe-typen	5
1.3.1 Regulation der 11 β -HSD1 in der Leber	5
1.3.2 Regulation der 11 β -HSD1 im Fettgewebe	6
1.3.3 Regulation der 11 β -HSD1 in der Skelettmuskulatur	7
1.4 Kalorienrestriktion	8
1.5 11 β -HSD1 als Schlüsselenzym im Metabolischen Syndrom	10
1.6 Aufgabenstellung	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien und Reinsubstanzen	12
2.1.2 Puffer, Stammlösungen, Laufmittel	14
2.1.3 Polymerasen, Antikörper, Primer und Enzyme	14
2.1.4 Kits	15
2.2 Geräte	15
2.3 Übersicht der Schweinegewebeproben	17
2.3.1 Probenübersicht	17
2.3.2 Fütterungsschema	17
2.3.3 Probennahme	18
2.4 RNA-Isolierung aus Schweinegewebe	19
2.4.1 RNA-Isolierung aus Schweineleber	19
2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung	20
2.6 cDNA-Synthese aus Schweinegewebe	20
2.7 Semi-quantitative PCR	20

2.7.1	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.7.2	Densitometrische Auswertung der semiquantitativen PCR	21
2.8	Präparation von Mikrosomen aus Schweinegewebe	22
2.9	Proteinkonzentrationsbestimmung	22
2.10	SDS-Gelelektrophorese	23
2.11	Western Blot	23
2.11.1	Detektion des Referenzproteins	25
2.11.2	Densitometrische Auswertung der Western Blots	25
2.12	N-Deglykosylierung der 11 β -HSD1	26
2.13	Aktivitätstest von Schweinemikrosomen mittels HPLC	27
2.13.1	Aktivitätsbestimmung der Mikrosomen	27
2.14	11 β -HSD1-Expression im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Mausleber	29
2.14.1	Probenübersicht	29
2.14.2	Fütterungsschema	29
2.14.3	cDNA-Synthese aus Mausleber	30
2.14.4	semiquantitative PCR	30
2.14.5	Mikrosomenpräparation aus Mausleber	31
2.14.6	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	31
2.14.7	Aktivitätsbestimmung der Mauslebermikrosomen mittels HPLC	32
2.15	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	11 β -HSD1-Expression im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Mausleber	33
3.1.1	mRNA	33
3.1.2	Protein	34
3.1.3	Aktivität	36
3.2	11 β -HSD1 mRNA Expression im Verlauf einer Kalorien-restriktion in Schweinegewebeproben	38
3.2.1	Leber	39
3.2.2	Darmfett	43
3.2.3	Skelettmuskulatur	47
3.3	11 β -HSD1 Protein-Expression im Verlauf einer Kalorien-restriktion in Schweinegewebeproben	50
3.3.1	Leber	55
3.3.2	Darmfett	59
3.3.3	Skelettmuskulatur	62

3.4	11 β -HSD1 Enzymaktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Schweinegewebeproben	64
3.4.1	Leber	66
3.4.2	Darmfett	68
3.4.3	Skelettmuskulatur	70
4	Diskussion	71
4.1	11 β -HSD1-Regulation in der Leber nach Kalorienrestriktion	74
4.2	11 β -HSD1-Regulation im Fettgewebe nach Kalorienrestriktion	78
4.3	11 β -HSD1-Regulation in der Skelettmuskulatur nach Kalorienrestriktion	82
4.4	11 β -HSD1-Glykosylierung in verschiedenen Gewebeproben	84
4.5	11 β -HSD1-Expression in normalen- und untergewichtigen Tieren im Verlauf einer Kalorienrestriktion	85
4.6	Speziesunterschiede der 11 β -HSD1-Regulation nach Kalorienrestriktion und Wiederanfütterung	87
4.7	11 β -HSD1-Regulation im Verlauf einer Kalorienrestriktion	88
4.8	Résumé	91
	Abbildungsverzeichnis	92
	Tabellenverzeichnis	94
	Literatur	95
	Lebenslauf	121
	Danksagung	124
	Eidesstattliche Versicherung	125

Abstract

The microsomal NADP(H)-dependent enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) is a key regulatory enzyme in glucocorticoid metabolism. It acts predominantly as a reductase by converting inactive cortisone to active cortisol thereby amplifying glucocorticoid action independent of circulating cortisol levels. It is ubiquitously expressed in tissues such as liver, adipose, brain or macrophages. High levels of glucocorticoids are associated with insulin resistance, hyperglycemia, visceral obesity and dyslipidemia, which all are symptoms of the metabolic syndrome.

Multiple studies have pointed out a causal role for 11 β -HSD1 in the current obesity epidemic and its related metabolic disorders. Interestingly, 11 β -HSD1 expression and activity in the liver of subjects with obesity is either maintained or modestly lowered. On the other hand, elevated levels are found in adipose tissue, notably in visceral fat. Moreover, obese patients with type 2 diabetes show increased 11 β -HSD1 expression in skeletal muscle myotubes. However, the underlying tissue-specific mechanisms of altered 11 β -HSD1 expression are largely unknown. Therefore, the identification of factors and mechanisms regulating 11 β -HSD1 expression and activity could shed light on pathogenesis and possibly identify new therapeutic targets.

In order to investigate the influence of caloric restriction on 11 β -HSD1 in more detail, expression and activity of 11 β -HSD1 were assessed in several tissues in two independent caloric restriction and re-feeding animal models. Evidence in the current literature suggests that expression and activity of 11 β -HSD1 is elevated in the liver and reduced in visceral adipose tissue and skeletal muscle following caloric restriction. In this study mouse liver, pig liver, pig visceral adipose tissue and pig skeletal muscle were analysed using semi-quantitative RT-PCR, Western Blot analysis, and HPLC.

After caloric restriction, no significant difference on mRNA levels was detected in mouse liver. But 11 β -HSD1 mRNA expression was upregulated after subsequent re-feeding. In contrast, 11 β -HSD1 protein expression after caloric restriction was significantly upregulated, while no difference was detected after re-feeding. Interestingly, upregulation of protein after caloric restriction (1.4-fold) was lower than the increase in enzymatic activity (2.6-fold). Furthermore, while no difference was observed in protein levels after two weeks re-feeding, 11 β -HSD1 activity increased 2.5-fold. Enzymatic activity was significantly increased after caloric restriction and re-feeding of 2 weeks and 6 months. In pig tissues neither 11 β -HSD1 mRNA levels, protein expression or enzyme activity were influenced after caloric restriction and re-feeding.

Overall, the results demonstrate species-dependent differences in the regulation of 11 β -HSD1 following caloric restriction and suggest the presence of an additional regulation

step for 11 β -HSD1 activity in mouse liver. Notably, this study is the first to address the effect of dietary interventions on 11 β -HSD1 expression and activity in visceral adipose tissue and skeletal muscle and provides evidence that 11 β -HSD1 is unchanged by caloric restriction in these tissues. Despite extensive research there still remain uncertainties about the implications of 11 β -HSD1 in obesity and its associated metabolic disorders. The results from this study raise doubts about the prominent role of 11 β -HSD1 in metabolic syndrome at least in a porcine model. Therefore, further studies are necessary in the search for other factors than 11 β -HSD1 that contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome.

Zusammenfassung

Die mikrosomale NADP(H)-abhängige 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1) ist ein Schlüsselenzym im Glucocorticoid-Metabolismus. Es fungiert *in vivo* hauptsächlich als Reduktase, indem inaktives Cortison in rezeptor-aktives Cortisol umgesetzt wird. Dabei werden die lokalen Glucocorticoidkonzentrationen verstärkt, unabhängig vom zirkulierenden Cortisol-Level. Die 11 β -HSD1 wird ubiquitär exprimiert, am stärksten in Leber, Fettgewebe, Gehirn und Makrophagen. Hohe Glucocorticoid-Level werden mit den Symptomen des Metabolischen Syndroms, wie Insulinresistenz, Hyperglykämie, viszeraler Adipositas und Dyslipidämie assoziiert.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen der 11 β -HSD1, Adipositas und den damit verbundenen metabolischen Erkrankungen gibt. Die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 ist dabei in der Leber bei übergewichtigen Patienten entweder unverändert oder nur leicht verringert. Andererseits wurden erhöhte Level im Fettgewebe, besonders im viszeralen Fettgewebe, gefunden. Weiterhin zeigten übergewichtige Patienten mit Typ-2-Diabetes erhöhte 11 β -HSD1-Expressionslevel in den Myotuben der Skelettmuskulatur. Die genauen gewebspezifischen Mechanismen der veränderten 11 β -HSD1-Expression sind zum größten Teil unbekannt. Daher kann die Identifizierung der Faktoren und Mechanismen, die die 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität regulieren, zu einem besseren Verständnis der Pathogenese und möglicherweise neuen Therapieansätzen führen.

Es wurde der Einfluss einer Kalorienrestriktion auf die 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität in verschiedenen Geweben in zwei unterschiedlichen Kalorienrestriktions- und Wiederaanfütterungsmodellen bestimmt. Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 nach einer Kalorienrestriktion in der Leber erhöht, im viszeralen Fettgewebe und Skelettmuskulatur erniedrigt sind. Die Untersuchung erfolgte mittels RT-PCR, Western-Blot Analyse und HPLC in Mausleber, Schweineleber, Schweinedarmfett und Schweineskelettmuskulatur.

Nach der Kalorienrestriktion waren keine signifikanten Änderungen der 11 β -HSD mRNA-Level in Mausleber feststellbar. Nach anschließender Wiederaanfütterung war die 11 β -HSD1-Expression hochreguliert. Im Gegensatz dazu war die 11 β -HSD1-Proteinexpression nach Kalorienrestriktion signifikant erhöht, während kein Unterschied nach Wiederaanfütterung zu erfassen war. Die Hochregulierung des Proteins war nach Kalorienrestriktion (1,4-fach) niedriger als der Anstieg der 11 β -HSD1-Enzymaktivität (2,6-fach). Obwohl es keinen Unterschied auf Proteinebene nach zwei Wochen Wiederaanfütterung gab, war die 11 β -HSD1-Aktivität 2,5-fach erhöht. Die Enzymaktivität war nach Kalorienrestriktion und ebenfalls nach zwei Wochen und nach sechs Monaten Wiederaanfütterung signifikant

erhöht. In den Schweinegewebeprouen wurden weder die mRNA-Level, die Protein-Expression oder die Enzymaktivität der 11 β -HSD1 durch eine Kalorienrestriktion oder durch anschließende Wiederaufütterung beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde erstmals der Effekt einer Ernährungsintervention auf die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 in Leber, viszeralem Fettgewebe und Skelettmuskulatur in zwei verschiedenen Spezies untersucht. Die Studie sollte zum besseren Verständnis der genauen Rolle der 11 β -HSD1 im Metabolischen Syndrom beitragen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung Spezies-abhängige Unterschiede der 11 β -HSD1-Regulation nach einer Kalorienrestriktion und lassen vermuten, dass es zusätzliche Regulationsschritte in Mausleber und/oder weitere Mediatoren bei der 11 β -HSD1-Regulation im Verlauf einer Kalorienrestriktion gibt. Die genauen Mechanismen bleiben weiterhin unklar.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
11 β -HSD1	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
BMI	Body Mass Index
BSA	bovines Serumalbumin
db-Maus	Diabetes-Maus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GR	Glucocorticoid Rezeptor
HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Achse
H6PDH	Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HPLC	engl.: High Performance Liquid Chromatography
IDF	Internationale Diabetes Federation
IL-6	Interleukin-6
KCl	Kaliumchlorid
L	Liter
μ L	Mikroliter
mL	Milliliter
Mm	Mus musculus
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ob-Maus	„obese“-Maus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
PBS	Salinischer Phosphatpuffer (engl.: phosphate buffered saline)
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
SDR	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (engl.: short-chain dehydrogenases/reductases)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ss	Sus scrofa
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Das Metabolische Syndrom

Das Metabolische Syndrom ist definiert als gemeinsames Auftreten von mehreren Symptomen: abdominale (viszerale) Adipositas, erhöhter Blutdruck, erhöhter Blutzuckerspiegel und Dyslipidämie [1, 2]. Nach der Definition der Internationalen Diabetes Federation (IDF) liegt ein Metabolisches Syndrom vor, wenn der Bauchumfang bei Männern ≥ 94 cm bzw. bei Frauen ≥ 80 cm beträgt und mindestens zwei weitere der folgenden Störungen vorliegen:

1. erhöhte Triglyzeridwerte (mindestens 150 mg/dl bzw. 1,7 mmol/l) bzw. eine bereits eingeleitete Behandlung zur Absenkung der Triglyzeride;
2. zu niedriges HDL-Cholesterin (Männer ≤ 40 mg/dl bzw. 1,03 mmol/l; Frauen ≤ 50 mg/dl bzw. 1,29 mmol/l) bzw. eine bereits eingeleitete Therapie zur Anhebung des HDL-Cholesterins;
3. Bluthochdruck (systolisch ≥ 130 mmHg oder diastolisch ≥ 85 mmHg) bzw. eine bereits behandelte Hypertonie;
4. erhöhter Nüchtern-Blutglucose-Spiegel ≥ 100 mg/dl bzw. 5,6 mmol/l) oder ein bereits diagnostizierter Typ-2-Diabetes [3].

Übergewicht und Fettleibigkeit (Adipositas) stellen die häufigste Ernährungs- und Stoffwechselstörung westlicher Gesellschaften dar und können zur Entstehung des Metabolischen Syndroms beitragen. Sie sind mit wachsenden medizinischen sowie auch sozioökonomischen Problemen verbunden [4].

Übergewicht wird über den Body-Mass-Index (BMI) bestimmt. Der BMI wird errechnet, indem man das Körpergewicht (in Kilogramm) durch das Quadrat der Körpergröße (in Metern) teilt. Die WHO stuft Erwachsene mit einem BMI ≥ 25 kg/m² als übergewichtig ein, von Adipositas wird bei einem BMI ≥ 30 kg/m² gesprochen.

In Deutschland ist jeder zweite Erwachsene übergewichtig und jeder fünfte sogar adipös [5], so waren im Jahr 2013 52% der Erwachsenen (62% der Männer und 43% der Frauen) in Deutschland übergewichtig. Die Prävalenz von Adipositas lag bei Frauen bei 14% und Männern bei 17% [6]. In Europa stellen laut WHO Übergewicht und Adipositas eines der schwerwiegendsten Probleme für die Gesundheit im 21. Jahrhundert dar und zeigen epidemische Ausmaße. Die Zahl der Erwachsenen mit einem BMI ≥ 25 kg/m² stieg weltweit zwischen 1980 und 2013 deutlich an, bei Männern von 28,8% auf 36,9% und bei Frauen von 29,8% auf 38,0% [7].

Fettleibigkeit erhöht das Risiko für mehrere Komorbiditäten wie Typ-2-Diabetes [8], Schlaganfall [9], kardiovaskuläre Erkrankungen [10], Lipidstoffwechselstörungen, Bluthochdruck und Gehirnschlag [9]. Außerdem wird Fettleibigkeit mit Gallensteinen, bestimmten Krebsarten, GERD (gastroösophageale Refluxerkrankung), Fettleber, degenerativen Gelenkserkrankungen, obstruktivem Schlafapnoesyndrom und psychiatrischen Erkrankungen assoziiert und kann die Lebenserwartung zwischen 5-20 Jahre reduzieren [11]. Zudem wird Adipositas nicht nur mit einer verkürzten Lebenserwartung verbunden [12], sondern es konnte auch gezeigt werden, dass der Prozess des Alterns beschleunigt wird.

Mit Übergewicht und Adipositas verbunden ist der Anstieg von Erkrankungen an Diabetes mellitus Typ 2. 90% der an Typ-2-Diabetes erkrankten Patienten sind übergewichtig oder adipös. Mit einem Anteil von 85 bis 90% stellt der Typ-2 weltweit die häufigste Form des Diabetes mellitus dar [13]. Es handelt sich um eine Stoffwechselerkrankung mit schwerwiegenden Folgekomplikationen. Die IDF gab bekannt, dass 2014 weltweit 387 Millionen Menschen von Diabetes mellitus betroffen und bis zum Jahr 2035 soll die Zahl der Erkrankten auf 592 Millionen ansteigen [14]. Allein in Deutschland sind etwa 5 bis 8% der Bevölkerung betroffen mit steigender Tendenz. In den letzten 30 Jahren hat sich die Zahl der Typ-2-Diabetes Patienten mehr als verdoppelt [15]. Aufgrund von Folgekomplikationen kommt es zu hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten. Es kann zu Erblindung als Folge einer Retinopathie, Nephropathie mit resultierendem Nierenversagen und peripherer Neuropathie mit dem Risiko eines diabetischen Fußulkus kommen.

Typ-2-Diabetes ist weitgehend vermeidbar. Denn Risikofaktoren wie Übergewicht und Fettleibigkeit sowie Bewegungsmangel sind beeinflussbar. Durch Reduzierung dieser Faktoren könnte auch das Risiko einer Diabeteserkrankung vermindert werden. Aber in den meisten Ländern steigt die Prävalenz der Adipositas und Übergewicht stetig an. Patienten mit einem unbehandelten Typ-2-Diabetes haben ein erhöhtes Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, zu erkranken [16]. Daten weisen darauf hin, dass hohe intrazelluläre Cortisol-Konzentrationen in Glucocorticoid-abhängigen Geweben zu den Symptomen des Metabolischen Syndroms beitragen können [17, 18]. Cortisol wird in den Glucocorticoid-abhängigen Geweben durch das Enzym 11β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 gebildet.

1.2 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

1.2.1 Cortisol und 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Das Glucocorticoid Cortisol gehört zu der Gruppe der Steroidhormone und wird über die Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde gebildet und sezerniert [19]. Cortisol ist bekannt als Stresshormon und sorgt für die Aktivierung kataboler Stoffwechselprozesse zur Bereitstellung von Energie unter Stressbedingungen. Es wirkt auf den gesamten Organismus, vor allem auf den Stoffwechsel von Kohlenhydraten und Fetten in der Leber, im Fett und in der Muskulatur [20, 21]. Die Glucoseversorgung und Mobilisierung von Energiespeichern ist dabei die primäre Stoffwechselwirkung. Die Gluconeogenese und die Glykogenbildung werden gesteigert sowie die Freisetzung von freien Fettsäuren durch Hydrolyse von Proteinen in den Muskelzellen oder Lipolyse in den Fettzellen [20]. Außerdem fördert Cortisol die Adipogenese von Präadipozyten [22, 23]. Eine weitere wichtige Funktion ist die Unterdrückung körpereigener Immunreaktionen, so dass eine Überreaktion des Immunsystems verhindert wird [24]. Aus diesem Grund werden synthetische Cortisolderivate therapeutisch als Immunsuppressiva und Entzündungshemmer eingesetzt.

Der intrazelluläre Cortisol-Spiegel wird durch die Enzyme 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 und Typ 2 beeinflusst, da sie das aktive Glucocorticoid Cortisol aus inaktivem Cortison generieren (Typ 1) bzw. die Rückreaktion katalysieren (Typ 2) (s. Abbildung 1). Die Veränderungen der Cortisol-Level in den Geweben beeinflussen den systemischen Stoffwechsel und zeigen, dass die 11 β -HSD1 möglicherweise ein wichtiges therapeutisches Target zur Behandlung von Adipositas und den damit verbundenen stoffwechselbedingten Erkrankungen ist [25].

Das durch die 11 β -HSD1 vermittelte Reduktion entstandene bzw. das aus dem Plasma aufgenommene Cortisol bindet an den Glucocorticoidrezeptor. Der Glucocorticoid-Rezeptor gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren. Er befindet sich im inaktiven Zustand an ein Hitzeschockprotein gebunden im Zytoplasma. Wenn Cortisol an den Glucocorticoid-Rezeptor bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Die zuvor gebundenen Hitzeschutzproteine dissoziieren [26]. Der aktivierte ligand-gebundene Glucocorticoid-Rezeptor transloziert in den Zellkern und bindet als Homodimer an das Hormon-Response-Element [27].

Der Plasma-Cortisol-Spiegel zeigt eine zirkadiane Rhythmik mit einem morgendlichen Höchstwert im Serum und fällt dann durch einen negativen Feedback-Mechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) wieder ab. Circa 90% des Cortisols im Plasma wird an Transcortin (Cortisol-Binding-Globulin, CBG) und Albumin gebunden transportiert, nur ungefähr 6% liegen ungebunden als freies

rezeptor-aktives Cortisol vor, und kann ins Gewebe aufgenommen werden [28, 29]. Die biologisch inaktive Form, das Cortison, wird aufgrund der geringen Bindungsaffinität zum CBG ungebunden im Blut transportiert. Daher liegt Cortison in zwei- bis dreifach höherer Konzentration vor als das freie Cortisol [29].

Tatsächlich zeigen Daten aus verschiedenen Studien, dass die Plasma-Cortisol-Konzentrationen in Patienten mit dem Metabolischen Syndrom, im Vergleich zur Kontrollgruppe, erhöht sind [30, 31, 32, 33]. Durch Gewichtsreduktion konnte eine Normalisierung der Cortisol-Level und eine Verbesserung der Insulinresistenz erreicht werden [34]. Aber auch wenn die Cortisol-Level im Plasma in einem normalen Bereich sind, gibt es Hinweise, dass eine erhöhte Cortisol-Aktivität in der Peripherie und eine Fehlregulierung der HPA-Achse vorliegt [35, 30]. Da die 11 β -HSD1 für die Entstehung von Cortisol verantwortlich ist, scheint sie eine wichtige Rolle im Metabolischen Syndrom und den damit verbundenen Erkrankungen zu spielen.

1.2.2 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1

Die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1) gehört zur Enzym-Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (engl. short-chain dehydrogenases/reductases, SDR). Die physiologische Funktion der 11 β -HSD1 ist die Interkonversion von rezeptor-inaktivem Cortison (11-Dehydrocorticosteron in Nagern) zu rezeptor-aktivem Cortisol (Corticosteron in Nagern) (s. Abbildung 1) [36, 37, 38, 39].

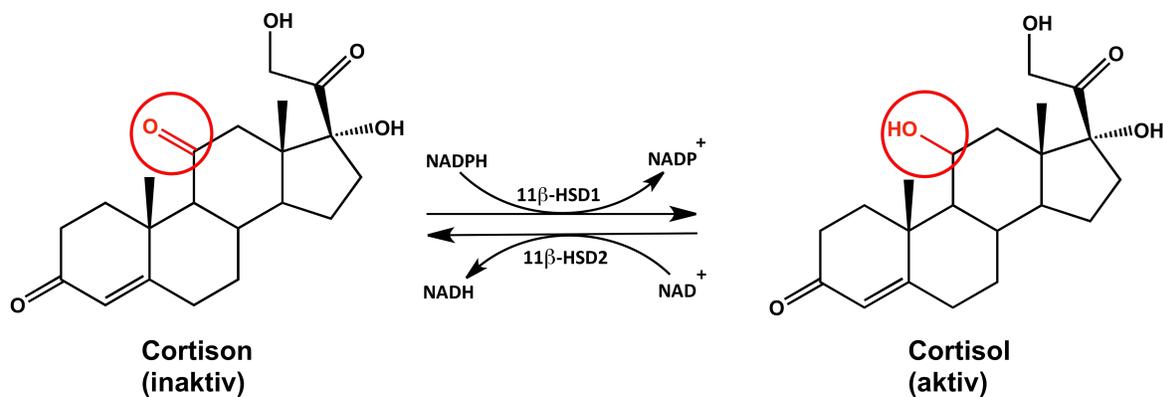


Abbildung 1: Funktion der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Das Enzym 11 β -HSD1 katalysiert die Umwandlung von inaktivem Cortison in rezeptor-aktives Cortisol und ist somit an der Regulation der intrazellulären Glucocorticoidkonzentration beteiligt. Im Gegensatz dazu wandelt die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD2) Cortisol zu inaktivem Cortison um und wird überwiegend in den Nieren und dem Dickdarm exprimiert.

11 β -HSD1 wird in vielen Geweben exprimiert, aber vor allem in der Leber, im Fettgewebe, in den Knochen, im Auge, im Gehirn, in der Lunge und im Muskel [40]. Es liegt membrangebunden im endoplasmatischen Retikulum der Zelle vor und in räumlicher Nähe zum Enzym Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase (H6PDH) [41], wo die 11 β -HSD 1 durch eine N-terminale lipophile Domäne in der Membran verankert ist [42].

Die humane 11 β -HSD1 besteht aus 292 Aminosäuren und die Regulation des Gens (*HSD11B1*) verläuft über zwei Promotoren [43]. Es entstehen mRNAs, die sich nur im Bereich vor dem 5'-untranslatierten Bereich unterscheiden und dasselbe Protein kodieren.

1.3 Regulation der 11 β -HSD1 in unterschiedlichen Gewebetypen

1.3.1 Regulation der 11 β -HSD1 in der Leber

In Nagern und Menschen ist die 11 β -HSD1 in der Leber stark exprimiert, etwa zehnmal höher als im Fettgewebe [44]. In der humanen Leber ist die höchste 11 β -HSD1-Expression entlang der Zentralvene [37]. In einigen übergewichtigen Mausmodellen, wie z.B. WNIN/ob [45] und Zucker fatty Ratten (fa/fa-Ratten) [46], ist die 11 β -HSD1-Expression herunterreguliert. Dagegen zeigte sich bei Diabetes-Mäusen (db/db-Mäusen) eine erhöhte hepatische 11 β -HSD1- und Glucocorticoidrezeptor-Expression [47]. In primären murinen Hepatozyten konnte eine dosis-abhängige Erhöhung der 11 β -HSD1 mRNA-Level durch Glucose und Corticosteron gezeigt werden [47]. Durch selektive Hemmung der 11 β -HSD1 wurde bei den übergewichtigen Maus-Modellen (ob/ob, db/db) der Blut-Glucose-Spiegel deutlich gesenkt. Jedoch konnte dieser Effekt nicht bei gesunden Mäusen beobachtet werden [48]. Zudem wurde eine verringerte Nahrungsaufnahme und eine Abnahme von viszeralem Fett gezeigt [49]. Eine erhöhte 11 β -HSD1-Expression in der Leber führte zu einer hepatischen Fetttakkumulation und einem verschlechterten Lipidprofil mit erhöhten freien Fettsäurekonzentrationen im Plasma.

Eine Reihe von Humanstudien haben den Zusammenhang zwischen der 11 β -HSD1-Expression in der Leber und dem Metabolischen Syndrom untersucht. Bei übergewichtigen Patienten mit zusätzlicher metabolischer Erkrankung wurde eine erhöhte Expression des Glucocorticoidrezeptors, der 11 β -HSD1, der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase gefunden. Die Expression erhöhte sich mit Zunahme des Schweregrads der Stoffwechselerkrankung [50]. Andere Studien zeigten, dass bei Adipositas und Insulinresistenz die 11 β -HSD1-Aktivität in der Leber reduziert ist [51, 52, 53, 40, 54].

Einige Studien fanden keine Veränderung der 11 β -HSD1-Aktivität bei Adipösen mit Typ-2-Diabetes [55, 56].

Im Vergleich zu adipösen Patienten ohne Diabetes, bei denen eine verringerte 11 β -HSD1-Aktivität vorlag, war die Enzymaktivität in adipösen Patienten mit einem Typ-2-Diabetes unverändert [57, 58]. Durch selektive 11 β -HSD1 Inhibition oder Hemmung des Glucocorticoid-Rezeptors konnte der Glucose- und Insulinspiegel im Blut gesenkt werden [47, 59, 48, 49].

1.3.2 Regulation der 11 β -HSD1 im Fettgewebe

11 β -HSD1 wird im humanen Fettgewebe exprimiert [60, 61], fungiert dort hauptsächlich als Reduktase und wird durch Glucocorticoide und pro-inflammatorische Cytokine induziert [62, 63, 64]. Das Enzym kommt sowohl im weißen als auch im braunen Fettgewebe vor und wird in den verschiedenen Fettdepots unterschiedlich stark exprimiert. In Mäusen wurden höhere 11 β -HSD1-Level im subkutanen als im viszeralen Fettgewebe gefunden [65]. Im Menschen wurden dagegen höhere Level im viszeralen [66, 67, 68] oder gleichbleibende [69] im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe gefunden. Es ist bekannt, dass sich das subkutane und viszerale Fettgewebe biologisch unterscheiden. Das viszerale Fettgewebe ist metabolisch aktiver. Es zeigt stärkere pro-inflammatorische Eigenschaften als das subkutane Fettgewebe [70]. Die abdominale viszerale Fettleibigkeit stellt die häufigste Erscheinungsform im Metabolischen Syndrom dar und ist eines der Hauptmerkmale in der heutigen Fettleibigkeitsepidemie [71].

In Tierstudien wurde gezeigt, dass sich durch erhöhte Cortisol-Level mittels 11 β -HSD1 eine abdominale Fettleibigkeit entwickelt [71]. Fettleibigkeit wurde mit erhöhter 11 β -HSD1 mRNA-Expression und Aktivität assoziiert [72, 67, 73]. Eine erhöhte Enzymaktivität im Fettgewebe wurde sowohl in Nagermodellen als auch in Humanstudien mit Übergewichtigen gezeigt. 11 β -HSD1-Überexpression im Fettgewebe von Mäusen führte zur Entstehung von abdominaler Adipositas und Diabetes-Typ-2 [74]. Eine erhöhte Expression führte nicht nur zur vermehrten Ansammlung von viszeralem Fett, sondern darüber hinaus zu metabolischen Veränderungen wie Dyslipidämie und Insulinresistenz. Dies war besonders zu sehen bei Mäusen, die eine fettreiche Diät erhielten [75]. Im Gegensatz dazu zeigten 11 β -HSD1 Knockout-Mäuse verbesserte metabolische Parameter, wie eine verbesserte Glukosetoleranz, ein verbessertes Lipidprofil und ein reduziertes Körpergewicht sowie weniger viszerale Fettgewebe [76, 77, 78].

Diverse Humanstudien untersuchten, ob die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 im Fettgewebe mit der Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz assoziiert ist. In der Literatur sind die Ergebnisse in Bezug auf die Entstehung von Übergewicht und die 11 β -

HSD1-Expression im Fettgewebe uneinheitlich. Es gibt Ergebnisse, die eine erhöhte 11 β -HSD1-Expression im Fettgewebe zeigten [79], andere wiederum fanden keine Unterschiede [66]. Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um das subkutane Fettgewebe, in dem die Expression und Aktivität mit BMI und Insulinresistenz korrelierten [66, 80, 54, 81, 82]. Einige Studien zeigten eine zwei- bis dreifach erhöhte 11 β -HSD1-Aktivität im subkutanen Fettgewebe bei übergewichtigen Männern und Frauen [80, 69, 54, 81]. Die 11 β -HSD1 mRNA-Expressionslevel waren ebenfalls erhöht [80]. In zwei weiteren Studien wurde gezeigt, dass die 11 β -HSD1 mRNA- und Aktivitätslevel direkt mit Adipositas, den damit verbundenen metabolischen Folgeerkrankungen [83] und der Adipozytengröße [67] korrelierten. Andere Studien fanden im viszeralen Fettgewebe eine erhöhte 11 β -HSD1-Expression bei Adipositas [84, 79, 67, 69]. Im Allgemeinen wird die Akkumulation von viszeralem Fettgewebe, unabhängig vom Geschlecht [85, 86], mit gesundheitlichen Folgen wie Diabetes-Typ-2, kardiovaskulären Erkrankungen und Insulinresistenz verbunden [87]. In zwei anderen Studien zeigte sich hingegen, dass die 11 β -HSD1 im viszeralen Fettgewebe nicht mit Übergewicht einherging [66].

1.3.3 Regulation der 11 β -HSD1 in der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur ist eines der wichtigsten Zielorte für die Wirkung von Insulin, aber auch für Glucosespeicherung und -abbau. In humaner Skelettmuskulatur ist 11 β -HSD1 vorhanden und fungiert als Reduktase [88]. Im Vergleich zur Leber und dem Fettgewebe ist wenig bekannt über ihre Rolle im Muskelgewebe [89, 90]. Die 11 β -HSD1-Expression ist etwa 100-fach geringer verglichen mit derjenigen in der Leber [88, 91].

Es gibt Hinweise, dass die 11 β -HSD1-Aktivität in der Skelettmuskulatur eine Rolle bei der Entstehung von Stoffwechselkrankheiten spielt. Es wird vermutet, dass eine Fehlregulation des Enzyms zur Pathogenese von Insulinresistenz führt [92]. In übergewichtigen Nagern mit Diabetes-Typ-2 wurden erhöhte 11 β -HSD1 mRNA- und Proteinlevel im *Musculus gastrocnemius* gefunden [93]. Zudem zeigte sich eine gesteigerte 11 β -HSD1-Expression in den Myotuben von übergewichtigen Typ-2-Diabetikern verglichen zur Kontrollgruppe [94, 90]. In Nagern mit Typ-2-Diabetes konnte *in vivo* gezeigt werden, dass selektive Hemmung der 11 β -HSD1 zur Erhöhung bestimmter Insulinsensitivitätsmarker in der Skelettmuskulatur führten [92]. Ebenfalls bei Versuchen in C2C12-Myotuben wirkte sich die Inhibition der 11 β -HSD1 positiv auf den Insulinsignalweg und die Glucoseaufnahmefähigkeit in die Skelettmuskelzellen aus [94, 92, 95].

Studien, die sich mit der 11 β -HSD1-Expression und Aktivität in Skelettmuskulatur bei Diabetikern und/oder Übergewichtigen beschäftigten, zeigten uneinheitliche Ergebnisse. In zwei Studien wurde berichtet, dass die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 in der Skelettmuskulatur bei Patienten mit Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes erhöht ist [41,

89]. Eine Studie mit männlichen Patienten zeigte positive Assoziationen der 11 β -HSD1-Expression im *Musculus vastus lateralis* mit Insulinresistenz, BMI und Blutdruck bei vorheriger Stimulation der Zellen mit Cortisol. Allerdings war unter basalen Bedingungen keine signifikante Assoziation zu erkennen [89].

In primären humanen Myotuben von männlichen Typ-2-Diabetes Patienten mit Übergewicht war die 11 β -HSD1 mRNA-Expression im Vergleich mit gesunden Übergewichtigen erhöht [94]. Dem gegenüber steht eine Studie, in der kein Zusammenhang zwischen 11 β -HSD1-Aktivität im *Musculus vastus lateralis* mit BMI, Insulinresistenz oder dem Taille/Hüfte-Ratio gefunden wurde [96]. Patienten mit Typ-2-Diabetes zeigten eine niedrigere 11 β -HSD1-Aktivität im *Musculus vastus lateralis* verglichen mit der Kontrollgruppe, aber kein Unterschied in der mRNA-Expression. Eine Erhöhung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression wurde nach Dexamethasongabe beobachtet. Dagegen wurde eine Erhöhung der 11 β -HSD1-Aktivität nur in der Diabetiker-Gruppe gemessen [97].

1.4 Kalorienrestriktion

Als Kalorienrestriktion wird eine Verringerung der mit der Nahrung aufgenommenen Energie, unterhalb der normalerweise bei unbegrenztem Nahrungsangebot zugeführten Kalorienmenge, bezeichnet. Dabei wird darauf geachtet, dass gleichzeitig alle essentiellen Nährstoffe ausreichend zugeführt werden, damit keine Mangelernährung entsteht [98]. Diese Ernährungsmaßnahme wirkt sich positiv auf den Glucose- und Fettstoffwechsel, Entzündungen und das Metabolische Syndrom aus [99, 100, 101, 102, 103, 104].

Studien von Tannenbaum *et al.* zeigten Mitte des 20. Jahrhunderts erstmals, dass eine Reduzierung der Nahrungsaufnahme zur Erhöhung der Lebensspanne und zur Hemmung der Tumorbildung in Ratten führte [105]. Kalorienrestriktion wirkt verlängernd auf die maximale und durchschnittliche Lebensspanne in Nagetieren [106, 107, 108], Würmern (*Caenorhabditis elegans*), Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) [109, 110, 111], Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) [112], Rhesusaffen [113, 114] und führte zu persistierenden Wirkungen, die noch weitgehend unverstanden sind. Bis heute ist die Kalorienrestriktion die einzige bekannte Verhaltensintervention, die viele altersbedingte Erkrankungen verzögern und die maximale Lebensspanne verlängern kann [115, 116]. Es fördert die Langlebigkeit [115] und verringert die Morbidität, die mit bestimmten chronischen Erkrankungen verbunden ist, wie Arteriosklerose, Diabetes, Krebs und Autoimmunerkrankungen [117].

Fettleibigkeit und insbesondere das viszerale Fettgewebe sind mit einer niedriggradigen Entzündung verbunden, da die Ausschüttung zahlreicher pro-inflammatorischer Cytokine in den Adipozyten und Makrophagen ansteigt [118, 119]. Hotamisligil *et al.*

[120] und Karasik *et al.* [121] zeigten, dass pro-inflammatorischen Cytokine, z.B. TNF- α , in der Lage, sind eine Insulinresistenz zu induzieren. In weiteren Studien wurde der Zusammenhang zwischen Entzündung und der Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes-Typ-2 beschrieben [122, 123]. Entzündungsparameter können durch bestimmte Lebensstilinterventionen reduziert werden. Die Kalorienrestriktion stellt eine geeignete Maßnahme dar, um die Insulinsensitivität durch Reduzierung des viszeralen Fettgewebes zu verbessern [124]. Interventionsstudien am Menschen mit Reduktionsdiäten über 12-36 Wochen mit einer Kalorienrestriktion von 30-50% zeigten kurzfristig günstige Effekte auf Gewicht und Stoffwechsel [125, 126]. Außerdem hat sich die Kalorienrestriktion als erfolgreiche Maßnahme zur Gewichtsabnahme gezeigt und kann ebenfalls Marker des oxidativen Stress verbessern [127, 128, 129, 130]. Beim Menschen führte Kalorienrestriktion zur Reduktion der Konzentration von Entzündungsbiomarkern, wie C-reaktives Protein (CRP) und TNF- α [102] sowie zur Induktion von Transkriptionsfaktoren, z.B. NF- κ B, [103, 131, 104, 100]. Darüber hinaus zeigten sich verbesserte kardiovaskuläre Profile, verbesserte Blutzuckerwerte, geringeres Körperfett und zirkulierende Hormone [132, 133].

1.5 11 β -HSD1 als Schlüsselenzym im Metabolischen Syndrom

Verschiedene Aspekte werden für die Entstehung von Fettleibigkeit und Typ-2-Diabetes diskutiert, wie z.B. Umweltfaktoren (Lebensstil, Bewegungsmangel, zu hohe Nahrungsaufnahme) und genetische Aspekte (Veränderungen im Stoffwechsel und Hormonhaushalt). Hohe Glucocorticoid-Level stehen im Zusammenhang mit Hyperglykämie, Insulinresistenz, Dyslipidämie und viszeraler Adipositas [134]. Da die 11 β -HSD1 die intrazelluläre Glucocorticoid-Konzentration reguliert, gilt sie als ein möglicher Angriffspunkt moderner Präventionsstrategien für das Metabolische Syndrom. Das Enzym ist in relevanten Zelltypen des Fettstoffwechsels und auch in der Inflammation wirksam und stellt somit eine Schnittstelle zwischen diesen Vorgängen dar [135].

Studien mit Knockout sowie mit transgenen Mäusen zeigten, dass die 11 β -HSD1 ein wichtiges Target in der Behandlung des Metabolischen Syndroms sein könnte. Die Überexpression der 11 β -HSD1 im Fettgewebe der Tiere führte zum vollständigen Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms [136]. Die Überexpression des Enzyms in Adipozyten führte zum Diabetes-Typ-2 und einer viszeralen Fettsucht, während ein 11 β -HSD1-Defizit oder eine Inhibition des Enzyms positive Auswirkungen auf den Leberstoffwechsel hat [137]. 11 β -HSD1 ist ebenfalls bei chronisch-entzündlichen Krankheiten überexprimiert (z.B. chronisch-entzündliche Darmerkrankungen [138]) und stellt dabei einen zentralen Angriffspunkt bei der Aufklärung dieser Krankheiten dar. Zum Beispiel scheinen bei Adipositas gewebsspezifische Entzündungen eine wichtige Rolle zu spielen, bei denen im Verlaufe des Entzündungsgeschehens die 11 β -HSD1 im Fettgewebe hochreguliert wird. Es wurde festgestellt, dass Patienten mit einem Glucocorticoid-Überschuss eine zentrale Adipositas entwickeln, aber kein erhöhter Plasma-Cortisol-Spiegel vorzufinden ist [139]. Daher wird vermutet, dass eine erhöhte 11 β -HSD1-Aktivität im Fettgewebe vorliegt, die Cortison in rezeptor-aktives Cortisol umwandelt und somit eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von Übergewicht spielt [62]. Fettgewebe, das von übergewichtigen Patienten entnommen wurde, zeigte eine drei- bis vierfach erhöhte 11 β -HSD1-Expression im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe [54]. In Tier- und Humanstudien konnte zudem gezeigt werden, dass die Fehlregulierung der 11 β -HSD1 bei Adipositas gewebsspezifisch ist. Eine Herunterregulierung der 11 β -HSD1 in der Leber wird begleitet mit einer Hochregulierung im Fettgewebe [46, 140].

11 β -HSD1 scheint somit ein vielversprechendes therapeutisches Target für die Behandlung des Metabolischen Syndroms und den damit verbundenen metabolischen Erkrankungen zu sein.

1.6 Aufgabenstellung

Das Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 katalysiert die intrazelluläre Bildung von Cortisol aus rezeptorinaktivem Cortison und reguliert die Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptor.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen 11 β -HSD1, Übergewicht und dem Metabolischen Syndrom. Bei Übergewichtigen konnte gezeigt werden, dass die 11 β -HSD1-Expression und 11 β -HSD1-Aktivität in der Leber herunterreguliert und im Fettgewebe sowie im Muskelgewebe hochreguliert ist. In der Literatur finden sich wenige und widersprüchliche Hinweise, dass die Funktion der 11 β -HSD1 durch Kalorienrestriktion nachhaltig reduziert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der mRNA, Protein und Aktivität der 11 β -HSD1 in der Leber, im Fettgewebe sowie im Muskel nach einer Kalorienrestriktion. Für die Untersuchungen standen Gewebeproben aus einer Schweine- und Mausfütterungsstudie zur Verfügung.

Nach Aufarbeitung der Proben wurde die 11 β -HSD1-Expression in der Leber, im Darmfett und der Skelettmuskulatur vor und nach einer Kalorienrestriktion auf folgenden Ebenen ermittelt:

- auf Transkriptebene (11 β -HSD1-Transkript mittels semi-quantitativer RT-PCR)
- auf Proteinebene (11 β -HSD1-Protein mittels Western Blot)
- auf Aktivitätsebene (Enzymaktivität mittels HPLC-Assay zur Erfassung der Cortisol-Bildung aus Cortison)

Dabei wird auf folgende Fragestellungen genauer eingegangen:

- Sind Unterschiede in der 11 β -HSD1-Expression auf Transkript-, Protein- und Aktivitätslevel in Leber, Fettgewebe oder Muskel im Verlauf der Kalorienrestriktion zu sehen?
- Ist die 11 β -HSD1-Expression auf Transkript-, Protein- und Aktivitätsebene in Leber, Fettgewebe oder Muskel nach der Wiederanfütterung weiterhin verändert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reinsubstanzen

Chemikalien/Reinsubstanzen	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Acetonitril	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, DE
dNTP Mix, á 10mM	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
EDTA-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol	J.T. Baker, Groß-Gerau, DE
Ethylacetat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Gel-Red™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward, CA, USA
Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
G7 Reaction Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt a.M., DE
Glycoprotein Denaturing Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt a.M., DE
Immobilon-P Membran, PVDF	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NADPH-Tetranatriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
10% NP-40	New England Biolabs, Frankfurt a.M., DE
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, DE

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien/Reinsubstanzen	Hersteller
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden, DE
LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Sample Reducing Agent (10x)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Random Primers	Promega, Fitchburg, WI, USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Salzsäure	Merck, Darmstadt, DE
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rinderserumalbumin	Behringwerke AG, Marburg, DE

2.1.2 Puffer, Stammlösungen, Laufmittel

5x PBS-Puffer

40 g NaCl; 1,0 g KCl; 5,75 Na₂HPO₄*2H₂O; 1,0 g KH₂PO₄ pro 1 L Wasser

Blocking-Puffer für Western Blot

5% (m/v) Milchpulver in PBS-T-Puffer

Homogenisierungspuffer für Präparation von Mikrosomen

250 mM Saccharose; 20 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,4; gelagert bei 4°C

Stripping-Puffer

100 mM Glycin; pH 2,5 (eingestellt mit HCl); bei 4°C gelagert

50x TAE-Puffer

50 mM EDTA pH 8,0; 2 M Tris; 1 M Eisessig

HPLC-Laufmittel

58/42-Gemisch (v/v) aus MeOH und Wasser

Wasser

Wenn nicht anders angegeben wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet.

2.1.3 Polymerasen, Antikörper, Primer und Enzyme

Phire Hot Start DNA Polymerase

Für PCRs mit qualitativer Fragestellung wurde die Phire Hot Start DNA Polymerase (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) verwendet.

Antikörper

Anti-Calnexin (ab75801) / Rabbit, Abcam, Cambridge, UK

Anti-HSD11B1 AB (ab83522) / Rabbit, Abcam, Cambridge, UK

ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab/ GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Oligonukleotide/Primer

Die für PCR verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg. Nach Herstellerangabe wurden die Oligonukleotide mit Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt und bei -20°C gelagert. Für die PCR-Reaktion wurde eine Verdünnung von 1:4 verwendet.

Enzyme

PNGase F / New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland

RevertAid™ H Minus M-Mulv Reverse Transcriptase / Thermo Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA

2.1.4 Kits

MasterPure™ RNA Purification Kit / Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA

ECL® Detektionsreagenz / GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA

Qubit RNA Assay Kit / Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.2 Geräte

Zentrifugen

Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge (Beckman, Krefeld, Deutschland) für Ultrazentrifugationsschritte (Rotor TFT 70)

Heraeus Biofuge-fresco und Heraeus Biofuge-pico (beide Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zur Zentrifugation von Mikroreagiergefäßen

Heraeus Multifuge 1S-R (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

SpeedVac

SpeedVac®-Konzentrator PD121P (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Agarose-Geldokumentation

Gel-JetImager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland)

HPLC

Tabelle 1: Komponenten der verwendeten HPLC-Anlage.

Komponente	Name	Hersteller
Pumpe	Waters 515 HPLC Pump	Waters, Eschborn, Deutschland
Probengeber	Waters 717 plus Autosampler	Waters, Eschborn, Deutschland
UV-Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters, Eschborn, Deutschland
Säule	LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) LiChroCART® 250-4	Merck, Darmstadt, Deutschland

pH-Meter

pH535 MultiCal[®] (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland)

PCR-Cycler

T-Gradient und T-Professional (beide Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)

Dispergiergerät

Ultra-Turrax T25 (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

Zell-Homogenisator

Zell-Homogenisator (Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland)

Photometer

Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Tecan GENios Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz)

Thermoblock

Thermomixer 5436 und Thermomixer 5320 (beides Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Waagen

Sartorius universal und Sartorius Analysenwaage (beides Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)

Spannungsgeber

Power PAC 300 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Vortexer

VF2 (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland)

2.3 Übersicht der Schweinegewebeproben

2.3.1 Probenübersicht

Die Leber-, Darmfett- und Muskelgewebeproben wurden vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf, Mecklenburg-Vorpommern, Institut Ernährungsphysiologie „Oskar Kellner“, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um weibliche Ferkel, die in Tiere mit unterdurchschnittlichem (U-Tiere; 0,8-1,1 kg) und normalem (N-Tiere; 1,4-1,6 kg) Geburtsgewicht unterteilt sind. U- und N-Proben sind in behandelte (=Kalorienrestriktion) und unbehandelte (=Kontrolle) Tiere klassifiziert. U- und N-Tiere sind Vollgeschwister (aus einem Wurf).

Tabelle 2: Anzahl der gelieferten Schweineproben für eine Gewebeart (Leber, Darmfett, Skelettmuskulatur). T0 (Tag 75), T1 (Tag 98), T2 (Tag 103) und T3 (Tag 131) sind die Zeitpunkte der Probennahme. N-Tiere= normalgewichtige Tiere. U-Tiere= untergewichtige Tiere.

	T0	T1	T2	T3
insgesamt	23	34	35	34
Kalorienrestriktion N-Tiere	12	8	8	8
Kontrolle N-Tiere		7	8	9
Kalorienrestriktion U-Tiere	11	10	10	9
Kontrolle U-Tiere		9	9	8

Wie in Tabelle 2 dargestellt, erfolgt eine Unterteilung in acht Gruppen mit 126 Proben pro Gewebe. Insgesamt sind das für alle drei Gewebe rund 378 Proben.

2.3.2 Fütterungsschema

Weibliche Ferkel mit normalem (N-Tiere) und unterdurchschnittlichem (U-Tiere) Geburtsgewicht wurden durch die Muttersau aufgezogen und am Ende der vierten Lebenswoche milchentwöhnt. Nach der Milchentwöhnung wurden die Ferkel einzeln gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Während der Wachstumsphase erhielten die Tiere Futter nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, Society of Nutritional Physiology, 2006). Bei der Hälfte der N- und U-Tiere erfolgte für drei Wochen (Tag 75 bis Tag 98) eine Nahrungsrestriktion (60% im Vergleich zur *ad libitum* Gruppe). Anschließend wurde die Gruppe Kalorienrestriktion bis zum Tag 131 *ad libitum* gefüttert (s. Abbildung 2) [141].

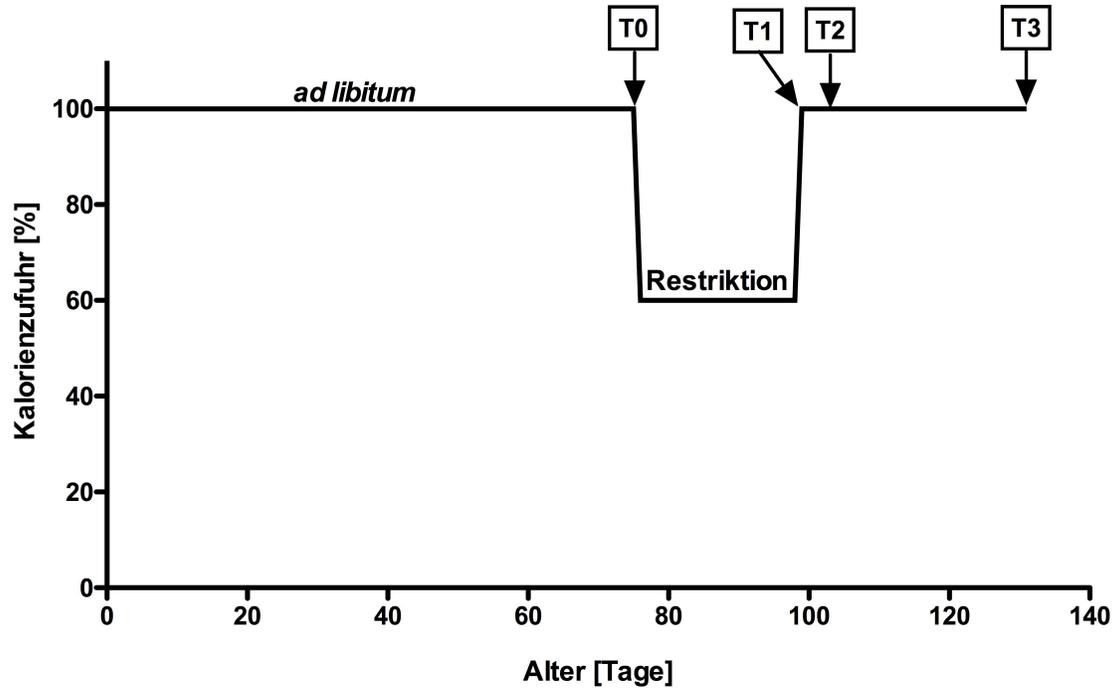


Abbildung 2: Übersicht über den Verlauf der Kalorienrestriktion und Zeitpunkte der Probenentnahmen. T0, Tag 75; T1, Tag 98, T2, Tag 104; T3, Tag 131. *ad lib.*, *ad libitum*; KR, Kalorienrestriktion.

2.3.3 Probennahme

Die Gewebeproben von Leber, Darmfett und Skelettmuskulatur (*M. longissimus dorsi*) zur Untersuchung der 11 β -HSD1 Gen- und Proteinexpression sowie der Enzymaktivität wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen: 11 Wochen (Tag 75), 14 Wochen (Tag 98), 15 Wochen (Tag 104) und 19 Wochen (Tag 131) wie in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Zeitpunkte der Probennahme. KR, Kalorienrestriktion; WF, Wiederanfütterung.

Tag	Behandlung	Bezeichnung/Abkürzung
75	vor Kalorienrestriktion	T0
98	nach drei Wochen KR	T1
104	nach einer Woche WF	T2
131	nach fünf Wochen WF	T3

2.4 RNA-Isolierung aus Schweinegewebe

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA).

2.4.1 RNA-Isolierung aus Schweineleber

Das Gewebe wurden in 600 μ L Tissue-and-Cell-Lysis-Solution mit 2 μ L Proteinase K (50 μ g/ μ L) mittels eines Dispergiergeräts homogenisiert. Die verwendeten Gewebemengen für Leber, Darmfett und Muskel sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Gewebemengen für die RNA-Isolierung.

Gewebe	Menge [mg]
Leber	10-20
Darmfett	140-180
Muskel	120-150

Anschließend wurde wie folgt verfahren (Schritt 1-13):

- 1) 15 min bei 65°C inkubieren und dabei alle 5 min rütteln, danach 3-5 min auf Eis kühlen
- 2) 350 μ L MPC-Protein-Precipitation-Reagent dazugeben und für 10 sec rütteln
- 3) nach Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 10 000 g den Überstand in einen sauberen 2 mL-Cup überführen und das Pellet verwerfen
- 4) Zugabe von 1000 μ L Isopropanol und 40 mal kippen
- 5) nach Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 10 000 g den Überstand verwerfen und Reste mit einer Pipette abziehen
- 6) die Probe in 200 μ L DNase-Puffer resuspendieren, mit 5 μ L DNase I versetzen und bei 37°C für 30 min inkubieren
- 7) Zugabe von 200 μ L 2xTissue-and-Cell-Lysis-Solution und 5 sec rütteln
- 8) Zugabe von 200 μ L MPC-Protein-Precipitation-Reagent, 10 sec rütteln und 3-5 min auf Eis kühlen
- 9) nach Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 10000 g den Überstand in einen sauberen Cup überführen und das Pellet verwerfen
- 10) Zugabe von 500 μ L Isopropanol und 40 mal kippen
- 11) nach Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 10 000 g den Überstand verwerfen und das Pellet zweimal mit 75%igem EtOH waschen
- 12) das Pellet in 75 μ L TE-Puffer aufnehmen und bei 56°C für 10 min inkubieren
- 13) Zugabe von 1,5 μ L Script-Guard-RNase-Inhibitor

2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem Qubit[®] 2.0 Fluorometer der Firma Invitrogen bestimmt. Hierfür wurde das Qubit[®] RNA HS Assay Kit 5-100 ng (Invitrogen) verwendet.

Die jeweilige RNA-Probe wurde mit TE-Puffer verdünnt. Es wurde eine Standardkurve mit zwei fertigen Standards erstellt. Anschließend wurden 2 μL der vorverdünnten RNA verwendet und jede Probe wurde dreimal vermessen.

2.6 cDNA-Synthese aus Schweinegewebe

Die reverse Transkription erfolgte mittels RevertAid[™] H Minus M-Mulv Reverse Transcriptase unter Verwendung von Random-Hexamer Primern. Für die Synthese wurde wie folgt vorgegangen:

- 1) Es wurden 4 μg RNA in die Reaktion eingesetzt, mit 4 μL (0,4 μg) Random Hexamer (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) versetzt und für 5 min bei 70°C inkubiert zur Aufschmelzung der Sekundärstrukturen der RNA
- 2) Der Mastermix für eine Probe wurde wie folgt angesetzt: 8 μL Puffer, 4 μL 10 mM 4 dNTP Mix (1 mM Endkonzentration), 1 μL RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ μL) und 3 μL Nuclease-freies Wasser. Nach der Zugabe von 16 μL wurde für 5 min bei 25°C inkubiert.
- 3) Nach Zugabe von 2 μL RevertAid[™] H Minus M-Mulv Reverse Transcriptase (200 units) erfolgte die Inkubation für 10 min bei 25°C und die anschließende reverse Transkription für 60 min bei 42°C.
- 4) Die Reaktion wurde gestoppt, indem für 10 min bei 70°C inkubiert wurde. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.7 Semi-quantitative PCR

In Tabelle 5 sind die verwendeten Temperaturprogramme des PCR-Cyclers dargestellt. Die fett markierten Programmschritte wurden je nach Anwendung 20- bis 30-mal wiederholt. Tabelle 6 zeigt die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide β -Actin und 11 β -HSD1.

Tabelle 5: PCR-Programm der Phire-Hot-Start-Polymerase.

Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	30 sec	98°C
Denaturierung	30 sec	98°C
Annealing	20 sec	60°C
Elongation	20 sec	72°C
Finale Elongation	2 min	72°C
Kühlung	Pause	4°C

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten designten Primer.

	forward	reverse
Ss- β -Actin (<i>ACTB</i>)	gcaccactggcattgtca	tgatgtccacgtcgcact
Ss-11 β -HSD1-All (<i>HSD11B1</i>)	aagaaggtggtgtccacag	gagaccgaggatacagagcg

2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Herstellung analytischer Gele wurde TAE-Puffer mit 1% (w/v) Agarose versetzt. Dieses Gemisch wurde aufgekocht bis es schlierenfrei war. 0,01% (v/v) Gel-RedTM Nucleic Acid Gel Stain wurden als DNA-Farbstoff zum Gemisch zugegeben. Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit dem Ladepuffer 6x DNA-Loading-Dye versetzt. Neben den Proben wurde das ausgehärtete Gel mit einem geeigneten DNA-Marker beladen. Die Elektrophorese lief je nach Größe des Gels bei konstanten Stromstärken von 80-120 mA. Nach Beleuchtung des Agarosegels mit UV-Licht wurde dieses zur Dokumentation mit der Gel-Dokumentationsanlage Gel-JetImager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert.

2.7.2 Densitometrische Auswertung der semiquantitativen PCR

Die 11 β -HSD1 mRNA-Expression wurde mit semiquantitativer RT-PCR ermittelt und in Verhältnis zur Expression des Referenzgenes β -Actin (*ACTB*) gesetzt. Bei jedem Versuch bzw. bei jeder PCR wurde eine Kontrolle (Pool aus verschiedenen Proben) mitgeführt, auf welche dann alle berechneten Werte (Ratio 11 β -HSD1/ β -Actin) normalisiert wurden. Dies ermöglicht einen Vergleich aller Werte, auch bei unterschiedlichen experimentellen Rahmenbedingungen (z.B. Belichtungsdauer der PCR-Gele oder die Zyklenzahl). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm GIMP 2.8.

2.8 Präparation von Mikrosomen aus Schweinegewebe

Die gesamte Präparation erfolgte auf Eis.

Eiskalter Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitor wurden zum Gewebe gegeben (in Tabelle 7 sind die verwendeten Mengen dargestellt) und kurz mit dem Ultra-Turrax auf Eis zerkleinert. Die Zellen wurden mit dem Potter-Gewebe-Homogenisator lysiert und anschließend für 30 min bei 4°C bei steigenden g-Zahlen zentrifugiert (Heraeus Biofuge-fresco, 10 min 650 g, 10 min 6 500 g, 10 min 10 000 g). Der Überstand wurde abpipettiert und 60 min bei 100 000 g und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Rotor TFF70). Das Pellet wurde in 1 mL 150 mM KCl resuspendiert, manuell mit dem Potter homogenisiert (fünfmal rauf und runter) und erneut für 45 min bei 100 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde, je nach Größe in 50 bis 200 µL Homogenisierungspuffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 7: Gewebemengen für die Mikrosomenpräparation. HP, Homogenisierungspuffer.

Gewebe	Menge [g]	HP [mL]
Leber	0,15-0,3	1,5
Darmfett	0,6-0,8	2,5
Muskel	0,3-0,5	2

2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Verfahren nach Bradford [142]. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Kalibrierung mit 0,1-1,4 mg/mL BSA in Homogenisierungspuffer durchgeführt. Die jeweils zu vermessende Probe wurde in Homogenisierungspuffer verdünnt (Leber 1:40, Darmfett 1:10 und Muskel 1:5) und in einer 96-Well-Mikrotiterplatte 5 µL Standard oder Probe mit jeweils 250 µL Bradford-Reagenz versetzt und mindestens 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 595 nm mit Hilfe des Tecan GENios Pro (Fa. Tecan) gemessen. Anhand der ermittelten Standardkurve konnte die Konzentration der Proteinlösungen bestimmt werden.

2.10 SDS-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel Elektrophorese) nach Laemmli [143]. Bei dem verwendeten SDS-Gelsystem handelte es sich um das Novex NuPAGE SDS-PAGE Gel System mit NuPage 4-12% Bis-Tris Gelen mit 10 Taschen (Fa. Life Technologies/Invitrogen). Zur Vorbereitung der Probe wurde diese mit 4x LDS Sample Buffer und 10x Sample Reducing Agent versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 oder 30 μL aufgefüllt. Je nach Gewebe wurden unterschiedliche Mengen an Protein aufgetragen: Leber 8 μg Protein, Darmfett 30 μg Protein und Muskel 30 μg Protein. Die Probe wurde für 10 min bei 70°C inkubiert. Bei dem verwendeten Proteinstandard handelte es sich um den PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Die Elektrophorese erfolgte für 35 min bei einer konstanten Spannung von 150 V.

2.11 Western Blot

Die durch die SDS-Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden mit Hilfe des XCell II™ Blot Module (Fa. Thermo Fisher Scientific) auf eine Immobilon-P PVDF-Membran (Fa. Merck Millipore) übertragen. Dabei wurde die Semi-Dry Blot Methode verwendet [144]. Es wurden zwei Whatman Filterpapiere, eine PVDF Membran (Fa. Merck Millipore) und fünf Stücke Schaumstoff benötigt und entsprechend vorbereitet. In Abbildung 3 ist der schematische Aufbau für die Vorbereitung der Semi-Dry Blot Methode gezeigt. Die Membran wurde durch Einlegen für 30 Sekunden in MeOH aktiviert und dann in Transferpuffer gelegt. Die Filterpapiere und die Schaumstoffe wurden ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde das Blot-Sandwich in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: 2x Schaumstoff, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und 3x Schaumstoff. Die Übertragung war nach einer Stunde bei 30 V beendet.

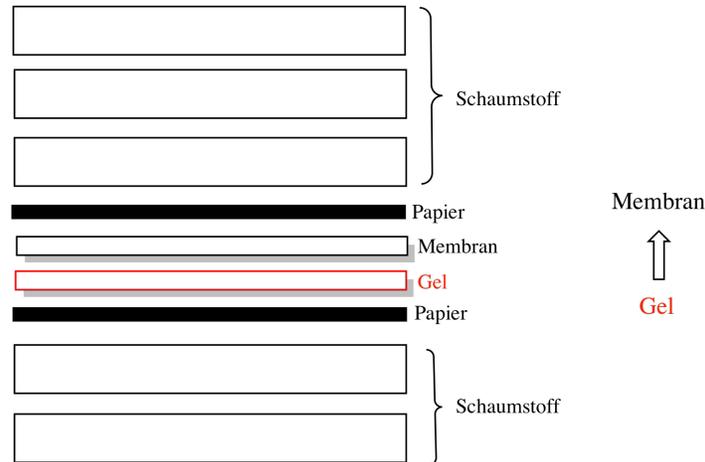


Abbildung 3: Schematischer Aufbau für das Blot-Sandwich.

Anschließend wurde die freien Bindungsstellen auf der Membran mit 5% filtriertem Milchpulver in PBS-T (0.1% Tween 20) für 90 min oder über Nacht bei 4°C unter Schütteln blockiert. Dann wurde die Membran zweimal mit PBS-T gespült, mit dem primären Antikörper [anti-HSD11B1 (ab83522) in 2,5% Milchpulver in PBS-T] versetzt und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Spülen und sechsmaligen Waschen in PBS-T-Puffer für insgesamt 40 min (1x10 min, 2x5 min, 1x10 min, 2x5 min) wurde der überschüssige primäre Antikörper entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung zugegeben [ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody in 2,5% Milchpulver in PBS-T] und für 90 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem Spülen und Waschen wurde die Membran für 5 min in ECL[®] Detektionsreagenz gegeben. Anschließend erfolgte die Belichtung eines Films (Amersham Hyperfilm[™] ECL, GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA) in einer Fotokassette. Der belichtete Film wurde danach für einige Sekunden bis 1 min entwickelt und 3-5 min fixiert (LX24 Entwickler und AL4 Fixierer, beide Kodak, Rochester, NY, USA; beide 1:5 verdünnt). Eine Übersicht über die verwendeten Verdünnungen der Antikörper für die verschiedenen Gewebe ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper-Lösungen für die unterschiedlichen Schweinegewebe.

	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
Leber	1: 2000	1: 10 000
Darmfett	1: 1500	1: 20 000
Muskel	1: 1500	1: 20 000

2.11.1 Detektion des Referenzproteins

Für die Detektion des Referenzproteins wurde die Membran zweimal für 30 min in Stripping-Puffer (100 mM Glycin pH 2,5) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran insgesamt 40 min gewaschen (1x10 min, 2x5 min, 1x10 min, 2x5 min), 5 sec in MeOH reaktiviert, erneut für 40 min gewaschen und dann mit 5% Milchpulver in PBS-T für 90 min oder über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper anti-Calnexin (ab75801) in 2,5% Milchpulver in PBS-T für 90 min bei 4°C geschüttelt. Nach erneutem Spülen und Waschen wurde mit dem sekundären Antikörper [ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody in 2,5% Milchpulver in PBS-T] für 90 min bei 4°C geschüttelt. Abschließend wurde wieder mit PBS-T gespült und gewaschen (1x10 min, 2x5 min, 1x10 min, 2x5 min). Die Filmentwicklung erfolgte wie in Kapitel 2.11 beschrieben. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper-Verdünnungen für die verschiedenen Gewebe sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Antikörper-Lösungen zur Detektion des Referenzproteins in den Schweineproben.

	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
Leber	1: 3500	1: 10 000
Darmfett	1: 4000	1: 20 000
Muskel	1: 4000	1: 10 000

2.11.2 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Die 11 β -HSD1 Protein-Expression wurde mittels Western Blot bestimmt und in Verhältnis zur Expression des Referenzproteins anti-Calnexin gesetzt. Bei jedem Western Blot wurde eine Kontrolle (Pool aus verschiedenen Proben) mitgeführt, auf die dann alle berechneten Werte (Ratio 11 β -HSD1/anti-Calnexin) normalisiert wurden. Dies ermöglicht einen Vergleich aller Werte, auch bei unterschiedlichen experimentellen Rahmenbedingungen (z.B. Belichtungsdauer der Filme). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms GIMP 2.8.

2.12 N-Deglykosylierung der 11 β -HSD1

Das Enzym Peptid-N4-(N-Acetyl- β -glucosaminyl)asparagin-Amidase (PNGase F) wurde zur N-Deglykosylierung von 11 β -HSD1 in Schweineleber verwendet. Die Mikrosomen wurden mit 10x Glycoprotein Denaturing Buffer (5% SDS, 10% β -Mercaptoethanol), wie in Tabelle 10 aufgeführt, behandelt. Dann wurden die Proben für 10 min. bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das denaturierte Protein mit dem Enzym PNGase F behandelt (siehe Tabelle 11). Der 10x G7 Reaction Buffer enthielt 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,5. Die Inkubation erfolgte für 2,5 h bei 37°C. Danach wurden die Proben mit 7 μ L Puffer (10x Sample Reducing Agent und 4x LDS Sample Buffer) versetzt, für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.10).

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Denaturierung des Proteins für die Deglykosylierung mit PNGase F.

Komponenten	Volumen [μ L]
10 μ g Probe	unterschiedlich
10x Glycoprotein Denaturing Buffer	1
H ₂ O	ad (10-Probe) μ L

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die PNGase F Behandlung.

Komponenten	Volumen [μ L]	Endkonzentration
Aliquot aus Denaturierungsansatz	10	
10x G7 Reaction Buffer	2	1x
10% NP-40	2	1%
PNGase F (500 U/ μ L)	2	25 U/ μ L
H ₂ O	4	
Endvolumen	20	

2.13 Aktivitätstest von Schweinemikrosomen mittels HPLC

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der 11 β -HSD1 wurde die Umsetzung von Cortison zu Cortisol (Reduktasereaktion) mittels HPLC gemessen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Clarity der Fa. Data Apex (Prag, Tschechien).

2.13.1 Aktivitätsbestimmung der Mikrosomen

Der Gesamtansatz pro Reaktion betrug 250 μ L. Zur Überprüfung der Aktivität wurden 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 20 mM Cortison, 8 mM NADPH und Mikrosomen 3h bei 37°C inkubiert. In den Tabellen 12, 13 und 14 sind die Endkonzentrationen im Ansatz dargestellt, die in der Reaktion verwendet wurden. Durch die Zugabe von 250 μ L eiskaltem Ethylacetat wurde die Reduktasereaktion gestoppt. Anschließend wurde ausgeschüttelt (30 sec mit dem Vortex), zur Phasentrennung 2 min bei 16 000 g zentrifugiert und die organische Phase abgenommen. Danach wurde zweimal analog ausgeschüttelt. Die vereinten Ethylacetatfraktionen wurden noch einmal zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Lösungsmittel i. Vak. verdampft. Anschließend wurde der Rückstand in 150 μ L Laufmittel aufgenommen und auf die HPLC aufgetragen.

Tabelle 12: Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Schweinelebermikrosomen.

	Konzentration im Ansatz	Volumen [μL]
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)	100 mM	215
Cortison (in MeOH)	400 μ M	5
NADPH	0,8 mM	25
Lebermikrosomen	unterschiedlich	5

Tabelle 13: Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Schweinedarmfettmikrosomen.

	Konzentration im Ansatz	Volumen [μL]
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)	100 mM	120
Cortison (in MeOH)	400 μ M	5
NADPH	0,8 mM	25
Darmfettmikrosomen	unterschiedlich	100

Tabelle 14: Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Schweinemuskelmikrosomen.

	Konzentration im Ansatz	Volumen [μL]
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)	100 mM	170
Cortison (in MeOH)	400 μM	5
NADPH	0,8 mM	25
Muskelmikrosomen	unterschiedlich	50

Als Laufmittel diente ein 58:42-Gemisch von Methanol und Wasser (v/v). Die Flussrate betrug 0,6 mL/min, gemessen wurde die Absorption bei 262 nm und es wurden 25 μL der Probe injiziert. Dabei wurde die Umsetzung zu Cortisol gemessen. Als Positivkontrolle dienten humane Lebermikrosomen und in der Negativkontrolle wurden die Mikrosomen durch 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) ersetzt.

2.14 11 β -HSD1-Expression im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Mauseleber

2.14.1 Probenübersicht

Tabelle 15 zeigt eine Übersicht über die Behandlung und Anzahl der Mauseleberproben. Die Lebergewebebeurteilungen sowie die RNA wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Rimbach, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrechts-Universität Kiel, bereitgestellt.

Tabelle 15: Übersicht über die Behandlung und Anzahl der Mauseleberproben. WF, Wiederaanfütterung; KR, Kalorienrestriktion; AL, *ad libitum*.

Behandlung	Bezeichnung/Abkürzung	Anzahl der Proben
nach sechs Monaten KR	T1	AL=7 und KR=9
nach zwei Wochen WF	T2	AL=7 und KR=10
nach sechs Monaten WF	T3	AL=7 und KR=10

2.14.2 Fütterungsschema

Männliche C57BL/6JRj Wildtyp Mäuse wurden in zwei Gruppen unterteilt: 21 Tiere wurden *ad libitum* ernährt und 29 erhielten für 6 Monate eine Nahrungsrestriktion (75% im Vergleich zur Kontrollgruppe). Anschließend erfolgte eine Wiederaanfütterung in der Gruppe Restriktion durch eine *ad libitum* Ernährung für zwei Wochen und sechs Monate (s. Abbildung 4) [145, 146].

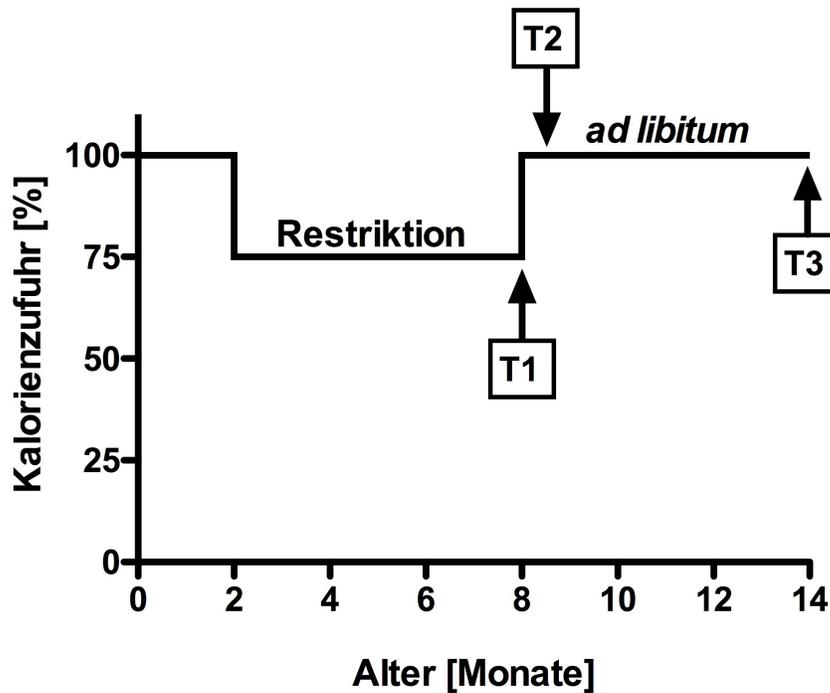


Abbildung 4: Darstellung des Fütterungsschemas im Mausversuch. T1, 6 Monate Kalorienrestriktion; T2, nach zwei Wochen *ad libitum*; T3, nach 6 Monaten *ad libitum*.

2.14.3 cDNA-Synthese aus Mausleber

Die reverse Transkription erfolgte mittels RevertAid™ H Minus M-Mulv Reverse Transcriptase unter Verwendung von Random-Hexamer Primern. Es wurden 200 ng RNA eingesetzt. Die Synthese erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben.

2.14.4 semiquantitative PCR

In Tabelle 16 sind die verwendeten Temperaturprogramme des PCR-Cyclers dargestellt. Die fett markierten Programmschritte wurden je nach Anwendung 20- bis 30-mal wiederholt. Tabelle 17 zeigt die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide β -Actin und 11 β -HSD1.

Tabelle 16: PCR-Programm der Phire-Hot-Start Polymerase.

Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	30 sec	98°C
Denaturierung	30 sec	98°C
Annealing	20 sec	60°C
Elongation	20 sec	72°C
Finale Elongation	2 min	72°C
Kühlung	Pause	4°C

Tabelle 17: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für Maus.

	forward	reverse
Mm- β -Actin (<i>ACTB</i>)	ctaggcggactgttactgaga	catcctcctcttaggagtggg
Mm-11 β -HSD1-All (<i>HSD11B1</i>)	acgcaaaagcgaggtgtact	tcaaagttcacaactgcaggc

2.14.5 Mikrosomenpräparation aus Mausleber

Die gesamte Präparation erfolgte analog zu Kapitel 2.8. Dabei wurden 70-100 mg Mausleber mit 1,5 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitor verwendet.

2.14.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Es wurden 30 μ g Protein aufgetragen und die elektrophoretische Auftrennung wurde wie in Kapitel 2.10 durchgeführt. Der Western Blot und die Detektion des Referenzproteins sind in Kapitel 2.11 und 2.11.1 beschrieben.

Tabelle 18: Antikörper zur Detektion des 11 β -HSD1-Proteins in Mausleber.

Antikörper	Verdünnung
anti-HSD11B1	1: 3000
ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody	1: 20 000

Tabelle 19: Antikörper zur Detektion des Referenzproteins.

Antikörper	Verdünnung
anti-Calnexin	1: 3000
ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody	1: 20 000

2.14.7 Aktivitätsbestimmung der Mauselebermikrosomen mittels HPLC

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.13 beschrieben. In Tabelle 20 sind die verwendeten Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion dargestellt.

Tabelle 20: Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Mauselebermikrosomen.

	Konzentration im Ansatz	Volumen [μL]
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)	100 mM	215
Cortison (in MeOH)	400 μM	5
NADPH	0,8 mM	25
Lebermikrosomen	unterschiedlich	5

2.15 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA) als Mittelwerte + Standardabweichung (SD) berechnet und grafisch dargestellt. „Kolmogorov-Smirnov“-Test und „Shapiro-Wilk“-Test wurden zur Überprüfung der Normalverteilung benutzt. Alle experimentellen Datensätze wurden mittels Student's t-Test verglichen. p-Werte ($< 0,05$) wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die statistische Untersuchung der Daten der Schweineleberproben im Vergleich zum Zeitpunkt Null (vor der Kalorienrestriktion) erfolgte mit ANOVA (= analysis of variance). Statistische Signifikanzen sind definiert als $p < 0,05$ und wurden in den Grafiken als Stern markiert.

3 Ergebnisse

Es gibt Hinweise, dass die 11 β -HSD1-Expression und Aktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion im Fettgewebe und der Skelettmuskulatur herunterreguliert und in der Leber hochreguliert ist [147]. Um einen möglichen Einfluss einer Kalorienrestriktion zu bestimmen, wurden Mausleberproben sowie Schweingewebeproben untersucht. Die Bestimmung der mRNA-, Protein- und Aktivitätslevel erfolgte mittels semi-quantitativer RT-PCR, Western-Blot Analyse und HPLC.

3.1 11 β -HSD1-Expression im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Mausleber

Zunächst wurden 11 β -HSD1 mRNA-, Protein- und Aktivitätslevel in Mausleber nach sechs Monaten Kalorienrestriktion und anschließender Wiederaanfütterung (2 Wochen und 6 Monate) untersucht.

3.1.1 mRNA

Die Ergebnisse der 11 β -HSD1 mRNA-Expression nach Kalorienrestriktion und anschließender 2 Wochen Wiederaanfütterung sind in Abbildung 5 dargestellt. Nach der Kalorienrestriktion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der AL und KR Gruppe. Im Gegenteil dazu zeigte sich nach 2 Wochen Wiederaanfütterung ein signifikanter Anstieg der mRNA in der KR Gruppe im Vergleich zur Kontrolle.

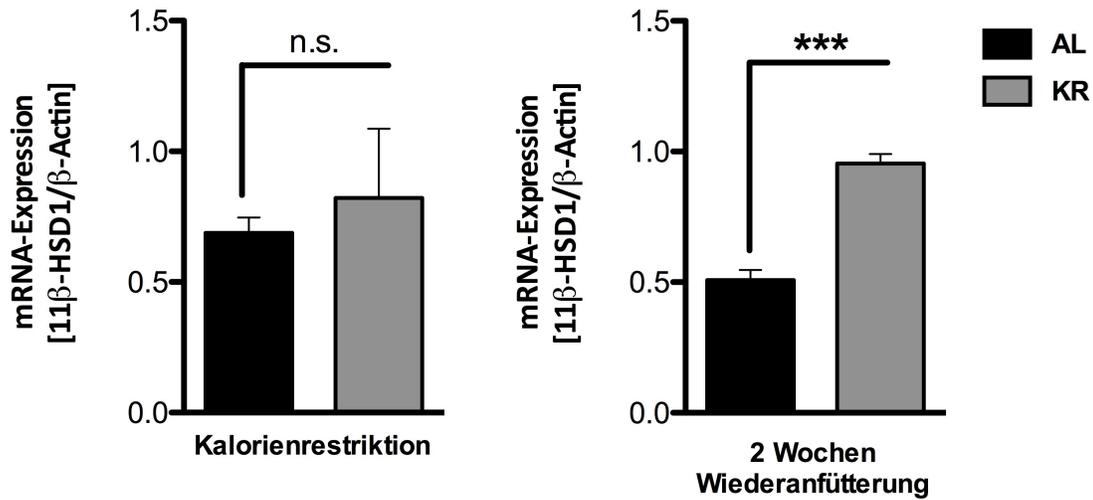
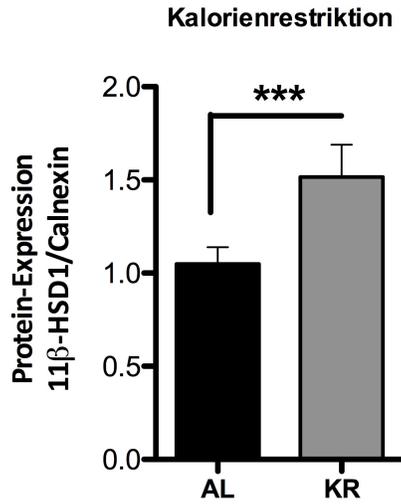


Abbildung 5: 11β-HSD1 mRNA-Expression nach 6 Monaten Kalorienrestriktion und 2 Wochen Wiederaanfütterung in Mausleber. AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion. Es sind die Mittelwerte ± SD dargestellt. *** p < 0,0001; n.s., nicht signifikant. n= 6-10 (pro Gruppe).

3.1.2 Protein

Wie in Abbildung 6 dargestellt, ist die 11β-HSD1 Protein-Expression nach 6 Monaten signifikant erhöht in der KR Gruppe verglichen mit der AL Kontrollgruppe. Jedoch zeigte sich nach 2 Wochen und 6 Monaten Wiederaanfütterung kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Im Vergleich dazu fand sich kein Unterschied nach 6 Monaten Kalorienrestriktion in der mRNA-Expression, aber ein signifikanter Anstieg nach 2 Wochen Wiederaanfütterung in der KR Gruppe verglichen mit der AL Kontrollgruppe. Die mRNA-Expression nach 6 Monaten Wiederaanfütterung wurde nicht bestimmt (s. Abbildung 5).

A



B

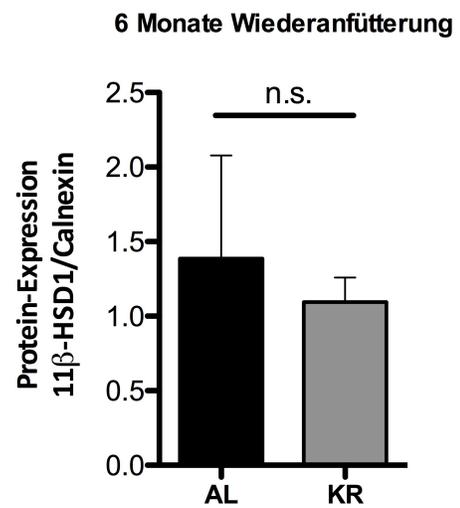
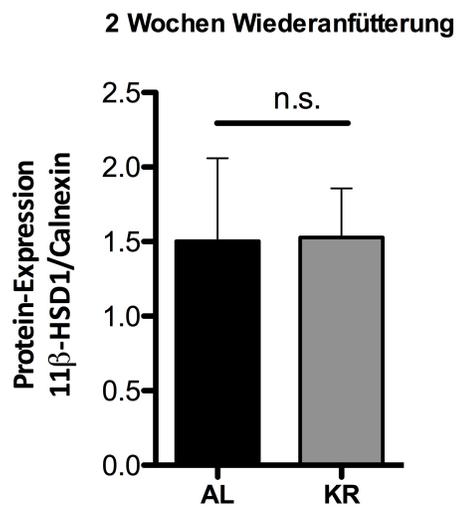


Abbildung 6: 11β-HSD1 Protein-Expression in Mausleber. (A) Protein-Expression nach 6 Monaten Kalorienrestriktion; (B) Protein-Expression nach 2 Wochen sowie 6 Monaten Wiederanfütterung. AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion. Es sind die Mittelwerte ± SD dargestellt. *** $p < 0,0001$; n.s., nicht signifikant. $n=7-10$ (pro Gruppe).

3.1.3 Aktivität

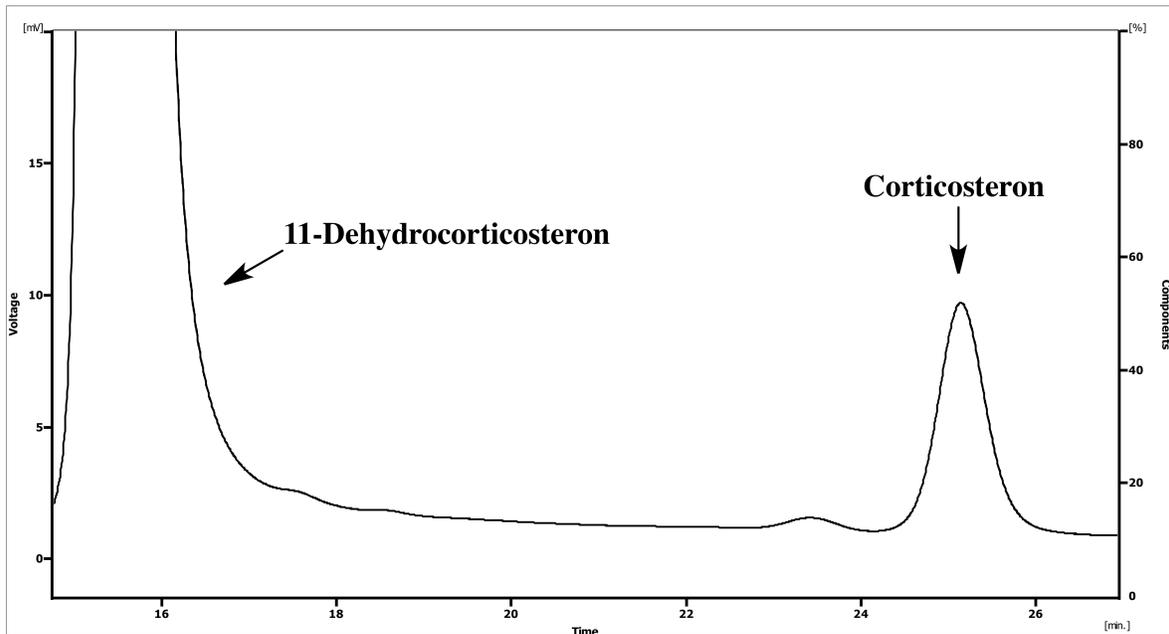


Abbildung 7: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der 11 β -HSD1 katalysierten 11-Dehydrocorticosteron-Reduktion zu Corticosteron.

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob die 11 β -HSD1-Aktivität in Mauseleber mit den Veränderungen auf Proteinebene korrelieren. Dazu wurde die 11 β -HSD1 katalysierte 11-Dehydrocorticosteron-Reduktion zu Corticosteron mittels HPLC gemessen (Abbildung 7). Tatsächlich zeigte sich, dass die Enzymaktivität in der Gruppe KR nach 6 Monaten signifikant höher im Vergleich zu AL ist, ähnlich zur Proteinexpression. Im Vergleich zu den Ergebnissen der 11 β -HSD1 Protein-Expression war die Aktivität nach 2 Wochen und 6 Monaten Wiederaufütterung signifikant erhöht in der KR Gruppe im Vergleich zu AL. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Enzymaktivität, gegenüber den jeweiligen Kontrollen, sich im Laufe der Wiederaufütterung erhöhte (s. Abbildung 8).

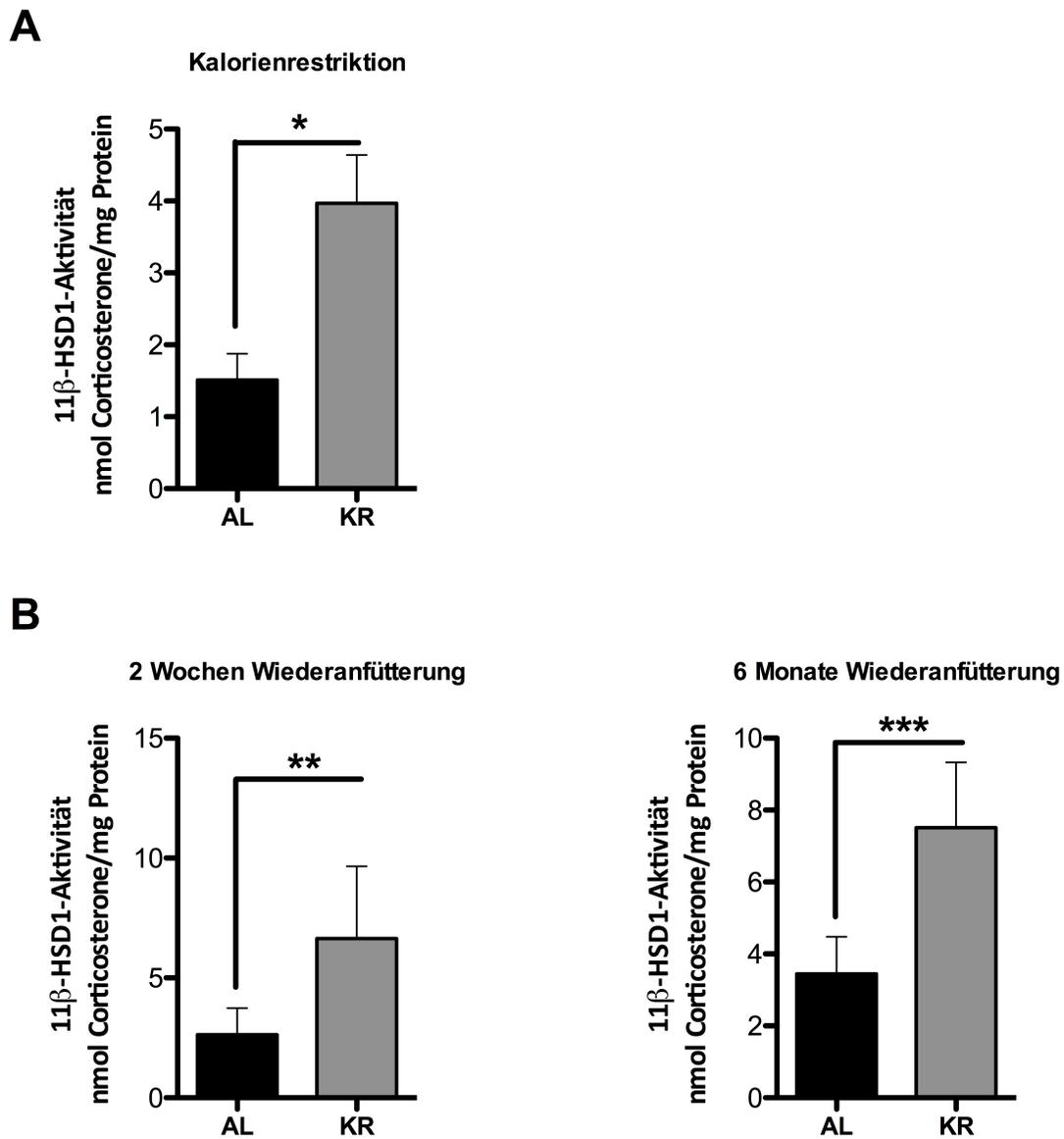


Abbildung 8: 11β-HSD1-Enzymaktivität in Mauseleber. (A) Protein-Expression nach 6 Monaten Kalorienrestriktion; (B) Protein-Expression nach 2 Wochen sowie 6 Monaten Wiederanfütterung. AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion. Es sind die Mittelwerte ± SD dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. $n = 7-10$ (pro Gruppe).

3.2 11 β -HSD1 mRNA Expression im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Schweinegewebeproben

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der 11 β -HSD1-Expression in Mausleber Spezies-abhängig sind, wurden Schweineproben aus einer Kalorienrestriktionsstudie untersucht. Dazu wurde die 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Glucocorticoid-abhängigen Geweben, wie Leber, Darmfett und Skelettmuskulatur in Schweineproben ermittelt.

Tabelle 21 zeigt eine Übersicht der verwendeten Proben zur Erfassung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber-, Darmfett- und Muskel nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung. Die Proben sind in Tiere mit normalem (N-Tiere) und unterdurchschnittlichem Geburtsgewicht (U-Tiere) unterteilt.

Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Proben der N- und U-Tiere zur Bestimmung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber-, Darmfett- und Muskel. n= Anzahl der Tiere; Zeitpunkt T0: vor der Kalorienrestriktion (Tag 75); T1: nach drei Wochen Kalorienrestriktion (Tag 98); T2: nach einer Woche Wiederanfütterung (Tag 104); T3: nach fünf Wochen Wiederanfütterung (Tag 131). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

(A) Schweineleber

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	8		11	
T1	9	9	9	10
T2	8	8	9	9
T3	9	7	8	9

(B) Schweinedarmfett

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	9		11	
T1	7	8	8	10
T2	7	7	7	8
T3	7	5	7	9

(C) Schweinemuskel

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	11		12	
T1	9	10	11	11
T2	7	7	7	6
T3	6	6	5	6

3.2.1 Leber

Die Abbildung 9 zeigt jeweils ein repräsentatives Agarosebild zur Erfassung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber in der Gruppe N- und U-Tiere nach Kalorienrestriktion und Wiederanfütterung mittels sqRT-PCR. β -Actin wurde als Referenzgen verwendet. Kontrolle bedeutet in diesem Fall ein Pool aus zehn Schweineleberproben, die als interne positive Kontrolle verwendet wurde.

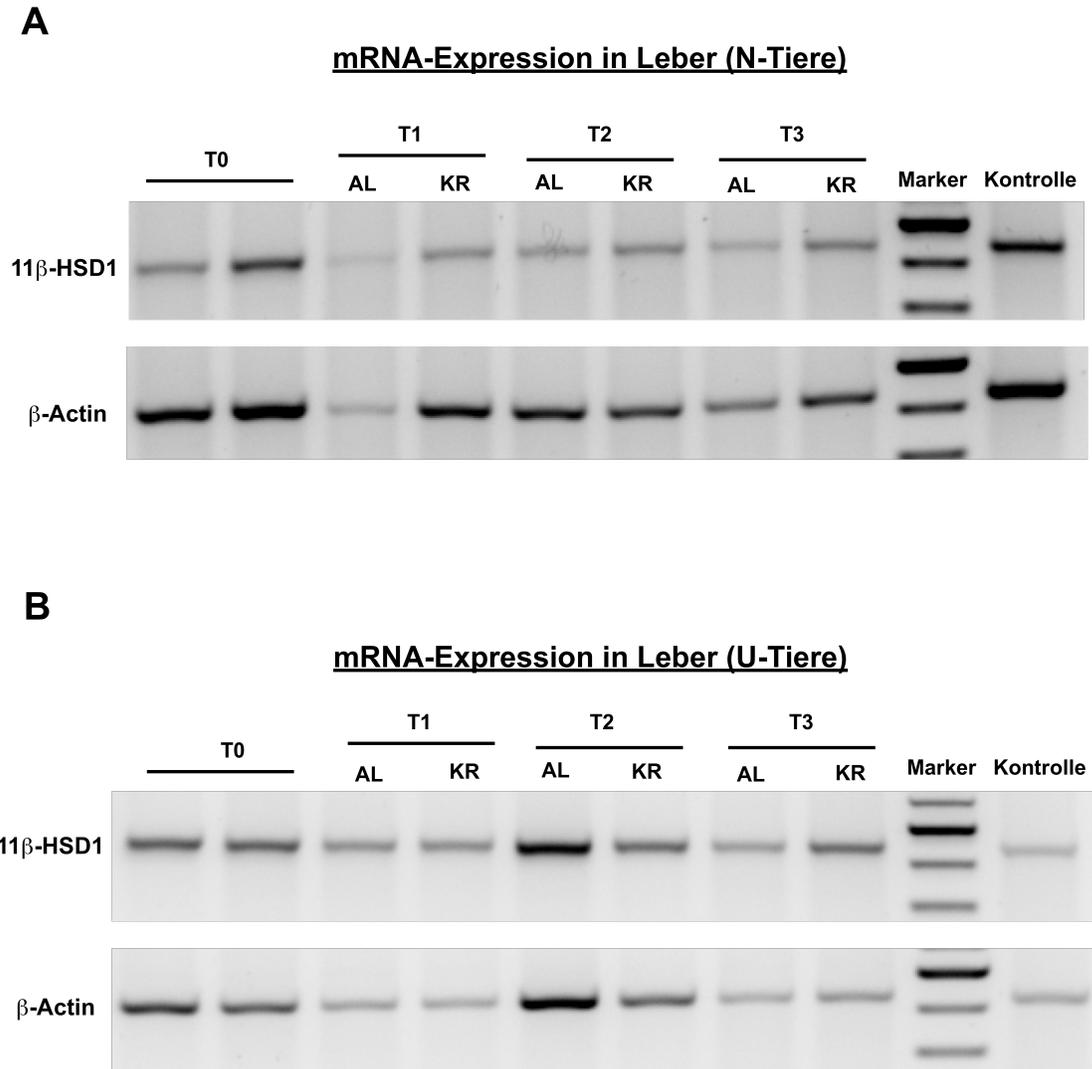


Abbildung 9: Repräsentatives Agarosebild der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber. (A) mRNA Expression in der Gruppe N-Tiere; (B) mRNA-Expression in der Gruppe U-Tiere. β -Actin dient als Referenzgen. Zeitpunkt T0 (Tag 75; vor der Kalorienrestriktion), T1 (Tag 98; nach drei Wochen Kalorienrestriktion), T2 (Tag 104; nach einer Woche Wiederanfütterung) und T3 (Tag 131; nach fünf Wochen Wiederanfütterung). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

Abbildung 10 zeigt die densitometrische Auswertung zur Bestimmung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber in den Gruppen N- und U-Tiere vor und nach Kalorienrestriktion sowie nach 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung. Im Vergleich zu den Ergebnissen auf mRNA Ebene aus der Mausstudie sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe AL und KR in Schweineleber zu beobachten. Dieses Resultat gilt sowohl für die Proben aus der Gruppe N als auch für die Proben aus der Gruppe U. Außerdem gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben aus der Gruppe N und U-Tiere vor einer Kalorienrestriktion (T0) im Vergleich zu den Proben nach Kalorienrestriktion (Kalorienrestriktion: AL und KR) sowie 1 Woche (AL und KR) und 5 Wochen (AL und KR) Wiederanfütterung.

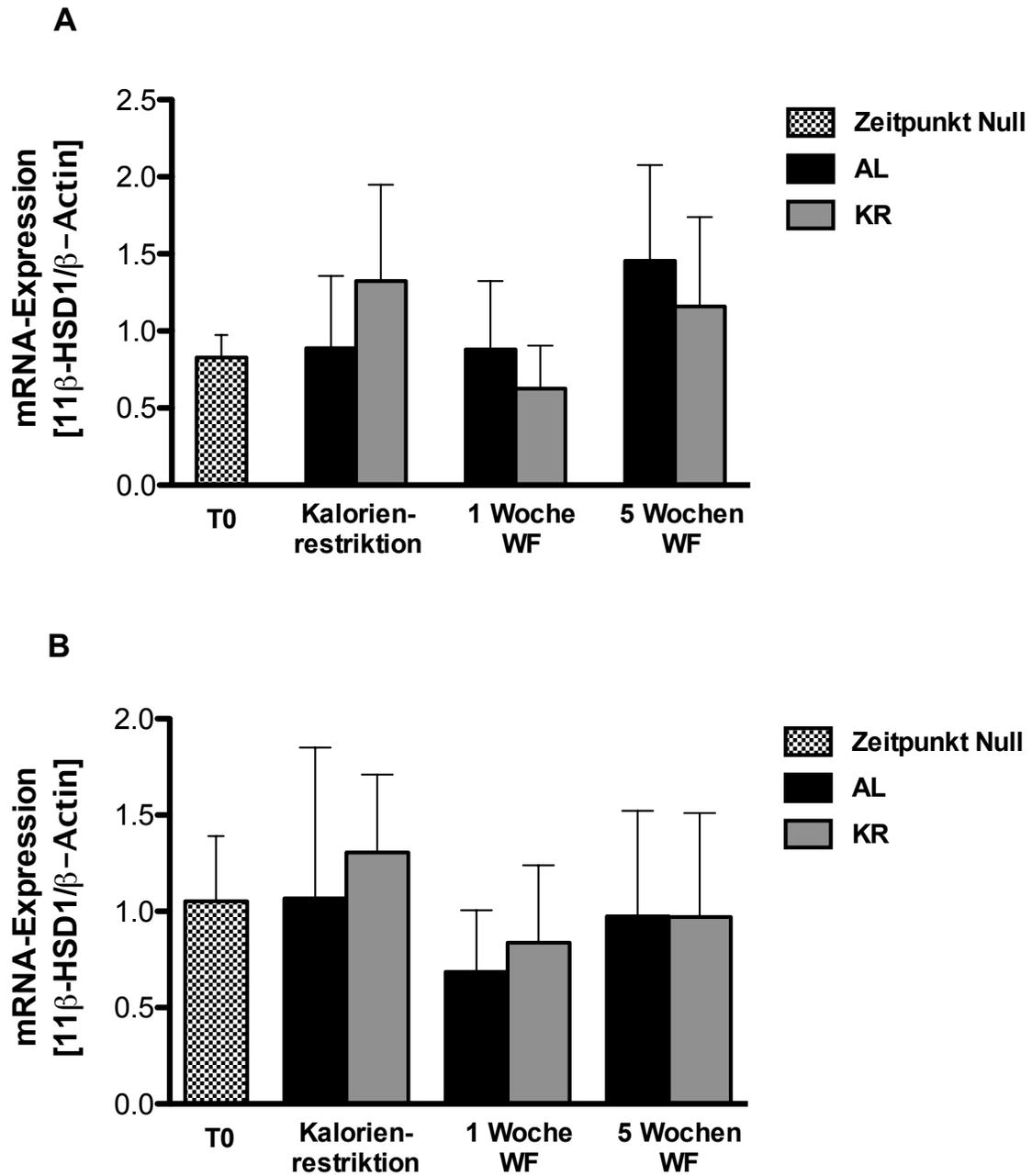


Abbildung 10: 11β-HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung von 1 und 5 Wochen. (A) mRNA-Expression in N-Tieren; (B) mRNA-Expression in U-Tieren. Es sind die Mittelwerte ± SD dargestellt. n=8-11 (pro Gruppe). T0: vor der Kalorienrestriktion; AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion; WF: Wiederanfütterung.

3.2.2 Darmfett

Zur Erfassung der 11β -HSD1 mRNA-Expression in Darmfett in N- und U-Tieren nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung wurden sqRT-PCR Experimente durchgeführt. Die Abbildung 11 zeigt repräsentative Agarosebilder der 11β -HSD1 mRNA-Expression in Darmfett in der Gruppe N- und U- Tiere vor und nach Kalorienrestriktion sowie nach 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung. β -Actin wurde als Referenzgen verwendet. Außerdem wurde eine zusätzliche Kontrolle in den Versuchen eingesetzt. Es handelte sich um einen Pool aus zehn Schweinedarmfettproben, die als interne positive Kontrolle genutzt wurden.

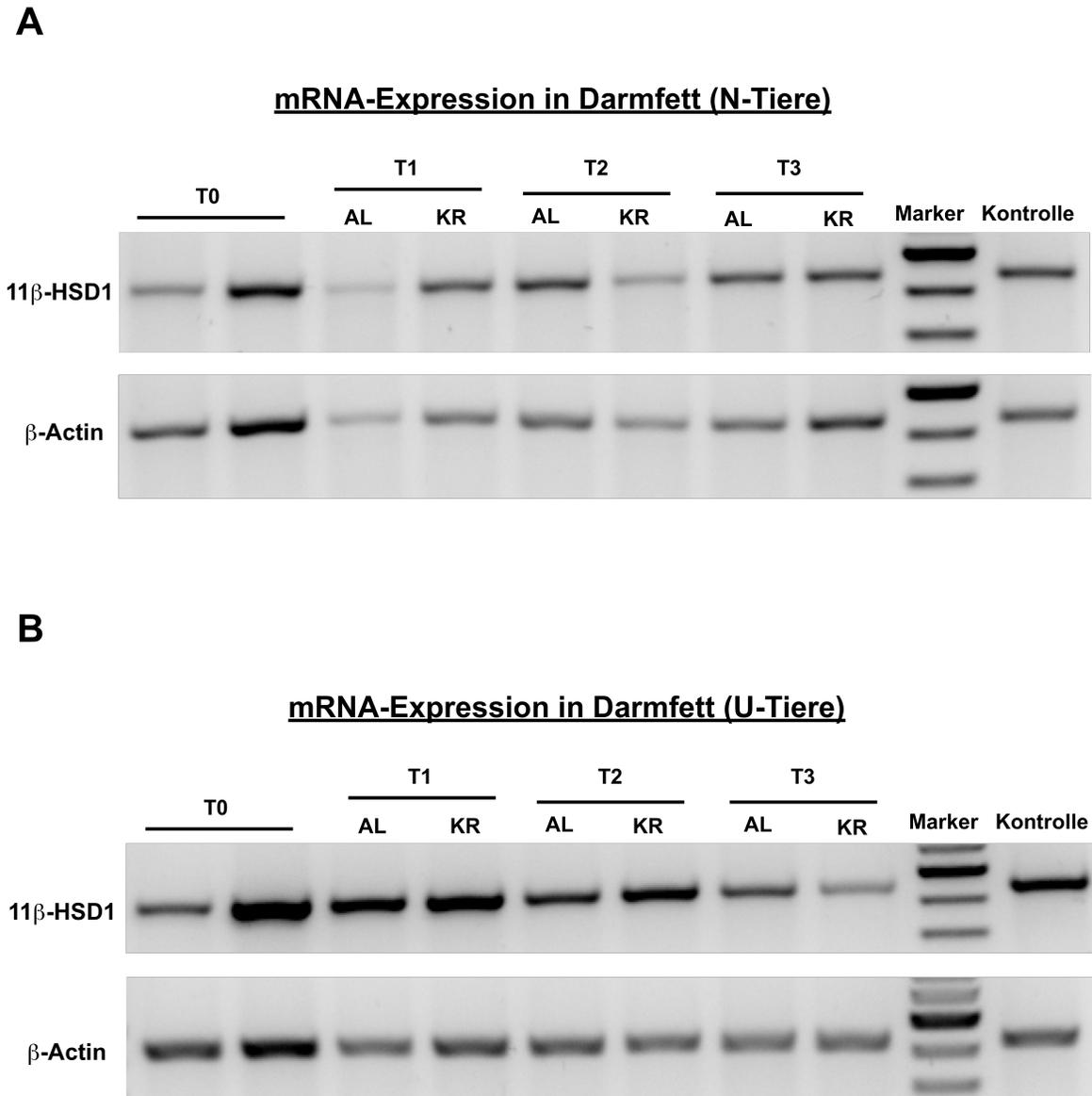


Abbildung 11: Repräsentatives Agarosebild der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Darmfett. (A) mRNA-Expression in der Gruppe N-Tiere; (B) mRNA-Expression in der Gruppe U-Tiere. β -Actin dient als Referenzgen. Zeitpunkt T0 (Tag 75; vor der Kalorienrestriktion), T1 (Tag 98; nach drei Wochen Kalorienrestriktion), T2 (Tag 104; nach einer Woche Wiederanfütterung) und T3 (Tag 131; nach fünf Wochen Wiederanfütterung). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

Die densitometrische Auswertung zur Bestimmung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Darmfett in der Gruppe N- und U-Tiere ist in Abbildung 12 zu sehen. In der Gruppe der N- und U-Tiere gibt es nach Kalorienrestriktion sowie 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung keine Unterschiede zwischen den AL und KR Tieren. Auch ist kein Unterschied vor der Kalorienrestriktion (T0) im Vergleich zu den Proben nach Kalorienrestriktion (AL und KR) sowie 1 Woche (AL und KR) und 5 Wochen (AL und KR) Wiederanfütterung vorhanden.

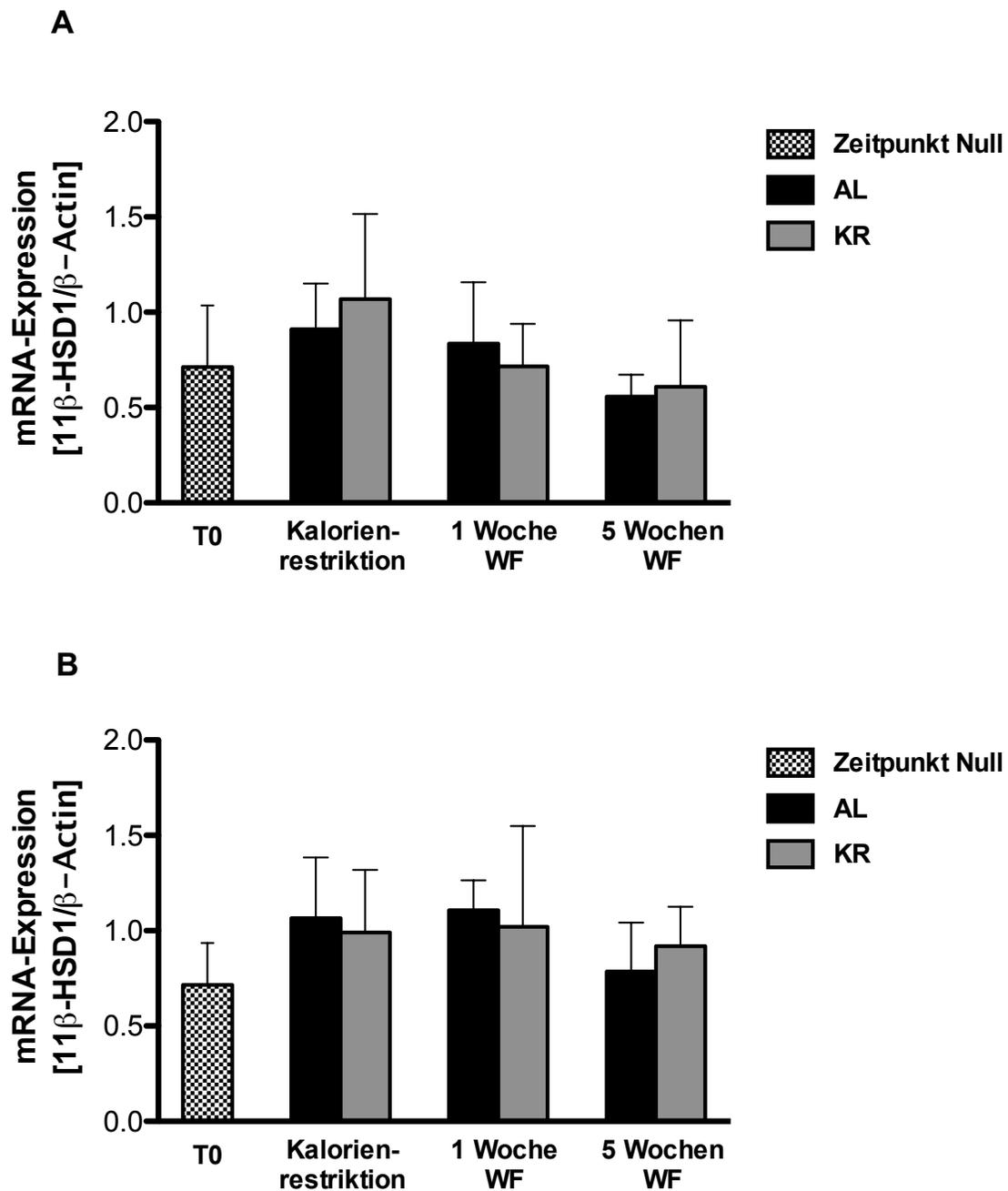


Abbildung 12: 11β -HSD1 mRNA-Expression in Darmfett nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederaanfütterung von 1 und 5 Wochen. (A) mRNA-Expression in N-Tieren; (B) mRNA-Expression in U-Tieren. Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. $n=5-11$ (pro Gruppe). T0: vor der Kalorienrestriktion; AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion; WF: Wiederaanfütterung.

3.2.3 Skelettmuskulatur

Die Abbildung 13 zeigt repräsentative Agarosebilder der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweinemuskel in der Gruppe N- und U- Tiere vor und nach Kalorienrestriktion sowie nach 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung.

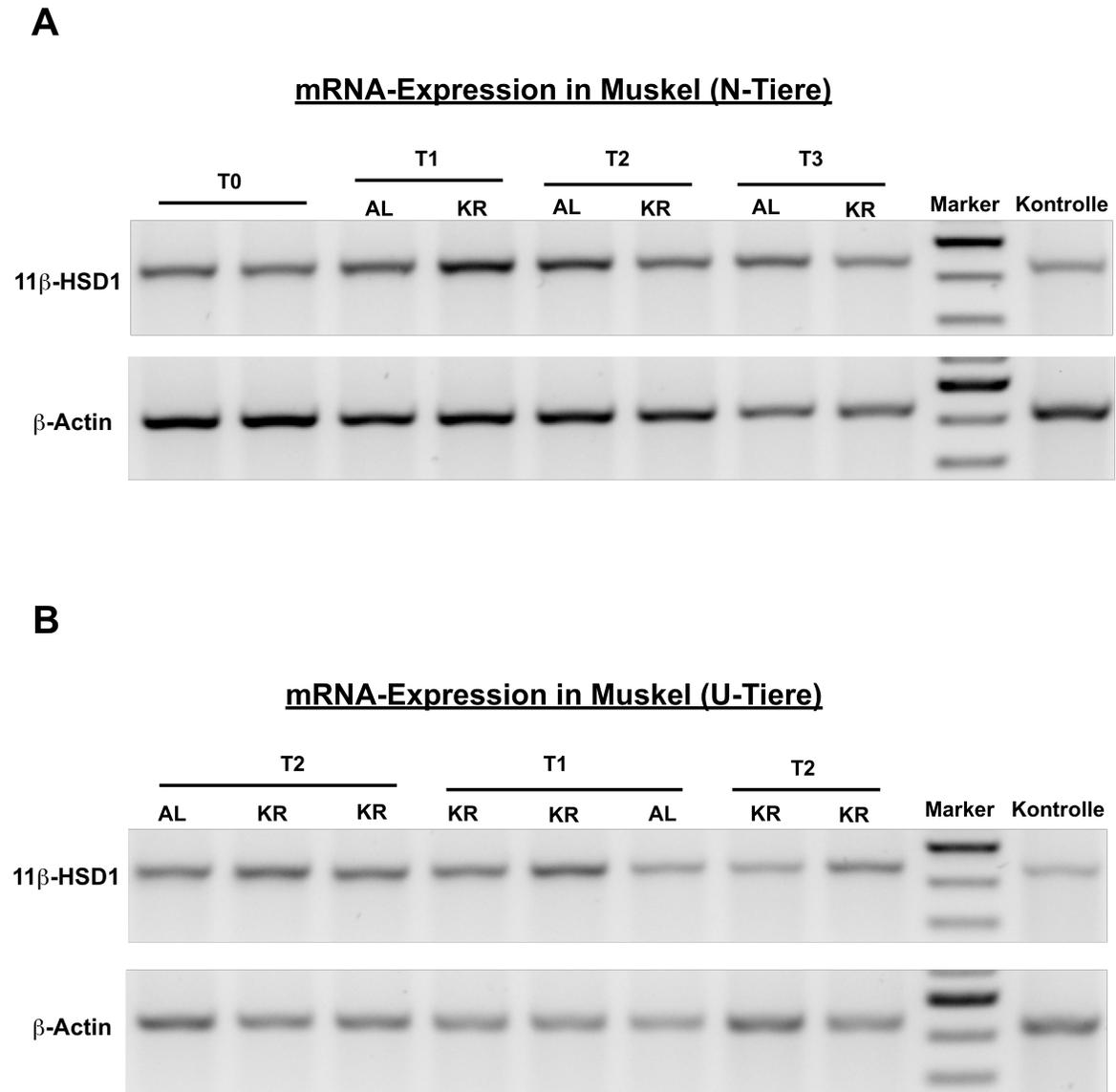


Abbildung 13: Repräsentatives Agarosebild der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Skelettmuskulatur. (A) mRNA-Expression in der Gruppe N-Tiere; (B) mRNA-Expression in der Gruppe U-Tiere. β -Actin dient als Referenzgen. Zeitpunkt T0 (Tag 75; vor der Kalorienrestriktion), T1 (Tag 98; nach drei Wochen Kalorienrestriktion), T2 (Tag 104; nach einer Woche Wiederanfütterung) und T3 (Tag 131; nach fünf Wochen Wiederanfütterung). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

Wie in den bisherigen Ergebnissen der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber und Darmfett sind auch keine Unterschiede in der mRNA-Expression in Skelettmuskulatur im Verlauf einer Kalorienrestriktion zwischen den AL und KR Gruppen zu erfassen. In der Gruppe N- und U-Tiere gibt es keine Unterschiede nach Kalorienrestriktion sowie 1 und 5 Wochen Wiederaufütterung in der mRNA-Expression (s. Abbildung 14).

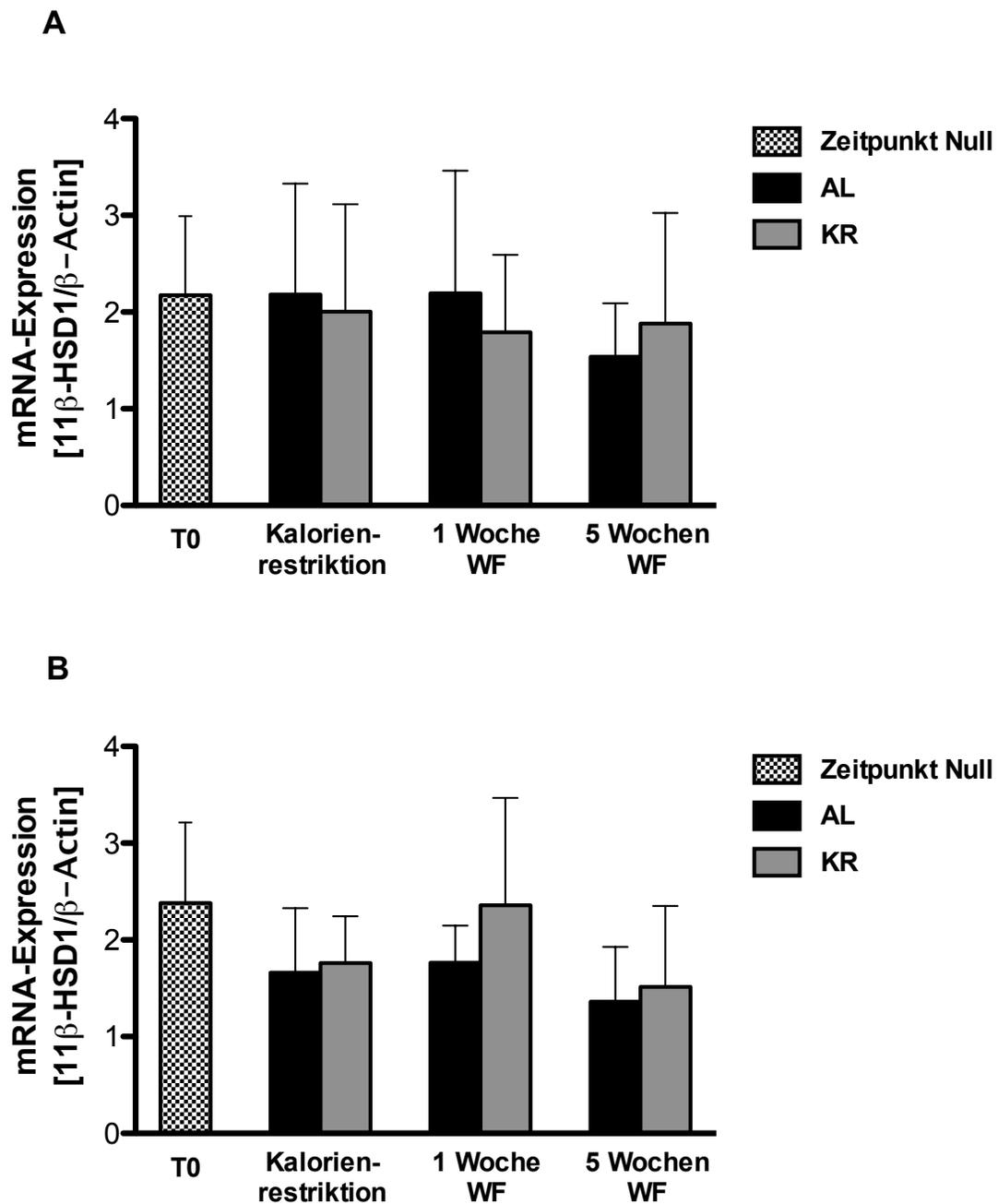


Abbildung 14: 11β -HSD1 mRNA-Expression in Skelettmuskulatur nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung von 1 und 5 Wochen. (A) mRNA-Expression in N-Tieren; (B) mRNA-Expression in U-Tieren. Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. $n=5-12$ (pro Gruppe). T0: vor der Kalorienrestriktion; AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion; WF: Wiederanfütterung.

3.3 11 β -HSD1 Protein-Expression im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Schweingewebeproben

Die Untersuchung und Identifizierung des 11 β -HSD1-Proteins erfolgte mittels Western-Blot Analyse. Dazu wurde zunächst die Mikrosomenisolierung aus Leber-, Fett- und Muskelgewebe etabliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des komplexen Proteingemischs der unterschiedlichen Gewebelysate (Leber, Darmfett und Muskel) erfolgte eine Immobilisierung der Proteine auf einer PVDF Membran.

Abbildung 15A zeigt die 11 β -HSD1 Protein-Expression in der Leber von Mensch, Maus und Schwein mittels Western-Blot Analyse. In allen drei Spezies ist das 11 β -HSD1 Protein in der Leber glykosyliert, zu erkennen an der typischen Doppelbande. Durch die Berechnungen der Datenbank UniProtKb ergibt sich für das humane 11 β -HSD1-Protein [P28845 (DHI1_HUMAN)] ein Molekulargewicht von 32,4 kDa, für Maus 32,4 kDa [P50172 (DHI1_MOUSE)] und für Schwein [F1SF47 (F1SF47_PIG)] 32,1 kDa. In den untersuchten Spezies (Mensch, Maus und Schwein) zeigte sich mittels Western-Blot Analyse, dass das 11 β -HSD1 Protein in der Leber als eine Doppellebende mit (bei etwa 38 kDa) und ohne (bei etwa 34 kDa) Glykosylierung erscheint.

Der Nachweis von 11 β -HSD1-Protein in Schweinefett-, und Muskelgewebe erwies sich als problematisch, da das Enzym in diesen Geweben nur sehr wenig exprimiert war.

Zunächst wurde aufgrund einer Western-Blot Analyse vermutet, dass sich das Molekulargewicht der 11 β -HSD1 und somit auch das Glykosylierungsmuster in Leber und Fettgewebe vom Schwein unterscheidet (Abbildung 15B und Abbildung 16A). Es wurde in Schweinedarmfettgewebe lediglich eine Bande bei etwa 26 kDa, im Vergleich zum entsprechenden Leberprotein bei etwa 38 kDa, detektiert. Zunächst wurde dieses Ergebnis als eine deglykosylierte Variante des 11 β -HSD1-Proteins interpretiert.

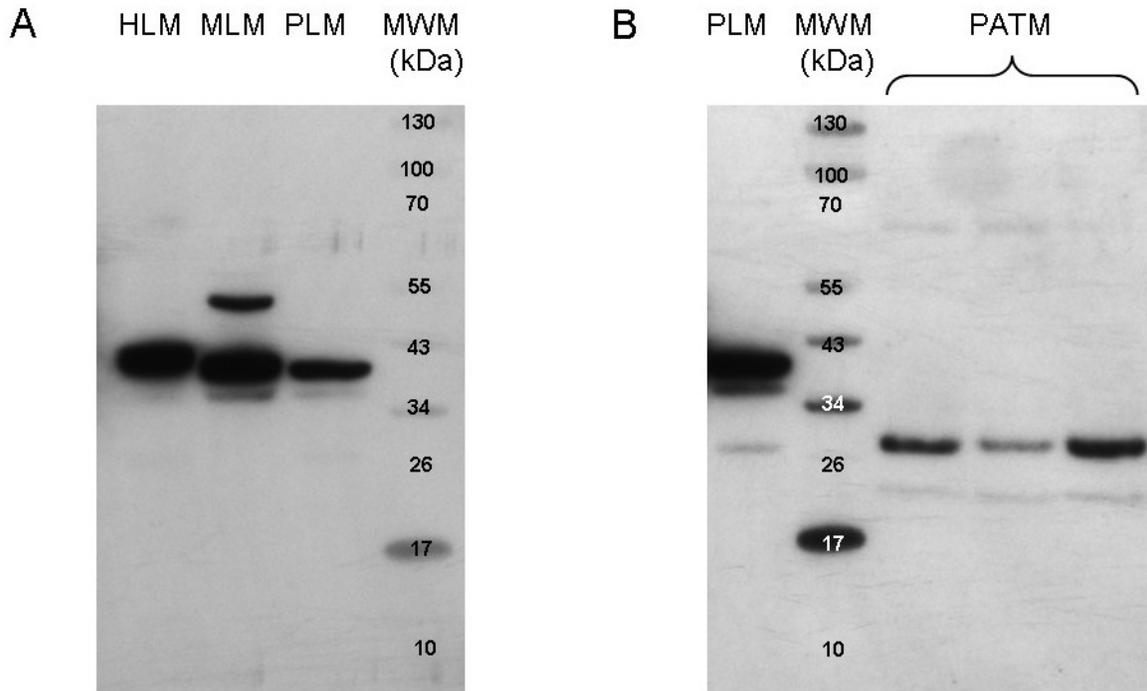


Abbildung 15: Western-Blots zur Detektion von 11β -HSD1 Protein in Mikrosomenpräparationen. (A) Detektion des 11β -HSD1-Proteins in der Leber von drei verschiedenen Spezies: Mensch (HLM), Maus (MLM) und Schwein (PLM) durch den verwendeten Antikörper. 11β -HSD1 mit der typischen Doppelbande des Proteins mit (bei etwa 38 kDa) und ohne Glykosylierung (etwa 34 kDa); (B) Im Western-Blot zeigten Mikrosomenpräparationen von Schweineleber und -fettgewebe im Vergleich gewebespezifische Unterschiede in der Molekularen Masse. HLM: Humane Lebermikrosomen (human liver microsomes); MLM: Mauslebermikrosomen (mouse liver microsomes); PLM: Schweinelebermikrosomen (pig liver microsomes); PATM: Schweinedarmfettmikrosomen (pig visceral adipose tissue microsomes); MWM: Molekulargewichtsmarker.

In-vitro-Deglykosylierung der Leber- 11β -HSD1-Variante mit der Deglykosidase PNGase F zeigte aber, dass Deglykosylierung allein den Molekulargewichtsunterschied, Leber etwa 38 kDa und Fettgewebe etwa 26 kDa, nicht erklären konnte (Abbildung 16B).

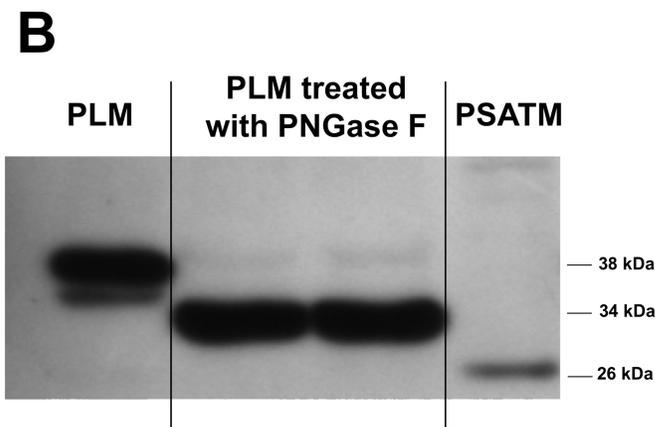
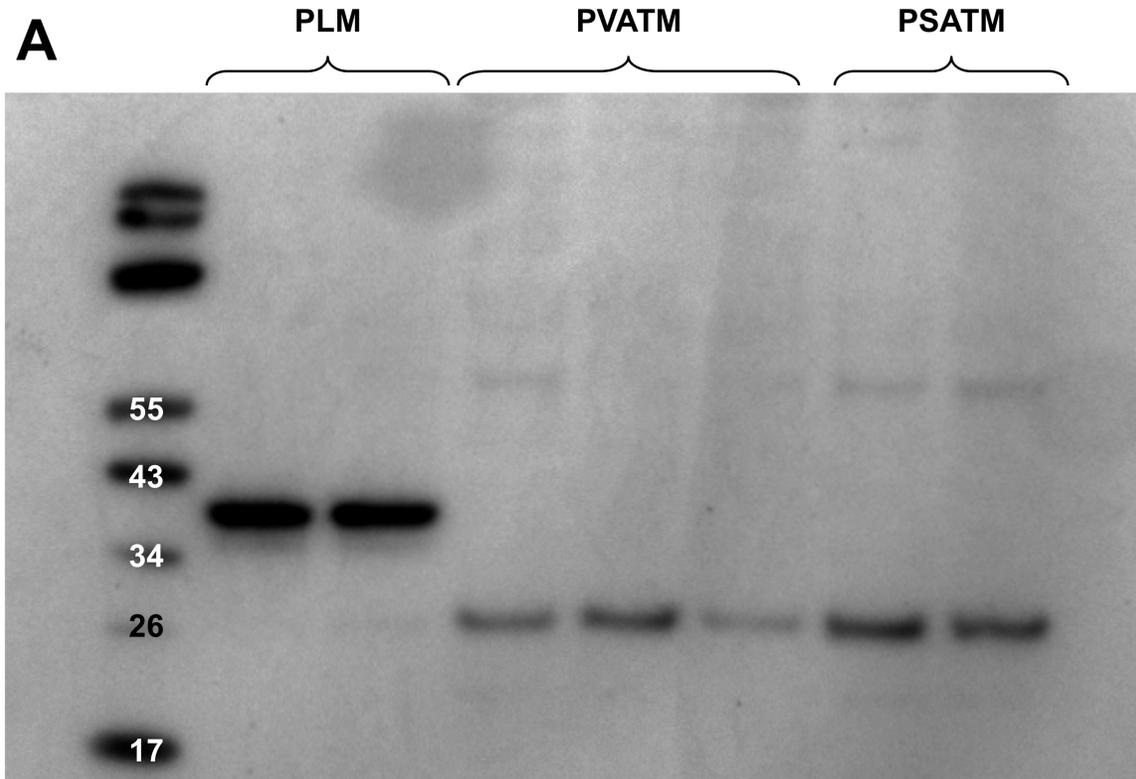


Abbildung 16: Die im Western-Blot detektierte niedermolekulare Bande in Fettgewebe lässt sich nicht durch Deglykosylierung erklären. (A) Der Western-Blot zum Nachweis der 11 β -HSD1 in Leber (PLM), Darmfettgewebe (PVATM) sowie Subkutanfettgewebe vom Schwein (PSATM) zeigt Banden unterschiedlichen Molekulargewichts für Leber (etwa 38 kDa) und Fettgewebe (26 kDa); (B) Vollständige *in-vitro*-Deglykosylierung der Leber-11 β -HSD1-Variante mit der Deglykosidase PNGase F zeigt, dass Deglykosylierung nicht der Grund ist, um den Unterschied im Molekulargewicht zu erklären. PVATM: pig visceral adipose tissue microsomes; PSATM: pig subcutaneous adipose tissue microsomes; PLM: pig liver microsomes.

Bei Versuchen mit einem „blocking peptide“, dass spezifisch an den im Western-Blot verwendeten primären Antikörper bindet, stellte sich heraus, dass die detektierte niedermolekulare Bande ein unspezifisch nachgewiesenes Protein war und somit keine 11 β -HSD1-Variante im Fettgewebe. Während die Bande von Schweinelebermikrosomen (PLM) bei etwa 38 kDa im Experiment mit „blocking peptide“ verschwindet, bleiben die 26 kDa-Banden für Darm- und Subkutanfettgewebe (PVATM bzw. PSATM) erhalten (s. Abbildung 17).

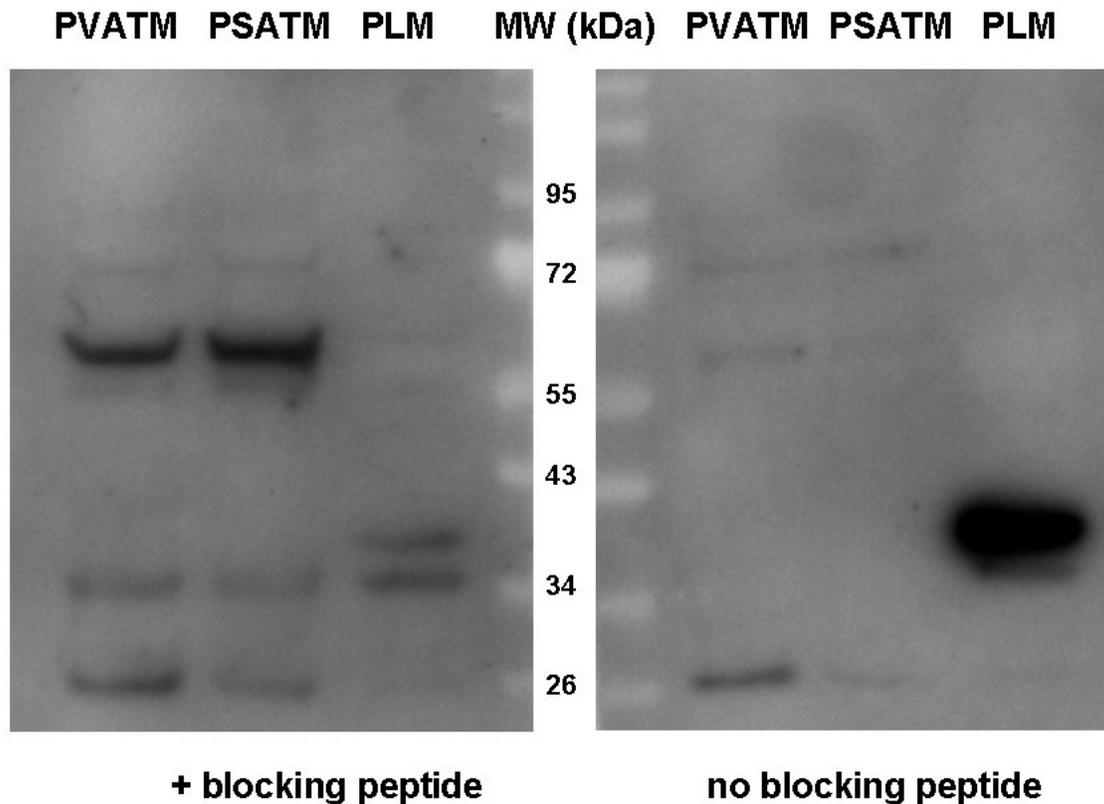


Abbildung 17: Western-Blot mit und ohne „blocking peptide“ von Schweinedarmfettgewebe (PVATM), Schweinesubkutanfettgewebe (PSATM) und Schweineleber (PLM). PVATM: pig visceral adipose tissue microsomes; PSATM: pig subcutaneous adipose tissue microsomes; PLM: pig liver microsomes.

Nach der Bestimmung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Mausleber und verschiedenen Schweinegewebeproben (Leber, Darmfett und Skelettmuskulatur) wurden die Proben aus der Schweinekalorienrestriktionsstudie hinsichtlich ihrer 11 β -HSD1 Protein-Expression nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung untersucht.

Tabelle 22 zeigt die verwendeten Schweineleber-, Darmfett- und Muskelproben der Gruppen N und U, die zur Ermittlung der 11 β -HSD1 Protein-Expression nach drei Wochen Kalorienrestriktion und 1 sowie 5 Wochen Wiederanfütterung verwendet wurden.

Tabelle 22: Übersicht der verwendeten Schweineleber-, Darmfett- und Muskelproben der N- und U-Tiere zur Erfassung der 11 β -HSD1 Protein-Expression. n= Anzahl der Tiere; Zeitpunkt T0: vor der Kalorienrestriktion (Tag 75); T1: nach drei Wochen Kaloreinrestriktion (Tag 98); T2: nach einer Woche Wiederaanfütterung (Tag 104); T3: nach fünf Wochen Wiederaanfütterung (Tag 131). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

(A) Schweineleber

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	12		10	
T1	8	5	11	9
T2	10	8	7	10
T3	9	8	5	9

(B) Schweinedarmfett

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0			7	
T1	7	9	8	9
T2	10	9	7	7
T3	8	11	8	8

(C) Schweinemuskel

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	12		11	
T1	9	9	10	9
T2	6	7	8	7
T3	6	6	6	6

3.3.1 Leber

Zur Erfassung der 11 β -HSD1 Protein-Expression in Leber in N- und U-Tieren nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung wurden Western-Blot Experimente durchgeführt. Die Abbildung 18 zeigt repräsentative Western-Blots zur Bestimmung der Protein-Expression der N- und U-Tiere vor und nach Kalorienrestriktion sowie nach 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung. Die Doppelbande des 11 β -HSD1-Proteins zwischen 34 und 38 kDa ist durch die Glykosylierung des Proteins zu erklären [148]. Calnexin diente als mikrosomale Ladekontrolle. Außerdem wurde eine zusätzliche Kontrolle in den Versuchen eingesetzt. Es handelte sich um einen Pool aus zehn Schweineleberproben, die als interne positive Kontrolle genutzt wurden.

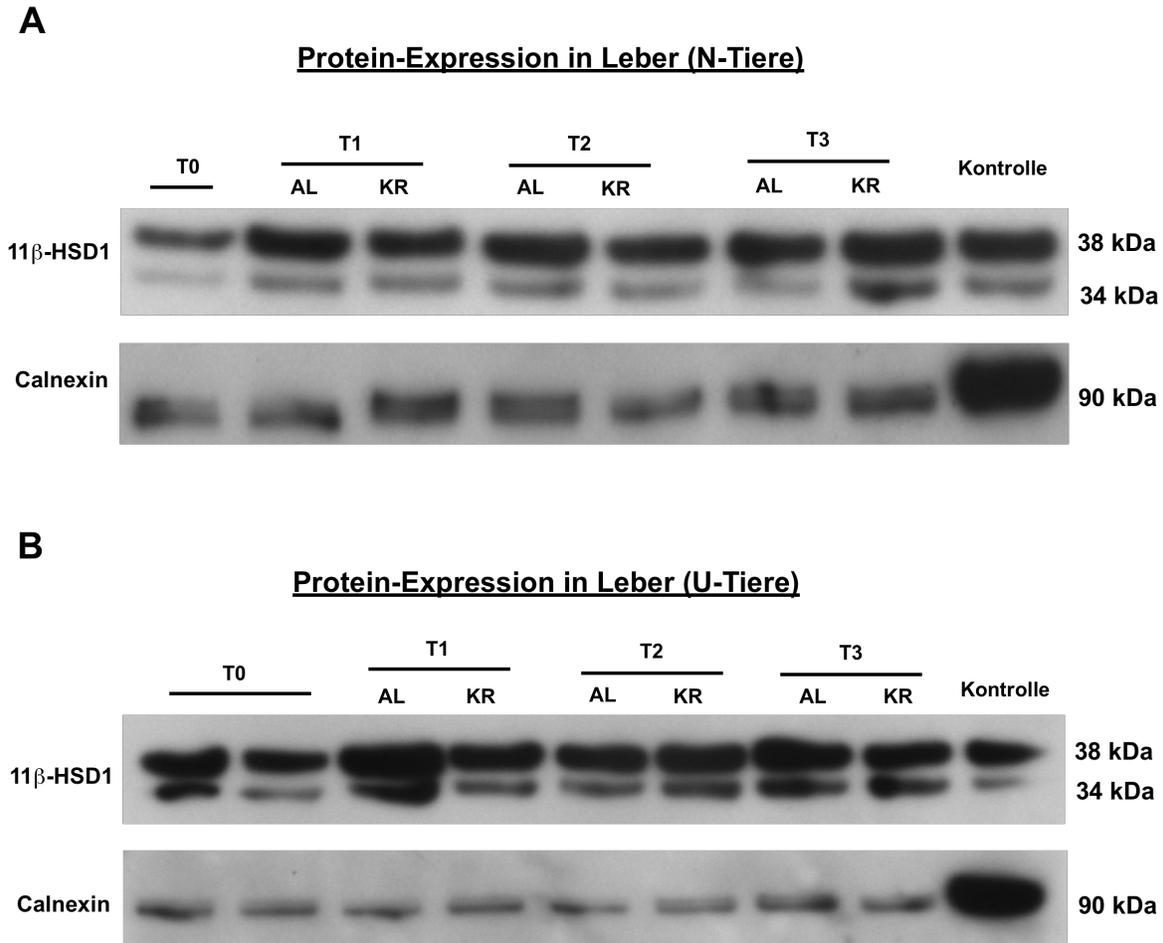


Abbildung 18: Repräsentative Western-Blots für die 11β-HSD1 Protein-Expression in Schweineleber nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung von 1 und 5 Wochen. 11β-HSD1 mit der typischen Doppelbande in der Leber mit (bei etwa 38 kDa) und ohne (bei etwa 34 kDa) Glykosylierung. (A) Protein-Expression in N-Tieren; (B) Protein-Expression in U-Tieren. Calnexin bei etwa 90 kDa wurde als mikrosomale Ladekontrolle verwendet. Zeitpunkt T0 (Tag 75; vor der Kalorienrestriktion), T1 (Tag 98; nach drei Wochen Kalorienrestriktion), T2 (Tag 104; nach einer Woche Wiederanfütterung) und T3 (Tag 131; nach fünf Wochen Wiederanfütterung). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

Die densitometrische Auswertung zur Bestimmung der 11 β -HSD1 Protein-Expression in Schweineleber der N- und U-Tiere ist in Abbildung 19 zu sehen. In der Gruppe der N- und U-Tiere gibt es nach Kalorienrestriktion sowie 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung keine Unterschiede zwischen den AL und KR Tieren. Es ist kein Unterschied vor der Kalorienrestriktion (T0) im Vergleich zu den Proben nach Kalorienrestriktion (AL und KR) sowie 1 Woche (AL und KR) und 5 Wochen (AL und KR) Wiederanfütterung vorhanden.

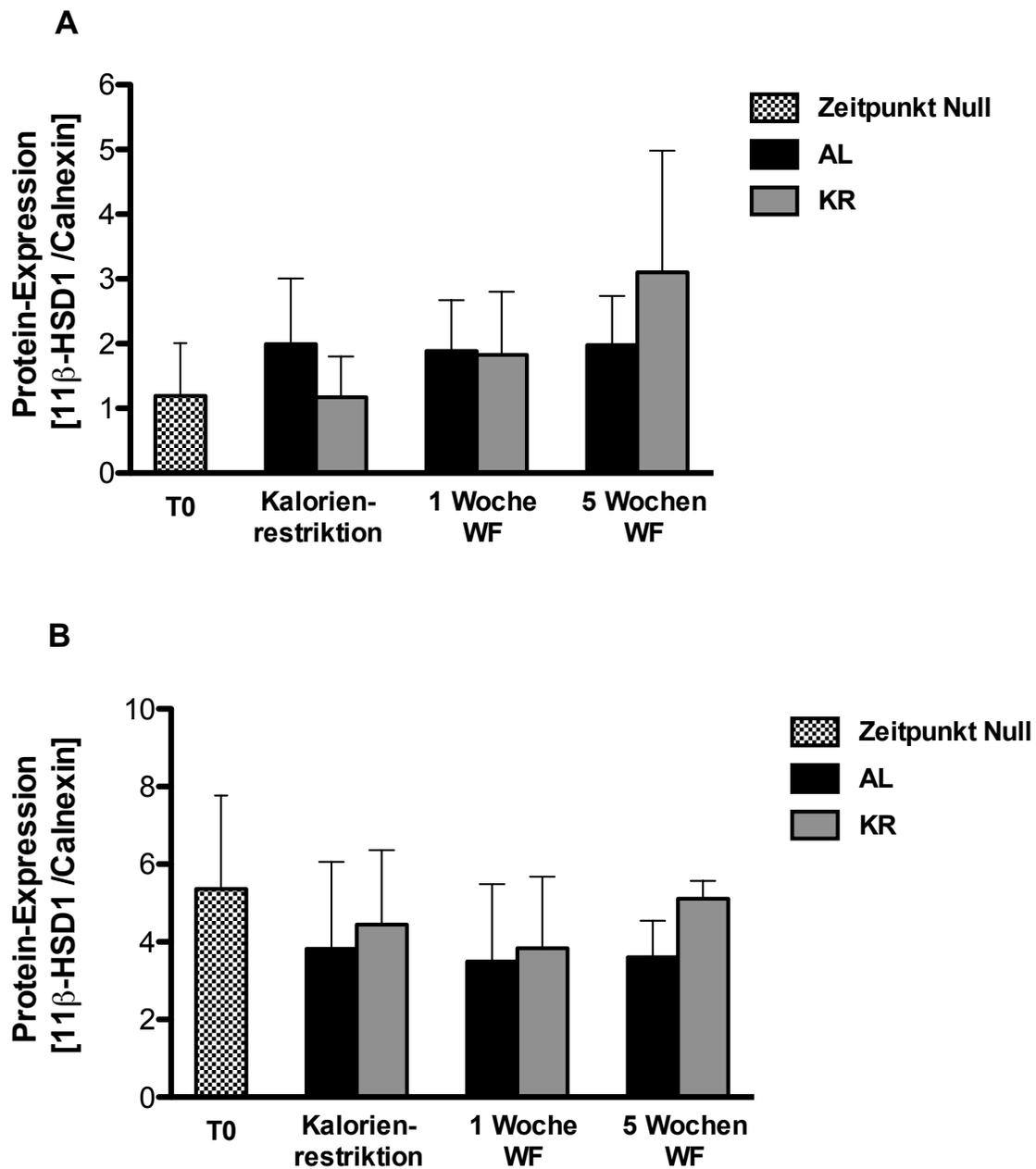


Abbildung 19: 11β-HSD1 Protein-Expression in Schweineleber nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung. (A) Protein-Expression in N-Tieren; (B) Protein-Expression in U-Tieren. Es sind die Mittelwerte ± SD dargestellt. n=5-12 (pro Gruppe). T0: vor der Kalorienrestriktion; AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion; WF: Wiederanfütterung.

3.3.2 Darmfett

Durch die zuvor durchgeführten Versuche (siehe Kapitel 3.3) stellte sich heraus, dass die detektierte niedermolekulare Bande (bei etwa 26 kDa) ein unspezifisch nachgewiesenes Protein war. Nach mehreren Optimierungsschritten der Western-Blot Analyse zeigte sich in den Schweinedarmfettproben nur eine Bande bei etwa 34 kDa, welche zur Auswertung herangezogen wurde. Dabei erwiesen sich die Western-Blot Experimente als sehr aufwendig, da nur sehr wenig 11 β -HSD1 Protein im Darmfett vorhanden war.

Zur Erfassung der 11 β -HSD1 Protein-Expression in Darmfett in N- und U-Tieren nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung wurden Western-Blot Experimente durchgeführt. Die Abbildung 20 zeigt repräsentative Western-Blots zur Bestimmung der Protein-Expression nach Kalorienrestriktion und 1 bzw. 5 Wochen Wiederanfütterung. Calnexin diene als mikrosomale Ladekontrolle. Außerdem wurde eine zusätzliche Kontrolle (Kontrolle Fett) in den Versuchen eingesetzt. Es handelte sich um einen Pool aus zehn Darmfettproben, die als interne positive Kontrolle genutzt wurden. Die hier eingesetzte Leberkontrolle diene als zusätzliche Überprüfung zur Detektion der richtigen 11 β -HSD1-Variante.

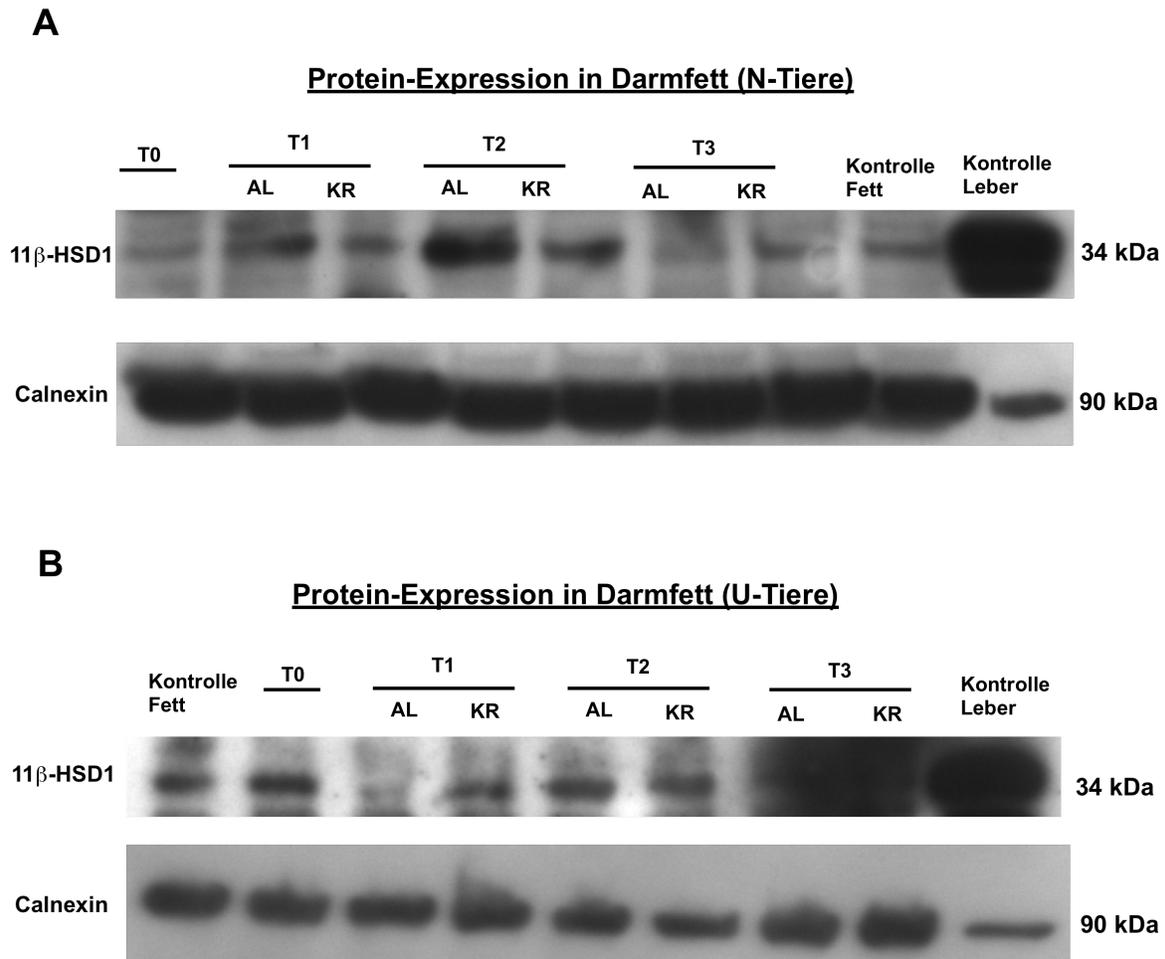


Abbildung 20: Repräsentative Western-Blots für die 11β-HSD1 Protein-Expression in Schweinedarmfett. 11β-HSD1 Bande bei etwa 34 kDa. (A) Protein-Expression in N-Tieren; (B) Protein-Expression in U-Tieren. Kontrolle Leber= 11β-HSD1 mit der typischen Doppelbande in der Leber mit (bei etwa 38 kDa) und ohne (bei etwa 34 kDa) Glykosylierung. Calnexin= mikrosomale Ladekontrolle bei etwa 90 kDa. Zeitpunkt T1 (Tag 98; nach drei Wochen Kalorienrestriktion), T2 (Tag 104; nach einer Woche Wiederanfütterung) und T3 (Tag 131; nach fünf Wochen Wiederanfütterung). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

Die densitometrische Auswertung zur Bestimmung der 11 β -HSD1 Protein-Expression in Darmfett der N- und U-Tiere ist in der Abbildung 21 zu sehen. Wie bereits zuvor bei der 11 β -HSD1 Protein-Expression in Schweineleber sind in den Gruppen N- und U-Tiere nach Kalorienrestriktion sowie 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung keine Unterschiede zwischen den AL und KR Tieren zu sehen. Außerdem zeigte sich kein Unterschied vor der Kalorienrestriktion (T0) im Vergleich zu den Proben nach Kalorienrestriktion (AL und KR) sowie 1 Woche (AL und KR) und 5 Wochen (AL und KR) Wiederanfütterung.

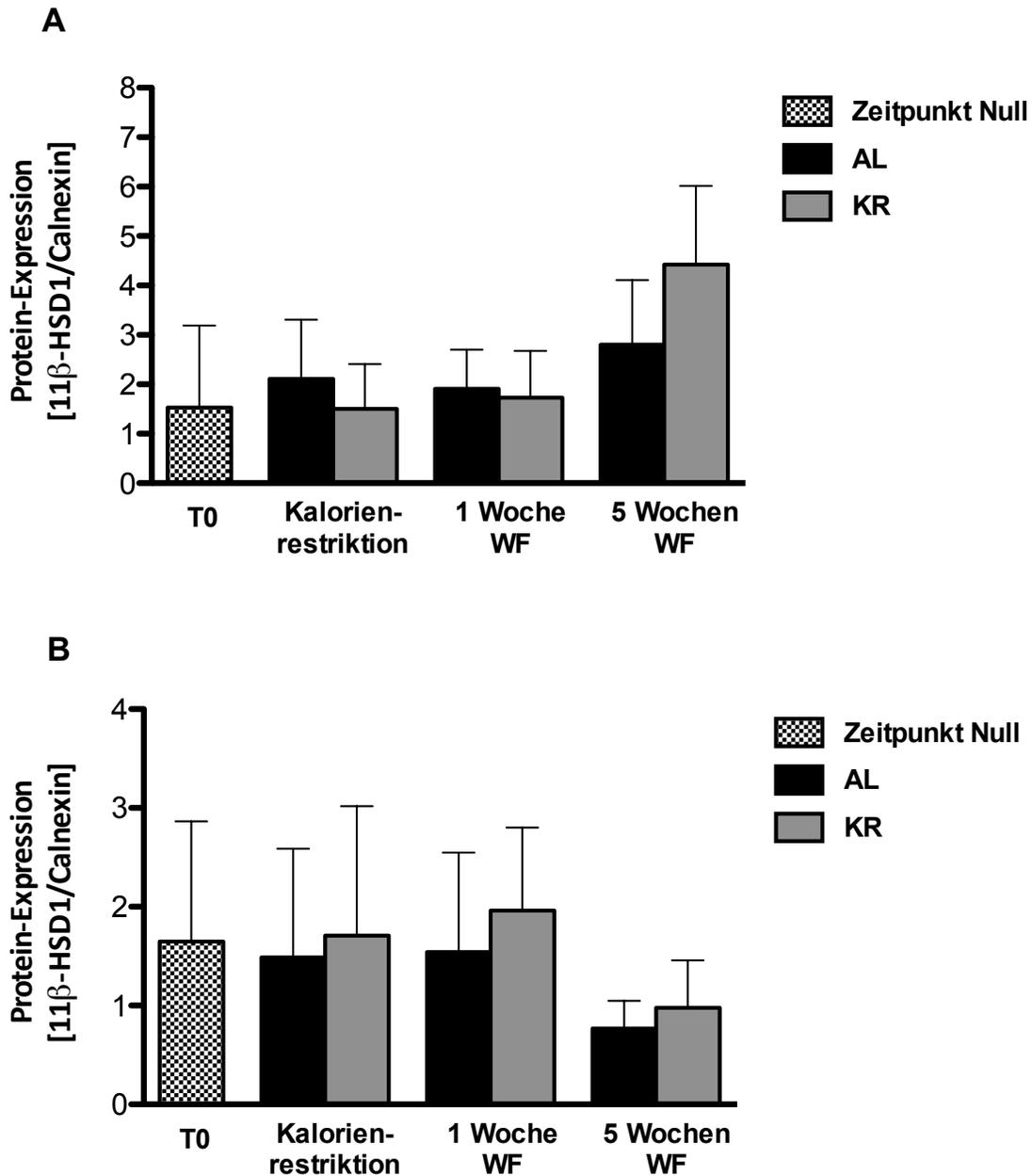


Abbildung 21: 11 β -HSD1 Protein-Expression in Darmfett nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung. (A) Protein-Expression in der Gruppe N-Tiere (B) Protein-Expression in der Gruppe U-Tiere. Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. n=7-11 (pro Gruppe). T0: vor der Kalorienrestriktion; AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion, Wiederanfütterung.

3.3.3 Skelettmuskulatur

Wie anfangs schon erwähnt, erwies sich der Nachweis des 11 β -HSD1-Proteins in Schweinemuskelgewebe als problematisch. 11 β -HSD1 ließ sich zwar in den präparierten Muskel-

mikrosomen mit einem spezifischen Antikörper bei etwa 34 kDa nachweisen, aber die Proben enthielten nur sehr wenig Protein. Daher konnte nicht in allen Proben 11 β -HSD1 detektiert werden, so dass keine Aussage möglich war, wie die Protein-Expression im Verlauf einer Kalorienrestriktion beeinflusst wird.

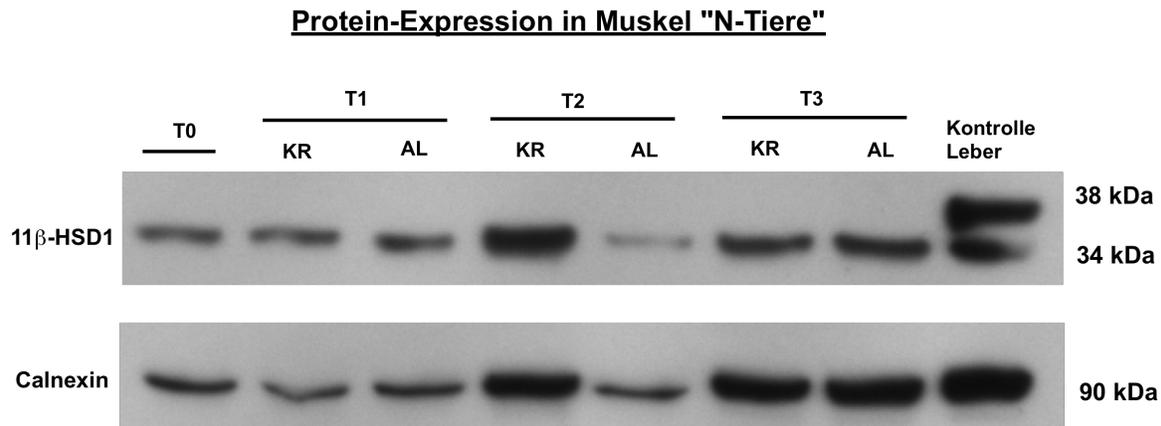


Abbildung 22: Western-Blot für die 11 β -HSD1 Protein-Expression in N- und U-Tieren in Schweinemuskel mit einer Bande bei etwa 34 kDa. Kontrolle Leber= 11 β -HSD1 mit der typischen Doppelbande in der Leber mit (bei etwa 38 kDa) und ohne (bei etwa 34 kDa) Glykosylierung. Calnexin= mikrosomale Ladekontrolle bei etwa 90 kDa. Zeitpunkt T1 (Tag 98; nach drei Wochen Kalorienrestriktion), T2 (Tag 104; nach einer Woche Wiederanfütterung) und T3 (Tag 131; nach fünf Wochen Wiederanfütterung). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

3.4 11 β -HSD1 Enzymaktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion in Schweinegewebeproben

Nachdem die 11 β -HSD1 mRNA- und Protein-Expression in den Glucocorticoid-abhängigen Schweinegeweben Leber und Darmfett untersucht worden waren, sollte ebenfalls die Enzymaktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion ermittelt werden. Dabei wurde die 11 β -HSD1 vermittelte Cortison Reduktion mittels HPLC gemessen. Um zu zeigen, dass die Cortison Reduktion spezifisch für die 11 β -HSD1 ist und keine weiteren Enzyme an der Reduktion beteiligt sind, wurden Hemmversuche mit spezifischen 11 β -HSD1 Inhibitoren durchgeführt. Abbildung 23 zeigt Chromatogramme zur Inhibition der 11 β -HSD1 Aktivität mit 1 μ M und 10 nM 18 β -Glycyrrhetinsäure.

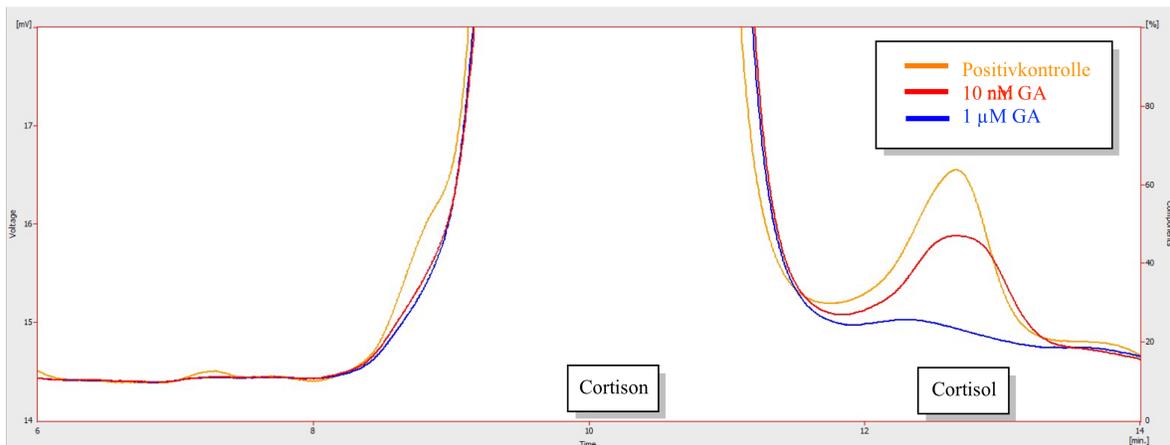


Abbildung 23: Inhibition der 11 β -HSD1-Aktivität in Schweinelebermikrosomen durch 18 β -Glycyrrhetinsäure.

Tabelle 23 zeigt die verwendeten Proben zur Erfassung der 11 β -HSD1-Enzymaktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion in den Gruppen N- und U-Tiere in Schweineleber, Schweinedarfett und Schweinemuskel.

Tabelle 23: Übersicht der verwendeten Schweineleber-, Darmfett- und Muskelproben der N- und U-Tiere zur Bestimmung der 11β -HSD1 Aktivität. n= Anzahl der Tiere; Zeitpunkt T0: vor der Kalorienrestriktion (Tag 75); T1: nach drei Wochen Kalorienrestriktion (Tag 98); T2: nach einer Woche Wiederanfütterung (Tag 104); T3: nach fünf Wochen Wiederanfütterung (Tag 131). AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion.

(A) Schweineleber

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	10		11	
T1	7	8	9	10
T2	8	8	9	10
T3	9	8	8	9

(B) Schweinedarmfett

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	12		11	
T1	7	8	9	10
T2	5	5	7	8
T3	7	7	8	8

(C) Schweinemuskel

normalgewichtige Tiere (N-Tiere)			untergewichtige Tiere (U-Tiere)	
Zeitpunkt	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)	n (Gruppe AL)	n (Gruppe KR)
T0	12		11	
T1	9	9	10	9
T2	6	7	8	7
T3	6	6	6	6

3.4.1 Leber

Zur Erfassung der 11β -HSD1-Aktivität in Schweinelebermikrosomen in N- und U-Tieren nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung wurden Aktivitätstests und anschließende HPLC Experimente durchgeführt. Die Abbildung 24 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm der 11β -HSD1 vermittelten Cortison-Reduktion in Lebermikrosomen.

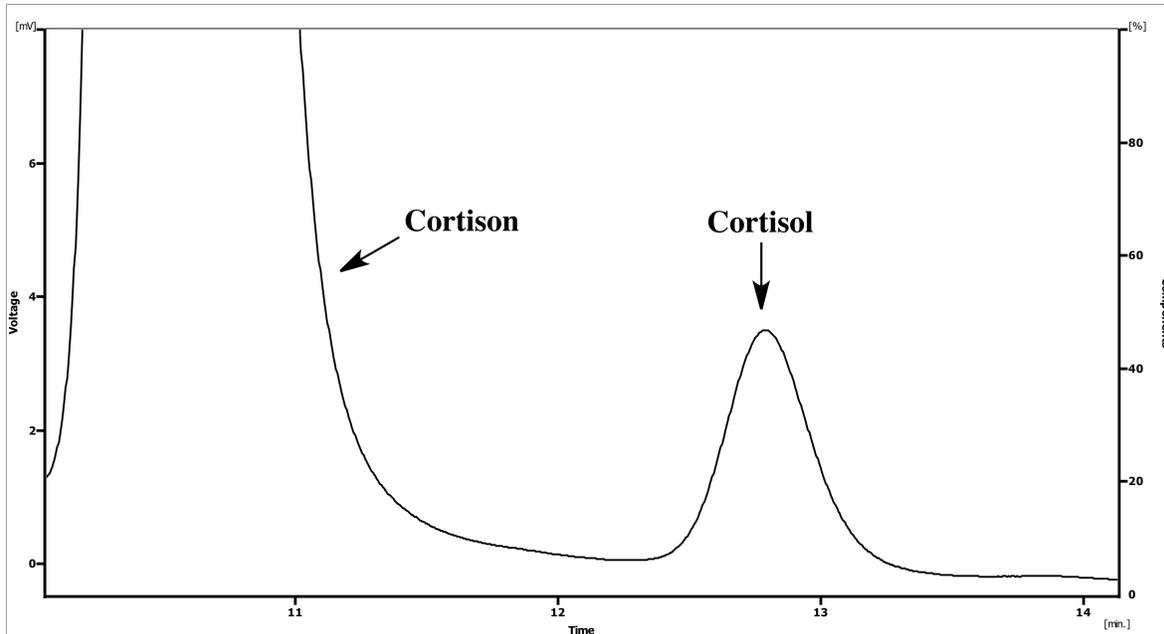


Abbildung 24: Repräsentatives Chromatogramm der 11β -HSD1 vermittelten Cortison-Reduktion in Schweinelebermikrosomen.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse zur Bestimmung der 11β -HSD1-Aktivität in Leber in N- und U-Tieren vor und nach Kalorienrestriktion sowie nach 1 und 5 Wochen Wiederanfütterung. Die Ergebnisse hinsichtlich der 11β -HSD1-Enzymaktivität aus der Mausstudie waren unterschiedlich zu denen aus der Schweinestudie. Es sind keine signifikanten Unterschiede nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und 1 sowie 5 Wochen Wiederanfütterung zwischen der Gruppe AL und KR zu beobachten. Dieses Resultat gilt sowohl für die Proben aus der Gruppe N als auch für die Proben aus der Gruppe U. Außerdem gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben aus der Gruppe N und U-Tiere vor einer Kalorienrestriktion (T0) im Vergleich zu den Proben nach Kalorienrestriktion (Kalorienrestriktion: AL und KR) sowie 1 Woche (AL und KR) und 5 Wochen (AL und KR) Wiederanfütterung.

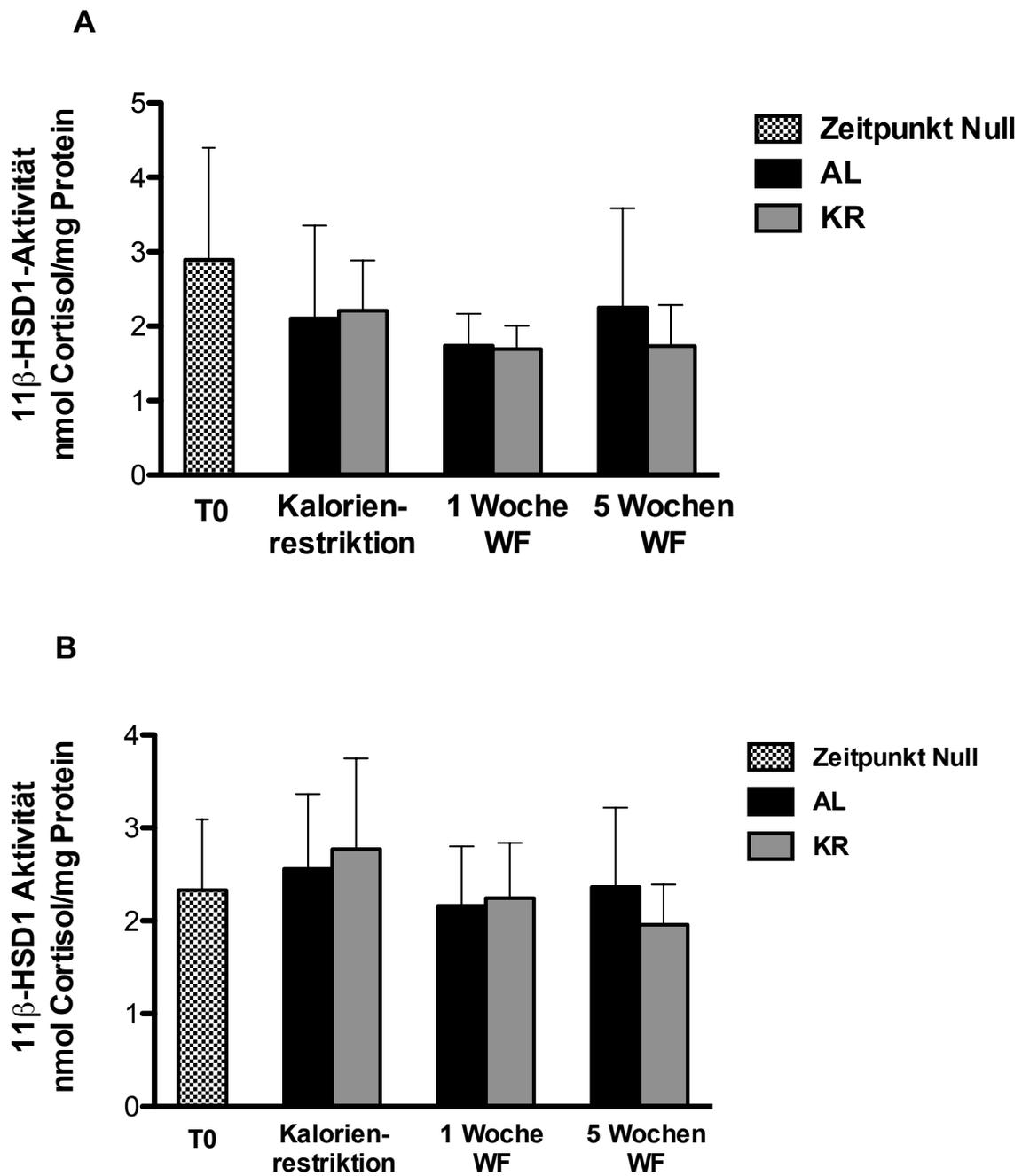


Abbildung 25: 11β -HSD1-Enzymaktivität in Schweineleber nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung. (A) Enzymaktivität in N-Tieren; (B) Enzymaktivität in U-Tieren. Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. $n=8-11$ (pro Gruppe). T0: vor der Kalorienrestriktion; AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion; WF: Wiederanfütterung.

3.4.2 Darmfett

In Abbildung 26 ist ein repräsentatives Chromatogramm dargestellt, um die 11 β -HSD1 vermittelte Cortison-Reduktion zu untersuchen.

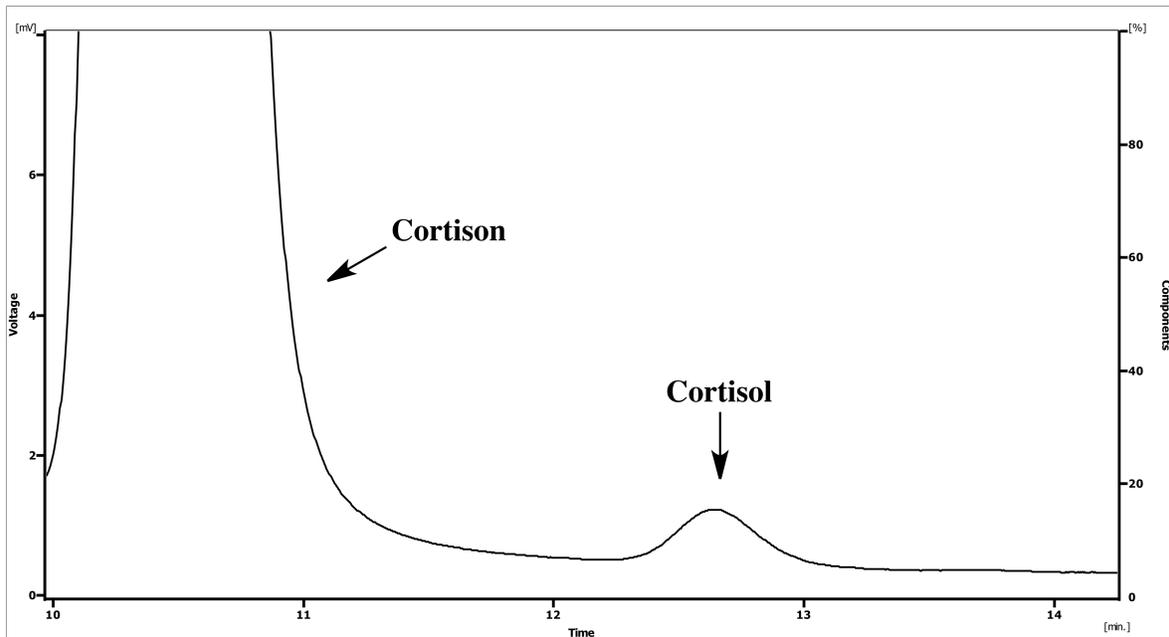


Abbildung 26: Repräsentatives Chromatogramm der 11 β -HSD1 vermittelten Cortison-Reduktion in Schweinedarmfettmikrosomen.

Die Auswertung der 11 β -HSD1-Enzymaktivität in Darmfettmikrosomen nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und 1 sowie 5 Wochen Wiederanfütterung in der Gruppe N- und UTiere ist übereinstimmend mit den Ergebnissen auf mRNA und Proteinebene. Es konnten keine Unterschiede zwischen den AL und KR Gruppen im Verlauf einer Kalorienrestriktion festgestellt werden (s. Abbildung 27).

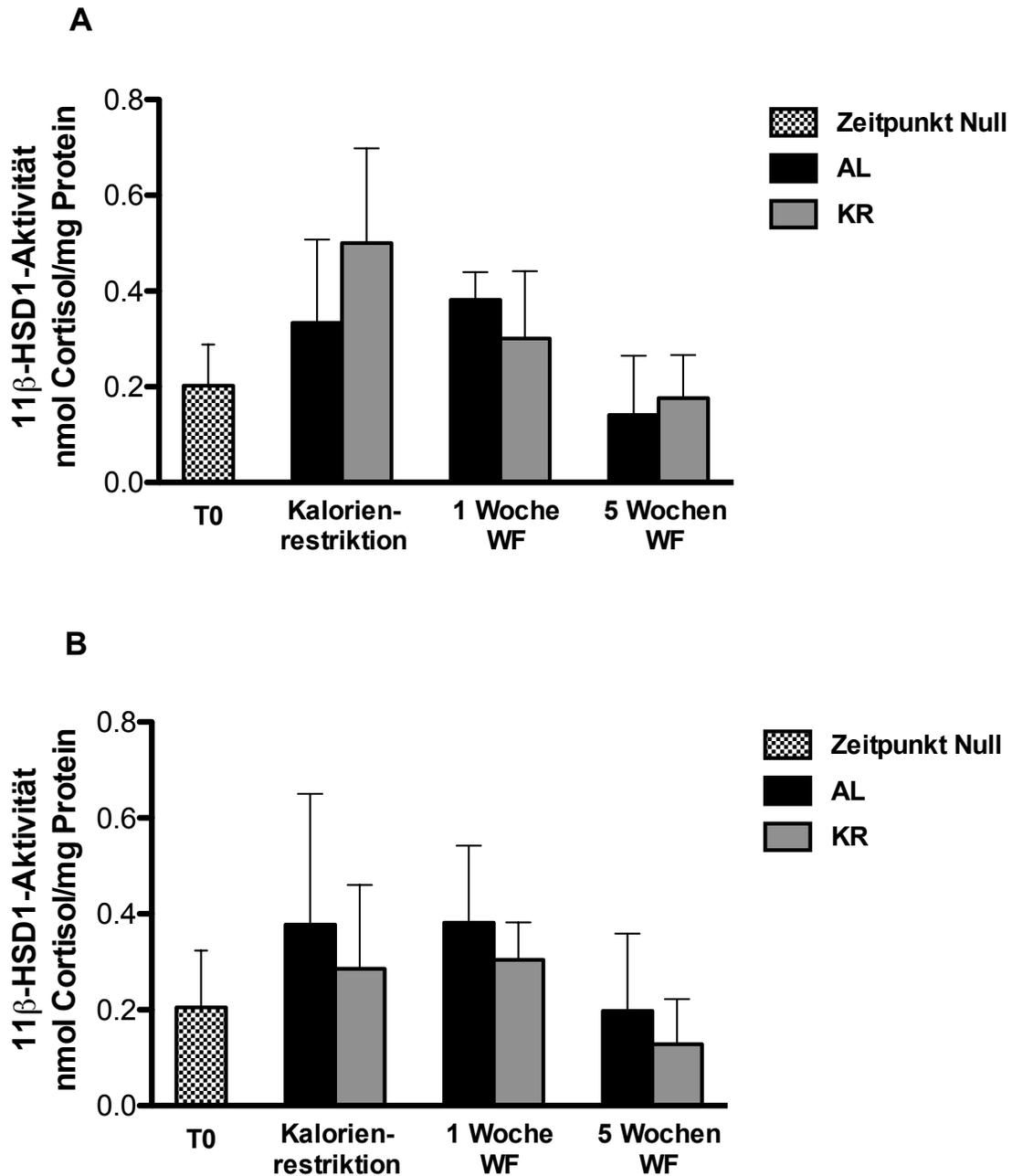


Abbildung 27: 11β -HSD1-Enzymaktivität in Darmfett nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung. (A) Enzymaktivität in der Gruppe N-Tiere; (B) Enzymaktivität in der Gruppe U-Tiere. Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. $n=5-12$ (pro Gruppe). T0: vor der Kalorienrestriktion; AL: Kontrollgruppe; KR: Kalorienrestriktion; WF: Wiederanfütterung.

3.4.3 Skelettmuskulatur

Schon bei den Western-Blot Analysen in Muskelmikrosomen konnten keine Ergebnisse auf Proteinebene ermittelt werden, da die 11 β -HSD1 nur in sehr geringer Menge in diesem Gewebe vorliegt. Darüber hinaus wurde bei der Bestimmung der 11 β -HSD1-Enzymaktivität keine Umsetzung von Cortison zu Cortisol gemessen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die 11β -HSD1-Expression und Enzymaktivität in glucocorticoidhaltigen Zielgeweben von Maus (Leber) und Schwein (Leber, Darmfett, Skelettmuskulatur) untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob die Expression und Aktivität der 11β -HSD1 in den Geweben dieser Spezies nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung im Vergleich zu einer *ad libitum* Kontrollgruppe beeinflusst wird (s. Abbildung 28).

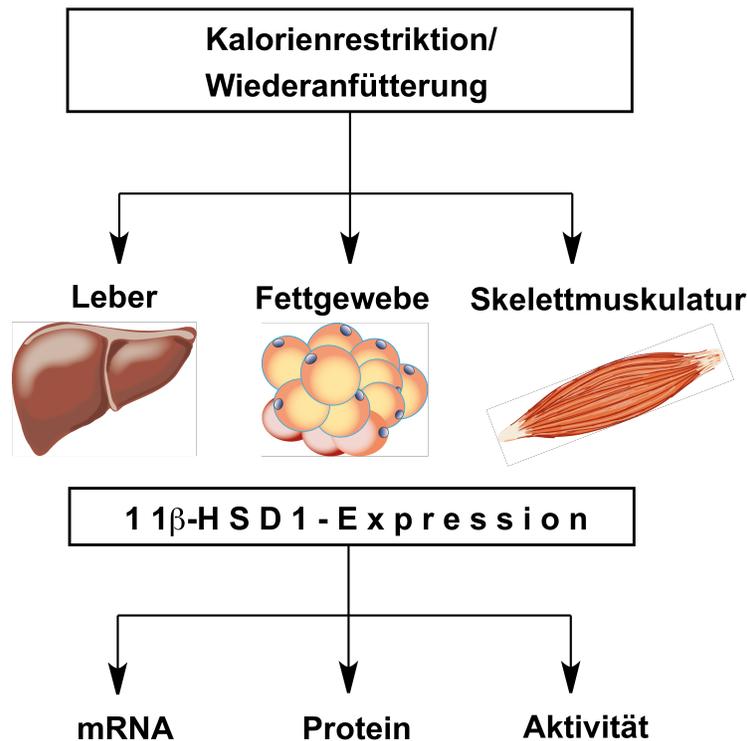


Abbildung 28: Versuchsablauf zur 11β -HSD1-Regulation nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung in Leber, Darmfettgewebe und Skelettmuskulatur.

Glucocorticoide scheinen bei der Pathophysiologie von Übergewicht und dem Metabolischen Syndrom eine Rolle zu spielen, obwohl die molekularen Mechanismen weitgehend unverstanden sind [18]. Das Enzym 11β -HSD1 fungiert *in vivo* als Reduktase, indem Cortison zu rezeptor-aktivem Cortisol umgesetzt wird und verstärkt somit die lokalen Glucocorticoid-Konzentrationen [149, 150]. Daher wurde der 11β -HSD1 eine mögliche Rolle bei der Entstehung von Adipositas und den damit verbundenen metabolischen Erkrankungen zugeschrieben.

Die Bedeutung der 11 β -HSD1 wurde u.a. in Nagerstudien mit verschiedenen Mausstämmen sowie transgenen und Knockout-Mäusen untersucht. Bei db/db-Mäusen zeigte sich eine verstärkte Expression der 11 β -HSD1 in der Leber und erhöhte Insulin-, Glucose- sowie Corticosteron-Spiegel im Blut [151, 47]. In den übergewichtigen Maus-Modellen (ob/ob, db/db) wurde durch selektive 11 β -HSD1 Hemmung eine Verringerung der Blut-Glucose-Spiegel erreicht. Hingegen wurde dies bei gesunden Mäusen nicht beobachtet [48]. Weiterhin waren eine verringerte Nahrungsaufnahme und der Verlust von viszeralem Fett zu beobachten [49]. Das Expressionslevel der 11 β -HSD1 in den verschiedenen Geweben war dabei u.a. abhängig vom genetischen Modell [48].

Eine erhöhte hepatische Expression der 11 β -HSD1 führte zu einer Fettakkumulation in der Leber sowie zu einem verschlechterten Lipidprofil mit erhöhten freien Fettsäurekonzentrationen im Blut. Dagegen zeigten 11 β -HSD1-null Mäuse eine gesteigerte Glucosetoleranz [77] und reduzierte Plasma-Triglycerid-Spiegel [152]. Die gleichen Ergebnisse wurden in einer Studie von Morton *et al.* beobachtet, in der ein für Übergewicht und Diabetes anfälliger Mausstamm ohne funktionierendes 11 β -HSD1-Gen verwendet wurde [137]. In übergewichtigen Zuckerratten (Zucker rats) wurde eine verringerte 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität in der Leber gefunden, während im Fettgewebe, vor allem im viszeralen, eine erhöhte Expression und Aktivität vorlag [46]. Ähnliche Resultate wurden in Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen gefunden [153].

In einigen Arbeiten zeigten transgene Mäuse, in denen die 11 β -HSD1 im Fettgewebe und der Leber überexprimiert wurde, Merkmale metabolischer Stoffwechselerkrankungen. Dabei wurden aber keine erhöhten Glucocorticoid-Spiegel im Plasma gemessen [154, 155]. In mehreren Studien wurde die Rolle der 11 β -HSD1 im Metabolischen Syndrom bereits hervorgehoben. 11 β -HSD1-Knockout-Mäuse zeigten unter einer fettreichen Diät ein geringeres Körpergewicht, weniger viszerales Fettgewebe, niedrigere Nüchtern-glucosewerte und eine verbesserte Glucosetoleranz [77, 156]. Hingegen verursachte 11 β -HSD1-Überexpression im Fettgewebe von Mäusen Hyperphagie und viszerale Adipositas. Bei Fütterung einer fettreichen Diät entwickelten die Mäuse Glucoseintoleranz und Insulinresistenz [136]. Diese Studie von Masuzaki *et al.* gab die ersten Hinweise für einen Zusammenhang zwischen erhöhten 11 β -HSD1-Level im Fettgewebe und Insulinsresistenz. Mehrere pharmazeutische und biotechnologische Unternehmen und auch einige wissenschaftliche Forschungsgruppen begannen mit der Entwicklung von 11 β -HSD1 Inhibitoren. In präklinischen Studien mit C57BL/6J Mäusen, bei fettreicher Ernährung, zeigten sich positive Effekte durch Hemmung der 11 β -HSD1, wie verringertes Körpergewicht, geringere Nahrungsaufnahme und Nüchtern-glucose- und Insulinspiegel [92, 49, 157, 158, 159].

In klinischen Humanstudien der Phase IIb resultierte die Inhibition der 11 β -HSD1 in einer Verbesserung des Glucosehaushalts und Verringerung des Körpergewichts bei Typ-2-Diabetes Patienten [160, 161]. Jedoch verbesserten nur sehr hohe Inhibitor-konzentrationen die Blut-Glucose-Konzentrationen und zeigten moderate Effekte auf Körpergewicht und Bluthochdruck .

Zusammengefasst zeigen viele Studien in transgenen und Knockout-Mäusen eine potentielle Rolle der 11 β -HSD1 bei der Entstehung von Übergewicht und den damit verbundenen metabolischen Stoffwechselstörungen. Durch Hemmung der 11 β -HSD1, und somit einer Verringerung der Cortisol-Level, könnte das Enzym ein potentielles therapeutisches Target im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom sein.

Ein Überschuss an Glucocorticoiden wird mit unerwünschten Nebenwirkungen assoziiert, vor allem in wichtigen metabolisch aktiven Geweben (wie Leber, Fettgewebe und Muskel), in der die 11 β -HSD1 eine vergleichsweise hohe Aktivität aufweist [78]. Daher wird der Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 in diesen Zielgeweben ein wesentlicher Einfluss zugeschrieben, aber eindeutige Daten fehlen. Es ist bekannt, dass als Folge von Überernährung und körperlicher Inaktivität metabolische Stoffwechselstörungen eintreten können und dass die 11 β -HSD1 durch bestimmte Ernährungssignalwege reguliert werden kann [162]. Ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt, um die negativen Folgen von Übergewicht und den damit verbundenen metabolischen Erkrankungen zu behandeln, könnte die Aufklärung der Rolle und Regulation der 11 β -HSD1 sein.

4.1 11 β -HSD1-Regulation in der Leber nach Kalorienrestriktion

Im Menschen und in Nagern ist die 11 β -HSD1 in der Leber ungefähr zehnmal höher exprimiert als im Fettgewebe [44]. Übergewicht scheint mit einer veränderten Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 einherzugehen. Anhaltspunkte aus der Literatur deuten darauf hin, dass die 11 β -HSD1-Expression und 11 β -HSD1-Enzymaktivität nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung in der Leber im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert ist [147].

Diese Hypothese wurde zunächst in Mausleberproben aus einer Mäusefütterungsstudie getestet. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass nach der Kalorienrestriktion keine signifikanten Änderungen der 11 β -HSD1 mRNA-Level in Mausleber feststellbar waren. Nach anschließender Wiederanfütterung war die 11 β -HSD1 mRNA-Expression hochreguliert. Im Gegensatz dazu war die 11 β -HSD1-Proteinexpression nach Kalorienrestriktion signifikant erhöht, während kein Unterschied nach Wiederanfütterung zu erfassen war. Die Hochregulierung des Proteins war nach Kalorienrestriktion (1,4-fach) niedriger als der Anstieg der 11 β -HSD1-Enzymaktivität (2,6-fach). Obwohl es keinen Unterschied auf Proteinebene nach zwei Wochen Wiederanfütterung gab, war die 11 β -HSD1-Aktivität 2,5-fach erhöht. Die Enzymaktivität war nach Kalorienrestriktion und ebenfalls nach zwei Wochen und nach sechs Monaten Wiederanfütterung signifikant erhöht.

Der Anstieg der Enzymaktivität trotz geringerer Proteinexpression könnte durch das Vorkommen einer weiteren mikrosomalen SDR erklärbar sein, die Cortison-Reduktaseaktivität besitzt. Die humane, mikrosomale NADPH-abhängige SDR, DHRS7 [Dehydrogenase/Reduktase (SDR Familie) Mitglied 7 Isoform 1], ist bereits seit 15 Jahren bekannt, aber bis heute wenig charakterisiert. In einer im Jahr 2016 veröffentlichten Studie wurde erstmals gezeigt, dass die humane DHRS7 *in vitro* inaktives Cortison zu rezeptor-aktivem Cortisol umsetzt [163]. Darüber hinaus wurden die Protein-Expressionslevel der DHRS7 in verschiedenen humanen Geweben mittels Western-Blot Analyse bestimmt. Höhere Expressionen fanden sich in folgenden Geweben: Nebenniere, Leber, Schilddrüse, Prostata, Dünndarm, Dickdarm, Magen, Niere und Gehirn. Eine geringere Expression hingegen wurden in der Skelettmuskulatur, der Lunge und der Milz detektiert.

Interessanterweise besitzt die Maus ein DHRS7-orthologes-Enzym [UniProtKB- Q9CXR1 (DHRS7_MOUSE)] mit einer Sequenzidentität zu der humanen DHRS7 von 79%. Das Vorhandensein eines orthologen Proteins in den untersuchten Mausleberproben kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die erhöhte Cortison-Reduktaseaktivität in den verwendeten Mauslebermikrosomen könnte auf eine erhöhte Protein-Expression der DHRS7

hinweisen. Hinter der vermeintlich erhöhten 11β -HSD1-Aktivität, trotz erniedrigter 11β -HSD1-Proteinlevel, könnte sich eine zusätzliche DHRS7-Cortison-Reduktaseaktivität verbergen.

Aus Tier- und Humanstudien ist bekannt, dass bei Adipositas eine Fehlregulation der 11β -HSD1 in der Leber besteht [54, 164]. Die Expression und Aktivität der 11β -HSD1 ist bei Adipositas in der Leber runterreguliert, möglicherweise aufgrund einer chronischen Hyperinsulinämie. Eine verringerte hepatische 11β -HSD1-Aktivität bei Adipositas kann möglicherweise einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, um die damit verbundenen metabolischen Komplikationen zu verringern. Denn 11β -HSD1 Knockout-Mäuse waren resistent gegenüber adipositasbedingter Hyperglykämie und Stress. Da die 11β -HSD1-Reduktaseaktivität fehlte, konnte das inaktive 11-Dehydrocorticosteron nicht in das metabolisch aktive Corticosteron umgesetzt werden. Die verringerten Corticosteron-Level führten zur Verbesserung der Insulinsensitivität und Verringerung der Gluconeogenese [77]. Das Ergebnis der Studie von Harno *et al.* [76] stützte die Bedeutung der Rolle der 11β -HSD1 im Metabolischen Syndrom. Leberspezifische 11β -HSD1 Knockout-Mäuse entwickelten nach 11-Dehydrocorticosterongabe keine Symptome des Metabolischen Syndroms. Daher wurde vermutet, dass 11β -HSD1-Knockout in der Leber die Tiere vor Insulinresistenz und Gewichtszunahme schützt. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls in 11β -HSD1 Knockout-Mäusen, nach Gabe von 11-Dehydrocorticosteron, kein Anstieg der Corticosteron-Spiegel, keine Gewichtszunahme und Insulinresistenz [76].

In einer Studie mit adipösen männlichen Patienten führte eine kohlenhydratarme Ernährung zur Veränderung der 11β -HSD1-Aktivität in der Leber, nicht aber im Fettgewebe. Durch die kohlenhydratarme Ernährung wurden die Insulinspiegel reduziert, vermutlich aufgrund erhöhter 11β -HSD1-Aktivität in der Leber [165].

Die Untersuchungen in Mausleber lassen vermuten, dass die Expression und Aktivität der 11β -HSD1 nach einer Kalorienrestriktion beeinflusst wird und die Effekte auch nach anschließender Wiederanfütterung bestehen bleiben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchungen aus der Mausfütterungsstudie die aufgestellte Hypothese, dass die 11β -HSD1 eine Rolle bei der Entstehung von Übergewicht und den damit verbundenen Erkrankungen spielt, unterstützen.

Bei der Untersuchung der 11β -HSD1-Expression und 11β -HSD1-Enzymaktivität in Schweineleber konnten wider Erwarten in den Proben aus der Fütterungsstudie keine signifikanten Unterschiede zwischen der AL und KR Gruppe erfasst werden. Weder auf mRNA- und Proteinebene noch auf Aktivitätslevel waren Unterschiede zu erkennen.

Die in der Literatur vorkommenden Daten aus Tier- und Humanstudien zeigen sehr unterschiedliche und widersprüchliche Ergebnisse der 11 β -HSD1-Expression und Aktivität bei Adipositas und den damit verbundenen Stoffwechselerkrankungen in metabolisch relevanten Geweben.

Unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der 11 β -HSD1 ergeben sich aus einer Inhibitor-Studie von Harno *et al.* [166]. Dabei zeigte sich, dass nach der Behandlung mit zwei verschiedenen 11 β -HSD1-Hemmstoffen eine Verbesserung metabolischer Parameter (Gewichtsreduktion, verringerte Nahrungsaufnahme) in der Kontrolle und auch in den Knockout-Mäusen auftrat. Daher könnten die positiven Effekte durch zusätzliche Mediatoren (Off-Target Mechanismen) erklärt werden und nicht nur durch die 11 β -HSD1-Hemmung.

Die eigenen Untersuchungen in Maus- und Schweineleber unterstützen diese Beobachtungen, da in der Maus ein Einfluss der 11 β -HSD1-Expression und Aktivität nach einer Kalorienrestriktion vorliegt und im Schwein nicht.

Es stellt sich die Frage, ob der Verlust des 11 β -HSD1-Gens tatsächlich den vermuteten Einfluss auf verschiedene Stoffwechselfunktionen hat. Tatsächlich verursachte die Überexpression der 11 β -HSD1 in Mausleber kein Übergewicht. Darüber hinaus zeigten sich lediglich geringe Verbesserungen der Stoffwechselfunktionen, wie zum Beispiel eine verringerte Lipidsynthese in der Leber, ein erhöhter Insulinspiegel und höhere Konzentrationen nicht-veresterter Fettsäuren im Plasma. In diesen Tieren wurde nur eine milde Insulinresistenz und Bluthochdruck beobachtet [155]. Lavery *et al.* zeigten, dass eine 11 β -HSD1-Deletion in der Leber nur eine geringe Verbesserung metabolischer Störungen nach einer Hoch- und Niedrigfett-Diät verursachte [167]. Es wurden keine Veränderungen in den Expressionsmustern Glucocorticoid-abhängiger Gene beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beobachteten Stoffwechselstörungen nicht nur durch Glucocorticoide verursacht werden können, sondern andere metabolische Parameter ebenfalls eine Rolle spielen. Die Beobachtungen in diesen Studien könnten die eigenen Ergebnisse teilweise erklären.

In mehreren Studien wurde untersucht, ob es eine gewebsspezifische Fehlregulierung der humanen 11 β -HSD1 in der Leber bei Adipositas gibt. Bei Adipositas ist die Enzymaktivität herunterreguliert, aber bei Adipositas mit Typ-2-Diabetes blieb sie unverändert [58, 57, 55, 51].

Dube *et al.* fanden heraus, dass unabhängig vom Ausmaß der Adipositas oder des Diabetes, die 11 β -HSD1-Aktivität unverändert blieb [56]. Bei adipösen Patienten mit dem Metabolischen Syndrom wurden in der Leber erhöhte mRNA-Expressionen des GR, der 11 β -HSD1, der H6PDH und der PEPCK gefunden, die mit Zunahme der Symptome des Metabolischen Syndroms anstiegen [50]. Baudrand *et al.* aber konnten in ihrer Studie keine Unterschiede bei der 11 β -HSD1-Expression in der Leber bei adipösen Patienten mit und ohne Metabolisches Syndrom feststellen [84].

Die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 wurde in den untersuchten Mausleberproben im Verlauf einer Kalorienrestriktion beeinflusst, in den Schweinegewebeproben (Leber, Darmfett und Skelettmuskulatur) nicht. Daher lassen die eigenen Ergebnisse eine Spezies-spezifische Regulation der 11 β -HSD1 vermuten. Der genaue Regulationsmechanismus der 11 β -HSD1-Expression und Aktivität im Metabolischen Syndrom bleibt weiterhin unklar.

4.2 11 β -HSD1-Regulation im Fettgewebe nach Kalorienrestriktion

Das Fettgewebe stellt ein stoffwechselaktives endokrines Organ dar und sezerniert verschiedene Faktoren wie Adiponektin [168], Interleukin-6 (IL-6), Leptin, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [120] und Resistin. Adipokine beeinflussen den Energiestoffwechsel und die Insulinsensitivität. Eine erhöhte Masse an Fettgewebe, wie es bei Fettleibigkeit (Adipositas) der Fall ist, geht mit einer schwachen, chronischen Entzündung einher. Das Ganze ist gekennzeichnet mit einer veränderten Adipokinproduktion und erhöhten Entzündungsmarker-Konzentrationen wie TNF- α und IL-6 [169]. TNF- α war der erste Faktor, bei dem eine Verbindung zwischen Fettleibigkeit, Entzündung und Typ-2-Diabetes festgestellt wurde [120]. IL-6 erhöht die Leptinsekretion, reduziert die Adipokinsekretion, erhöht die Lipolyse und verringert die Lipoproteinlipase-Aktivität [170]. Die erhöhte IL-6-Produktion im Fettgewebe trägt vermutlich zu den metabolischen und endokrinen Veränderungen bei, die im Falle einer Adipositas vorliegen [171].

Es ist bekannt, dass Übergewicht und Adipositas Riskofaktoren für viele metabolische Erkrankungen sind. Mehrere Humanstudien haben gezeigt, dass eine überproportional hohe Ansammlung an viszeralem Fett das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Insulinsresistenz und Typ-2-Diabetes erhöhen [87]. Im Hinblick auf die verschiedenen Morbiditätsrisiken, die speziell mit den viszeralen Fettdepots verbunden sind, ist es sinnvoll auf die disproportionale Fettverteilung zu achten.

Übergewicht geht im viszeralen Fettgewebe mit einem erhöhten Glucocorticoidüberschuss einher [78]. Bei der Entstehung bestimmter Stoffwechselstörungen spielt das viszerale Fettgewebe, verglichen mit dem subkutanen Fettgewebe, eine zentrale Rolle, da es große Mengen freier Fettsäuren freisetzt und diese gelangen zur Leber. Außerdem werden dort im Fettgewebe verstärkt Glucocorticoidrezeptoren exprimiert [172]. Es gibt eine Vielzahl an Studien, die sich mit dem Zusammenhang der 11 β -HSD1-Aktivität und Expression in humanem Fettgewebe, Übergewicht und Insulinresistenz beschäftigen. Viele der Studien beziehen sich auf Ergebnisse im subkutanem Fettgewebe und zeigen, dass die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 positiv mit dem BMI und Insulinresistenz korrelieren [54]. In weiteren Studien wurde eine erhöhte 11 β -HSD1-Expression im viszeralen Fettgewebe gezeigt [67, 173, 84].

Untersuchungen an Adipositas-Nagermodellen tragen zum Verständnis der molekularen Mechanismen bei, die an der Entstehung von Adipositas und den damit verbundenen Erkrankungen beteiligt sind. In den Adipositas-Modellen ob/ob-Maus, db/db-Maus und fa/fa-Zuckerratten tritt Adipositas als erbliche Störung auf. Aufgrund von Punktmutationen bestimmter Gene (ob-, db- und fa-Gen) kommt es zu Adipositas, Diabetes-Typ-2, Dyslipidämie, verringerte körperliche Aktivität, Abnahme der Körpertemperatur und des Grundumsatzes [174, 175]. In der Studie von Masuzaki *et al.* wurden bei 11 β -HSD1-Überexpression im Fettgewebe erhöhte Corticosteron-Level in Mäusen gemessen. Es kam zur Bildung von Fett und in der Folge Übergewicht und Stoffwechselstörungen wie Dyslipidämie und Insulinresistenz [136]. Die Resultate dieser Studie ließen eine potentielle Rolle der 11 β -HSD1 bei der Entstehung von Adipositas und dem Metabolischen Syndrom vermuten. In weiteren Nagerstudien wurde eine Fehlregulation der 11 β -HSD1 im Fettgewebe bei Adipositas beobachtet. In adipösen Nagermodellen (ob/ob, db/db, fa/fa-Zuckerratten) ist die 11 β -HSD1-Aktivität in der Leber herunter- und im Fettgewebe hochreguliert [46].

Eine Studie, in der adipöse Ratten eines weiteren Adipositas-Stamms (WNIN/Ob) verwendet wurden, fand heraus, dass die Enzymaktivität im subkutanen Fettgewebe erhöht und in der Leber herunterreguliert ist [45].

In Wistar-Ratten führte eine kurzzeitige, nicht aber eine langzeitige fettreiche Diät zu einer Herunterregulierung der 11 β -HSD1-Aktivität im subkutanen und viszeralen Fettgewebe [176]. Der Grund hierfür könnte eine Adaptation sein, um sich vor den Folgen einer kurzzeitigen fettreichen Diät zu schützen. Man *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass in C57BL/6J-Mäusen eine fettreiche Diät zur Abnahme der 11 β -HSD1-Aktivität in Fettgewebe führte [177]. Die schwarzen C57BL/6J-Mäuse sind ein verbreiteter Inzucht-Stamm zur Herstellung von transgenen Mäusen und werden zur Untersuchung Diät-induzierter Adipositas verwendet. Die Tiere entwickeln unter fettreicher-Diät Übergewicht, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und schließlich Diabetes-Typ-2.

Die Beobachtungen einer Fehlregulation der 11 β -HSD1 bei Adipositas ist nicht nur in verschiedenen Nagermodellen, sondern auch in Humanstudien zu beobachten [80, 54, 40]. Die Datenlage bei Übergewicht oder dem Metabolischen Syndrom bezogen auf die 11 β -HSD1-Expression- und Aktivität im Fettgewebe (viszerales und subkutanes) ist widersprüchlich. Das subkutane Fettgewebe ist das am häufigsten untersuchte Fettdepot. Die 11 β -HSD1-Expressionslevel und auch die *in vitro*-11 β -HSD1-Aktivität waren im viszeralen Fettgewebe höher als in subkutanen Fettbindegewebszellen [60, 67]. Andere Ergebnisse zeigten, dass die 11 β -HSD1-Expressionslevel im subkutanen und viszeralen Fettgewebe ähnlich sind, allerdings waren die H6PDH und der GR α im viszeralen Fettgewebe höher exprimiert [173].

Studien zeigten, dass die 11 β -HSD1 mRNA-Expression und Enzymaktivität bei Übergewicht erhöht ist [54, 40, 79]. Es wurde eine erhöhte 11 β -HSD1 mRNA-Expression in viszeralem Fettgewebe bei Übergewicht gefunden [79, 178, 179], andere Studien wiederum konnten keinen Anstieg der mRNA-Expression feststellen [180, 66].

Darüber hinaus konnte bei übergewichtigen Patienten im viszeralen Fettgewebe kein Cortisol, und somit keine 11 β -HSD1-Aktivität, nachgewiesen werden [58, 181].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 in Darmfettgewebe nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederaanfütterung untersucht. Es zeigte sich, dass in den untersuchten Schweinedarmfettproben aus einer Fütterungsstudie keine signifikanten Änderungen in der 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe auftraten. Sowohl nach drei Wochen Kalorienrestriktion als auch nach der Wiederaanfütterung (1 Woche und 5 Wochen) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der AL und KR Gruppe erfasst.

Im Allgemeinen fungiert die 11 β -HSD1 *in vitro* als Reduktase. In *in vitro*-Untersuchungen mit gereinigter 11 β -HSD1 aus Mensch und Maus wurde neben Reduktase- auch Dehydrogenaseaktivität gezeigt [182, 39]. Eine Erklärung könnte sein, dass die 11 β -HSD1 in diesem Fettdepot als Dehydrogenase arbeitet [162]. Dies untersuchten Hughes *et al.* in einer Studie und fanden mittels radioaktiv markierter Steroide (Cortison, Cortisol) heraus, dass die 11 β -HSD1 *in vitro* in verschiedenen Geweben (Fettgewebe, Skelettmuskulatur) nicht nur unidirektional Cortison zu Cortisol umsetzt, sondern auch als Dehydrogenase fungiert [183]. Möglicherweise kommt es in stoffwechselaktiven Geweben, wie Fettgewebe und Skelettmuskulatur, zu einem Cortison-Cortisol-Recycling.

In weiteren Humanstudien konnte im Fettgewebe kein Zusammenhang zwischen 11 β -HSD1-Level und BMI/Adipositas gezeigt werden [180, 66]. In einigen Adipositas-Studien ist die 11 β -HSD1 im viszeralen Fettgewebe erhöht und in anderen nicht. Die Gründe dafür bleiben weiterhin unklar [184].

Bei den eigenen Untersuchungen der 11 β -HSD1-Proteinexpression in Schweinedarmfett zeigte sich mittels Western-Blot Analyse, dass nur sehr wenig Protein in den Proben vorhanden war und zusätzliche unspezifische Banden im Western Blot auftraten. Es sind wenige Studien zur Ermittlung der 11 β -HSD1-Proteinexpression mittels Western-Blot vorhanden [184]. Western-Blot Analysen mittels 11 β -HSD1-Antikörpern können problematisch sein, da die Antikörper Spezies-spezifisch und schwierig in der Herstellung sind und oftmals Kreuzreaktionen zeigen. Daher ergaben sich in Western-Blot Experimenten häufig zusätzliche Banden, die nicht eindeutig der 11 β -HSD1 zugeordnet werden konnten [185, 186].

Die Regulation der 11 β -HSD1 im Fettgewebe bei Adipositas und den damit verbundenen metabolischen Erkrankungen ist ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die bisher nicht vollständig geklärt sind. Dies wird durch die uneinheitliche und widersprüchliche Datenlage in Tier- und Humanstudien deutlich. Wie bereits in Schweineleber zeigen auch die Untersuchungen im Fettgewebe, dass es keine Unterschiede in der 11 β -HSD1-Expression und Aktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion gibt. Daher lassen die eigenen Ergebnisse vermuten, dass die 11 β -HSD1 nicht als einziges Schlüsselenzym im Metabolischen Syndrom anzusehen ist.

4.3 11 β -HSD1-Regulation in der Skelettmuskulatur nach Kalorienrestriktion

11 β -HSD1 wird in humaner Skelettmuskulatur exprimiert [89, 88], ihre Funktion ist hier allerdings noch nicht vollkommen bekannt. Es gibt nur wenige Daten über die Rolle der 11 β -HSD1 und dem Einfluss von Cortisol auf die Skelettmuskulatur [97]. Allerdings scheint die Enzymaktivität geringer zu sein als im Fettgewebe [183]. Es gibt Hinweise aus Tierversuchen und Humanstudien, dass es einen Zusammenhang zwischen der 11 β -HSD1-Aktivität in Muskelgewebe und der Entstehung bestimmter metabolischer Erkrankungen gibt. Die lokale Generierung aktiver Glucocorticoide in der Skelettmuskulatur kann zur Entstehung des Metabolischen Syndroms und Glucocorticoid-induzierter Insulinresistenz beitragen [97]. Im Metabolischen Syndrom wurde nachgewiesen, dass lokal erhöhte Glucocorticoid-Aktivität in bestimmten Geweben, wie Fettgewebe und Skelettmuskulatur, vorliegt [187, 89, 40, 54].

Es sind verschiedene Studien über die 11 β -HSD1-Enzymaktivität in humaner Skelettmuskulatur bei gesunden und diabetischen Personen bekannt [88, 94]. Insbesondere die 11 β -HSD1 mRNA-Expressions- und Aktivitätslevel sind erhöht in Patienten mit Typ-2-Diabetes [89, 94]. Die Expression der 11 β -HSD1 in Myotuben von übergewichtigen Typ-2-Diabetes Patienten ist erhöht im Vergleich zur Kontrolle [90]. In humanen Myotuben führte die selektive Inhibition der 11 β -HSD1 zur Verbesserung der Insulinsignalisierung [92]. Die 11 β -HSD1-Aktivität ist im *Musculus gastrocnemius* eines Nagertier-Modells mit Typ-2-Diabetes erhöht [41]. Die 11 β -HSD1-Inhibition führte ebenfalls *in vivo* bei C57B16/J-Mäusen zur Verbesserung der Insulinsignalisierung [92]. Daher wird vermutet, dass eine erhöhte 11 β -HSD1-Expression in Muskelgewebe zur Pathogenese von Insulinresistenz beiträgt [89].

Aufgrund dieser Datenlage wurde angenommen, dass die 11 β -HSD1-Expression und Aktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederaanfütterung im Muskel- und Fettgewebe reduziert ist.

Wie auch im Fettgewebe zeigen die eigenen Ergebnisse in der Skelettmuskulatur in den Schweinegewebeproben keine signifikanten Unterschiede zwischen der KR- und AL-Gruppe auf mRNA- und Protein-Level. Trotz geringer Protein-Level war die 11 β -HSD1 mRNA-Expression vorhanden. Darüber hinaus konnte keine Enzymaktivität in den Schweinegewebeproben detektiert werden. Die mRNA- und Protein-Expression korrelieren häufig miteinander. Wenn eine Diskrepanz zwischen mRNA und Protein-Expression vorliegt, könnte dies an post-transkriptionalen und post-translationalen Prozessen liegen [188].

Obwohl in den Untersuchungen dieser Studie 11 β -HSD1 mRNA-Expression detektiert wurde, konnte keine Enzymaktivität in den Schweinemuskelproben gemessen werden. Bei den eigenen Untersuchungen handelte es sich um *in vitro*-Aktivitätsstudien, in denen die Umsetzung von Cortisol in Muskelmikrosomen gemessen wurde.

In einer Nagerstudie zeigte sich, im Vergleich zum Fettgewebe und der Leber, eine geringere 11 β -HSD1-Enzymaktivität in der Skelettmuskulatur [46]. Im Menschen ist nicht eindeutig geklärt, ob Enzymaktivität im Muskelgewebe vorliegt. In einer Studie wurden keine Cortisol-Level in der Skelettmuskel des Unterarms detektiert [189], in einer anderen Untersuchung wurde eine geringe Reduktaseaktivität in der Beinmuskulatur gemessen (Bestimmung der Aktivität unter Verwendung von d4-Cortisol) [190, 191].

In einigen humanen *in vivo*-Studien konnte ebenfalls keine 11 β -HSD1 Reduktaseaktivität in Muskel (Unterarm) nachgewiesen werden [192, 193, 189], trotz vorhandener 11 β -HSD1 mRNA-Expression [88]. Eine mögliche Erklärung ist, dass im Muskelgewebe ein Cortison-Cortisol-Recycling vorliegt. Hughes *et al.* zeigten, dass in Unterarmmuskulatur nicht nur 11 β -Reduktaseaktivität vorliegt, sondern auch 11 β -Dehydrogenaseaktivität [183]. Die Autoren vermuten, dass die 11 β -Dehydrogenaseaktivität durch die Reversibilität der 11 β -HSD1 hervorgerufen werden kann oder durch das Vorhandensein der 11 β -HSD2, die Cortisol zu Cortison oxidiert.

Die eigenen Untersuchungen sollten zum besseren Verständnis der 11 β -HSD1-Expression und Aktivität nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung in Muskelgewebe beitragen. Die Ergebnisse aus den Schweinemuskelproben, wie bereits auch in Leber und Fettgewebe, zeigten allerdings keinen signifikanten Einfluss der 11 β -HSD1 im Verlauf einer Kalorienrestriktion und legen nahe, dass die metabolischen Veränderungen von Adipositas und Typ-2-Diabetes nicht allein durch die 11 β -HSD1 vermittelt werden.

4.4 11 β -HSD1-Glykosylierung in verschiedenen Gewebeproben

Zur Bestimmung der 11 β -HSD1-Proteinexpression in Maus- und Schweineleber im Verlauf einer Kalorienrestriktion wurden Western-Blot Experimente durchgeführt. Dabei kann ein Unterschied zwischen der beobachteten Protein-Molekülgröße und der berechneten Größe entstehen, der häufig durch verschiedene post-translationale Gründe (alternatives Splicing, endoproteolytisches Prozessieren und post-translationale Modifikationen) erklärt wird [194]. Durch die Berechnungen der Datenbank UniProtKb [P28845 (DHI1_HUMAN)] ergibt sich für das humane 11 β -HSD1-Protein ein Molekulargewicht von 32,4 kDa. Die Unterschiede zwischen der beobachteten und vorhergesagten Molekülgröße der 11 β -HSD1 in der Leber wird durch die Glykosylierung erklärt und ist bereits in unterschiedlichen Studien bewiesen [195, 42]. In den untersuchten Schweinedarmfett- und Schweinemuskelproben wurde, im Vergleich zur Leber, keine Glykosylierung der 11 β -HSD1 gefunden und scheint möglicherweise gewebsspezifisch zu sein.

Es stellte sich die Frage, ob die Enzymaktivität der 11 β -HSD1 durch die Glykosylierung beeinflusst wird. Blum *et al.* zeigten in einer Studie, dass enzymatische Deglykosylierung der 11 β -HSD1 in humaner Leber nicht zur Verringerung der Aktivität führte [148]. Agarwal *et al.* beobachteten nach Mutation der N-Glykosylierungsbindungsstellen der 11 β -HSD1 in Rattenleber eine veränderte Enzymaktivität und vermuteten, dass die Glykosylierung für die Aktivität und Stabilität des Enzyms notwendig ist [196]. Glykosylierungen können die lokale Sekundärstruktur von Proteinen auf unterschiedliche Weise beeinträchtigen. Zum einen tritt die N-Glykosylierung co-translational auf und kann den Prozess der Proteinfaltung begünstigen. Außerdem kann das fertige Protein durch die Kohlenhydrate stabilisiert werden. In den Schweinedarmfettproben zeigte sich keine Glykosylierung, aber trotzdem geringe Enzymaktivität. In den Schweinemuskelproben war die 11 β -HSD1 ebenfalls nicht glykosyliert, es zeigte sich keine 11 β -HSD1-Enzymaktivität. Möglicherweise ist die fehlende Enzymaktivität auf die nicht vorhandene Glykosylierung zurückzuführen.

4.5 11 β -HSD1-Expression in normalen- und untergewichtigen Tieren im Verlauf einer Kalorienrestriktion

In Human- und Tierstudien wurde gezeigt, dass ein zu geringes Geburtsgewicht mit einer erhöhten Prävalenz des Metabolischen Syndroms und vaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter einhergeht [197, 198, 199]. Es gibt Daten, die vermuten lassen, dass Patienten mit dem Metabolischen Syndrom eine hyperaktive Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse (HPA-Achse) zeigen und dies wiederum kann zu einem funktionellen Hypercortisolismus führen [200]. Der Grund für die Überaktivierung der HPA-Achse ist unklar, aber es könnte mit chronischem Stress und/oder einem geringem Geburtsgewicht zusammenhängen. Diese Faktoren wiederum sind verbunden mit erhöhten Cortisol-Leveln und größerer Empfindlichkeit der HPA-Achse. Eine erhöhte Exposition gegenüber Cortisol trägt zur verstärkten Fettakkumulation im viszeralen Fettgewebe bei [17]. Daher wurden in dieser Arbeit die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 in den verschiedenen Geweben der Tiere mit normalem und untergewichtigem Geburtsgewicht untersucht.

Während der Trächtigkeit kann die Ernährung einer Sau das postnatale Wachstum der Ferkel beeinflussen. Kanitz *et al.* [201] berichteten darüber, dass es einen Zusammenhang zwischen geringem Geburtsgewicht und erhöhten Plasma-Cortisol-Konzentrationen im Erwachsenenalter gibt. Es zeigte sich, dass ungünstige Lebensumstände der Muttersau (Unterernährung und Proteinmangel) während des fetalen Wachstums das Krankheitsrisiko der Nachkommen im Erwachsenenalter erhöht. Eine mögliche Ursache könnte eine Veränderung der HPA-Achse sein. Eine Verstärkung der mütterlichen HPA-Achse kann zu erhöhten Glucocorticoid-Konzentrationen der Nachkommen führen und das Risiko für Bluthochdruck, Glucoseintoleranz und Übergewicht erhöhen.

Beim Menschen ist die Protein-Energie-Mangelernährung die häufigste Art der Mangelernährung, sie zerstört die Energiebilanz des Organismus. Eine entscheidende endogene Antwort des Körpers ist die Aktivierung der HPA-Achse. In der Tat ist allgemein bekannt, dass Kalorienrestriktion und Hunger die Aktivität und den Rhythmus der HPA-Achse beeinflussen können [202, 203], Cortisol wiederum wird durch die HPA-Achse reguliert. Die aufgestellte Hypothese, dass die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 nach einer Kalorienrestriktion in der Leber hochreguliert und im Fettgewebe sowie der Skelettmuskulatur herunterreguliert wird, wurde an normal- (N) bzw. untergewichtigen (U) Tieren untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten in keiner der beiden Gruppen (N und U) einen Unterschied der 11 β -HSD1-Level nach einer Kalorienrestriktion oder Wiederanfütterung. Der Zusammenhang einer veränderten 11 β -HSD1-Expression und dem Metabolischen Syndrom wird vor allem bei übergewichtigen bzw. adipösen

Patienten beobachtet. Nach einer dreiwöchigen Kalorienrestriktion in Schweinen, mit untergewichtigem und normalgewichtigen Geburtsgewicht, wurden in Untersuchungen von Metges *et al.* [204] ähnliche Konzentrationen an Plasma-Lipiden und Stresshormonen gemessen. Das Geburtsgewicht der Tiere wirkte sich weder auf die Katecholamin- noch auf die Plasma-Cortisol-Konzentrationen aus. Die fehlenden Unterschiede zwischen Schweinen mit geringem und normalem Geburtsgewicht wurden durch evolutionär konservierte metabolische Reaktionen erklärt. Während eines Futtermittelmangels wird die Oxidation endogener Nährstoffe stimuliert und ATP geliefert, um das Überleben zu sichern. Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung korrelieren mit den eigenen Daten und lassen vermuten, dass es evolutionär bedingte konservierte metabolische Reaktionen gibt, die die Regulation der 11 β -HSD1, zumindest in dem untersuchten Zeitraum, nicht beeinflussen.

4.6 Speziesunterschiede der 11 β -HSD1-Regulation nach Kalorienrestriktion und Wiederanfütterung

Zur Bestimmung der 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität im Verlauf einer Kalorienrestriktion wurden Proben aus zwei unterschiedlichen Fütterungsstudien betrachtet. Zum einen wurden Proben aus einer Mäusefütterungsstudie untersucht. Hier zeigte sich, dass die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 in Mausleber nach Kalorienrestriktion und Wiederanfütterung hochreguliert ist. Im Unterschied dazu zeigten Untersuchungen von Schweinegeweben keine Veränderung der 11 β -HSD1-Level im Verlauf einer Kalorienrestriktion.

Das Schwein wird häufig als Modellorganismus zur Untersuchung von u.a. Energiestoffwechsel und Übergewicht verwendet. Es ist gut geeignet, da es nach der Geburt kein braunes Fettgewebe besitzt und seine Stoffwechseleigenschaften, sein kardiovaskuläres System sowie die Organgrößen dem Menschen sehr ähnlich sind [205]. Daher wurden nach der Untersuchung der 11 β -HSD1 in Mausleber Proben aus einer Schweinefütterungsstudie untersucht. Es wurden keine Änderungen der 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität beobachtet und daher eine spezies-spezifische Regulation der 11 β -HSD1 vermutet.

In einigen Studien wurde durchaus schon gefunden, dass die Regulation der 11 β -HSD1 Spezies-abhängig ist. Bei einer Untersuchung über die Rolle der 11 β -HSD1 im Stoffwechsel von 7-Ketocholesterol (7-KC) zeigten sich signifikante Spezies-spezifische Unterschiede in der Enzymaktivität. Im Menschen und in der Ratte katalysierte die 11 β -HSD1 die stereospezifische Reduktion von 7-KC zu 7 β -Hydroxysterol, hingegen zeigte sich das Enzym im Hamster als nicht stereospezifisch, da sowohl 7 α - als auch 7 β -Hydroxysterol entstand [206]. In einer weiteren Studie wurde eine Spezies-spezifische Regulation der 11 β -HSD1 in Hepatozyten von Ratte und Mensch gefunden [37].

4.7 11 β -HSD1-Regulation im Verlauf einer Kalorienrestriktion

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung von Stomby *et al.* wurden eine Abnahme der 11 β -HSD1-Expression im subkutanen Fettgewebe und eine Zunahme der Expression in der Leber nach Gewichtsreduzierung in adipösen postmenopausalen Frauen während einer zweijährigen Intervention gefunden [147]. Andere Studien, die die 11 β -HSD1-Expression nach bestimmten Ernährungsinterventionen, wie z.B. Kalorienrestriktion, im subkutanen Fettgewebe untersuchten, zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Expression der 11 β -HSD1 lag unverändert [165, 82], erhöht [207] oder erniedrigt [208, 209, 147] im subkutanen Fettgewebe vor.

Die Unterschiede bei der 11 β -HSD1-Expression könnten durch die (verwendete) Methode zur Gewichtsreduzierung, das Ausmaß der Gewichtsabnahme und die Lokalisation der entnommenen Fettgewebeprobe erklärt werden. In der Studie von Stomby *et al.* [147] wurden zudem nach Gewichtsverlust eine erhöhte Cortisol-Umsetzung durch die 5 α -Reduktase gefunden. Es wird vermutet, dass die erhöhte 5 α -Reduktion der Glucocorticoide durch die Gewichtsreduzierung eine langzeitige protektive Adaptation darstellt um intra-hepatische Cortisol-Level zu verringern und einer metabolischen Dysregulierung entgegenzuwirken. Die Rolle der 5 α -Reduktase wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, in denen transgene Mäuse ohne 5 α -Reduktase Insulinresistenz und Fettleber entwickelten [210]. In einer anderen Studie führte die Hemmung der 5 α -Reduktase bei Männern zu Insulinresistenz [211]. Die Faktoren, die die Veränderungen im Glucocorticoid-Metabolismus verursachen sind unklar. Ein möglicher Faktor könnte Insulin sein, da es ernährungsbedingte Regulationen im Glucocorticoid-Stoffwechsel steuern kann, wie die 11 β -HSD1- und 5 α -Reduktase-Aktivität [212].

Eine akute Hyperinsulinämie erhöht die systemische Cortisol-Regeneration [213] und verringert die 11 β -HSD1-Enzymaktivität im Fettgewebe schlanker, nicht aber adipöser Männer *in vivo* [81]. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls gefunden, dass die 11 β -HSD1-Aktivität nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit erhöht ist und diese Veränderungen mit einer gesteigerten Insulinsekretion assoziiert sind [214]. Eine dauerhafte Reduzierung der Insulin-Level durch eine kohlenhydratarme Ernährung über vier Wochen zeigte eine erhöhte 11 β -HSD1-Aktivität, vermutlich auf Grund einer erhöhten Enzymaktivität in der Leber [165]. Stomby *et al.* konnten keine Verbindung zwischen veränderter 11 β -HSD1-Aktivität und Insulinsensitivität herstellen [147]. In weiteren Studien korrelierte die 11 β -HSD1-Aktivität nicht mit dem Nüchtern-Plasma-Insulinspiegel [209, 208], dagegen aber mit der Insulinsensitivität, die während eines intravenösen Glucosetoleranztests gemessen wurde [208]. Zudem wurde ein reduzierter BMI signifikant mit einer verringerten 11 β -HSD1-Expression im subkutanen Fettgewebe verbunden.

Daher wird vermutet, dass bei einer Gewichtsabnahme nicht nur Insulin, sondern weitere Faktoren, wie eine verringerte Entzündung im Fettgewebe, mit der 11 β -HSD1-Regulation im subkutanen Fettgewebe im Zusammenhang stehen [215].

In der eigenen Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss der 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität nach einer Kalorienrestriktion in Leber, viszeralem Fettgewebe und Skelettmuskulatur in zwei verschiedenen Spezies untersucht. Dabei zeigten sich in den beiden Spezies unterschiedliche Ergebnisse. Die Aktivität und Expression der 11 β -HSD1 in Mausleber ist nach Kalorienrestriktion verändert, in den Schweinegewebeproben gibt es keine Veränderung der Regulation.

Eine Kalorienrestriktion beim Menschen von 30-50% zeigte nachweislich positive Gesundheitseffekte, aber langfristige Folgen solcher Reduktionsdiäten sind mäßig, da der Gewichtsverlust oft nicht nachhaltig ist [216]. Bei den untersuchten Mausleberproben aus der Fütterungsstudie zeigte sich eine Veränderung der 11 β -HSD1-Level nach Kalorienrestriktion und Wiederaanfütterung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Zeitraum der Kalorienrestriktion umfasste dabei sechs Monate. Darüber hinaus wurden Proben nach zwei Wochen und sechs Monaten Wiederaanfütterung untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls eine Veränderung der Expression und Aktivität der 11 β -HSD1. In der Schweinefütterungsstudie dagegen dauerte die Kalorienrestriktion drei Wochen und die Wiederaanfütterung erfolgte nach einer und fünf Wochen. Es konnten keine Unterschiede in der 11 β -HSD1-Expression und 11 β -HSD1-Aktivität nach einer Kalorienrestriktion oder Wiederaanfütterung festgestellt werden. Möglicherweise war der Zeitraum der Kalorienrestriktion bei der Schweinefütterungsstudie zu kurz, um Effekte auf die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 zu beobachten. Denn in Humanstudien werden Reduktionsdiäten über einen längeren Zeitraum durchgeführt, um überhaupt Effekte zu erzielen. Der zeitliche Ablauf der Fütterungsversuche in den beiden Spezies wurde so gewählt, da aus Untersuchungen nach sechs Monaten Kalorienrestriktion in der Maus und nach drei Wochen Kalorienrestriktion im Schwein ein Effekt (z.B. auf den Energiestoffwechsel) zu erwarten war [204, 145]. Bei einem vorhandenen Effekt auf den Stoffwechsel sollten die jeweiligen Zeitpunkte der Wiederaanfütterung eine anhaltende Adaptation (z.B. auf den Energiestoffwechsel) zeigen.

Zahlreiche Kurzzeitstudien mit einer Zeitdauer von sechs Monaten untersuchten einen Gewichtsverlust [217]. Bei Übergewicht handelt es sich aber um einen chronischen Zustand, ähnlich wie bei Diabetes oder Bluthochdruck [218]. Daher sind zur Untersuchung der Effekte einer Gewichtsreduzierung Langzeitstudien notwendig. Außerdem können bei kurzzeitigen Diäten (weniger als sechs Monate) die möglichen Folgen einer Gewichtszunahme nicht betrachtet werden, da eine Zunahme langsam eintritt (bei über 80% der Menschen), die vorher eine Gewichtsabnahme erzielten [219, 220].

Es sind widersprüchliche Daten hinsichtlich der Effekte einer Kalorienrestriktion auf die 11 β -HSD1-Expression und Aktivität bekannt. In einer Studie mit postmenopausalen Frauen hatte eine Gewichtsreduzierung keinen Einfluss auf die 11 β -HSD1- und 11 β -HSD2-Genexpression im Fettgewebe [82]. Obwohl in einer anderen Studie mit adipösen Männern und Frauen die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 nach Gewichtsverlust in Adipozyten erhöht war [207]. Eine Gewichtsabnahme in Folge einer Magen-Bypass-Operation führte zur signifikanten Reduktion der 11 β -HSD1 mRNA-Expression im subkutanen Fettgewebe. Daher wurde vermutet, dass die Hochregulierung des Enzyms eher eine Konsequenz als die Ursache von Übergewicht ist [209]. Es ist nicht klar, ob bei Adipositas die Expression und Aktivität der 11 β -HSD1 einen verursachenden oder einen kompensatorischen Mechanismus darstellt.

Eine kalorienreduzierte Ernährung hat nicht nur Vorteile, da es u.a. zur verminderten Thermogenese und zum Verlust von Körperprotein kommen kann [221, 222]. In der anschließenden Realimentationsphase bzw. Wiederanfütterungsphase kommt es zum verzögerten Wiederaufbau der Körperproteinmasse und zu disproportional hoher Fettakkumulation [223]. Eine Kalorienrestriktion kann zu persistierenden Stoffwechselladaptationen führen. Diese können sich nach der Realimentationsphase aber ungünstig auswirken, was in generationsübergreifenden Tierexperimenten [224] und durch epidemiologische Studien beim Menschen [225, 226] gezeigt wurde.

Ein weiterer Punkt, der möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der 11 β -HSD1 spielt, sind geschlechterspezifische Unterschiede in der 11 β -HSD1-Expression. In einer Studie von De Schoolmeester *et al.* wurden Geschlechtsunterschiede bei der 11 β -HSD1 mRNA-Expression und Enzymaktivität im Fettgewebe übergewichtiger, nicht-diabetischer Patienten untersucht. Dabei wurden geschlechterspezifische Unterschiede in der Regulation der 11 β -HSD1 im Zusammenhang mit Adipositas- und Insulinresistenz-Markern gefunden [227]. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurden weibliche präpubertäre, juvenile Schweine betrachtet. Es konnten keine Effekte einer Kalorienrestriktion auf die 11 β -HSD1-Level erfasst werden.

4.8 Résumé

Die Rolle der 11 β -HSD1 in der Pathophysiologie von Übergewicht und den damit verbundenen Stoffwechselkrankheiten ist nicht eindeutig geklärt. Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen zum besseren Verständnis der 11 β -HSD1-Regulation im Metabolischen Syndrom beitragen.

Zum ersten Mal wurde der Einfluss der 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität nach einer Kalorienrestriktion in Leber, viszeralem Fettgewebe und Skelettmuskulatur in zwei verschiedenen Spezies untersucht. Es wurden Proben aus zwei unterschiedlichen Fütterungsstudien von Maus und Schwein verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass bei den Proben aus dem NagermodeLL Veränderungen der 11 β -HSD1-Regulation nach einer Kalorienrestriktion vorhanden waren. Die Ergebnisse mit Schwein als Modellorganismus wiesen keine Veränderung der 11 β -HSD1-Expression und Enzymaktivität nach einer Kalorienrestriktion auf. In der Literatur finden sich in Tier- und Humanstudien ebenfalls keine einheitlichen Ergebnisse der 11 β -HSD1-Regulation nach einer Kalorienrestriktion. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass es Spezies-abhängige Unterschiede der 11 β -HSD1-Regulation nach einer Kalorienrestriktion gibt.

Möglicherweise spielen zusätzliche Regulationsschritte und/oder weitere Mediatoren bei der 11 β -HSD1-Enzymaktivität in der Mausleber eine Rolle. Die 11 β -HSD1 scheint also nicht als das Schlüsselenzym im Metabolischen Syndrom zu fungieren.

Die Resultate dieser Studie lassen sich nur bedingt auf den Menschen übertragen. Es stellt sich darüber hinaus die Frage, ob eine lebenslange Einschränkung der Kalorienzufuhr beim Menschen praktikierbar ist. Bei der Betrachtung des heutigen Lebensstils ist dies kaum vorstellbar.

Abbildungsverzeichnis

1	Funktion der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen.	4
2	Übersicht über den Verlauf der Kalorienrestriktion und Zeitpunkte der Probenentnahmen beim Schwein.	18
3	Schematischer Aufbau für das Blot-Sandwich.	24
4	Darstellung des Fütterungsschemas im Mausversuch.	30
5	11 β -HSD1 mRNA-Expression nach 6 Monaten Kalorienrestriktion und 2 Wochen Wiederanfütterung in Mausleber.	34
6	11 β -HSD1 Protein-Expression nach 6 Monaten Kalorienrestriktion und 2 Wochen Wiederanfütterung in Mausleber.	35
7	Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der 11 β -HSD1 katalysierten 11-Dehydrocorticosteron-Reduktion zu Corticosteron.	36
8	11 β -HSD1-Enzymaktivität nach 6 Monaten Kalorienrestriktion und Wiederanfütterung in Mausleber.	37
9	Repräsentatives Agarosebild der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber.	40
10	11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung von 1 und 5 Wochen.	42
11	Repräsentatives Agarosebild der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Darmfett.	44
12	11 β -HSD1 mRNA-Expression in Darmfett nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung von 1 und 5 Wochen.	46
13	Repräsentatives Agarosebild der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Skelettmuskulatur.	47
14	11 β -HSD1 mRNA-Expression in Skelettmuskulatur nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung von 1 und 5 Wochen.	49
15	Western-Blots zur Detektion von 11 β -HSD1-Protein in Mikrosomenpräparationen.	51
16	Western Blot zur Identifizierung des 11 β -HSD1-Protein in Fettgewebe.	52
17	Western-Blot mit und ohne „blocking peptide“ von Schweinedarmfettgewebe (PVATM), Schweinesubkutanfettgewebe (PSATM) und Schweineleber (PLM).	53
18	Repräsentative Western-Blots für die 11 β -HSD1 Protein-Expression in Schweineleber nach 3 Wochen Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung von 1 und 5 Wochen.	56

19	11 β -HSD1 Protein-Expression in Schweineleber nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung.	58
20	Repräsentative Western-Blots für die 11 β -HSD1 Protein-Expression in Schweinedarmfett.	60
21	11 β -HSD1 Protein-Expression in Darmfett nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung.	62
22	Western-Blot für die 11 β -HSD1 Protein-Expression in N- und U-Tieren in Schweinemuskel.	63
23	Inhibition der 11 β -HSD1-Aktivität in Schweinelebermikrosomen durch 18 β -Glycyrrhetinsäure.	64
24	Repräsentatives Chromatogramm der 11 β -HSD1 vermittelten Cortison-Reduktion in Schweinelebermikrosomen.	66
25	11 β -HSD1-Enzymaktivität in Schweineleber nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung.	67
26	Repräsentatives Chromatogramm der 11 β -HSD1 vermittelten Cortison-Reduktion in Schweinedarmfettmikrosomen.	68
27	11 β -HSD1-Enzymaktivität in Darmfett nach Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung.	69
28	Versuchsablauf zur 11 β -HSD1-Regulation nach einer Kalorienrestriktion und anschließender Wiederanfütterung in Leber, Darmfettgewebe und Skelettmuskulatur.	71

Tabellenverzeichnis

1	Komponenten der verwendeten HPLC-Anlage.	15
2	Anzahl der gelieferten Schweineproben für eine Gewebeart (Leber, Darmfett, Skelettmuskulatur).	17
3	Zeitpunkte der Probennahme bei Schwein.	18
4	Gewebemengen für die RNA-Isolierung.	19
5	PCR-Programm der Phire-Hot-Start-Polymerase.	21
6	Sequenzen der verwendeten designten Primer.	21
7	Schweinegewebemengen für die Mikrosomenpräparation.	22
8	Übersicht über die verwendeten Antikörper-Lösungen für die unterschiedlichen Schweinegewebe.	24
9	Übersicht über die verwendeten Antikörper-Lösungen zur Detektion des Referenzproteins in den Schweineproben.	25
10	Reaktionsansatz für die Denaturierung des Proteins für die Deglykosylierung mit PNGase F.	26
11	Reaktionsansatz für die PGNase F Behandlung.	26
12	Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Schweinelebermikrosomen.	27
13	Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Schweinedarmfettmikrosomen.	27
14	Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Schweinemuskelmikrosomen.	28
15	Übersicht über die Behandlung und Anzahl der Mausleberproben.	29
16	PCR-Programm der Phire-Hot-Start Polymerase.	31
17	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für Maus.	31
18	Antikörper zur Detektion des 11 β -HSD1-Proteins in Mausleber.	31
19	Antikörper zur Detektion des Referenzproteins.	31
20	Konzentrationen im Ansatz der Reduktasereaktion mit Mauslebermikrosomen.	32
21	Übersicht der verwendeten Proben der N- und U-Tiere zur Bestimmung der 11 β -HSD1 mRNA-Expression in Schweineleber-, Darmfett- und Muskel.	38
22	Übersicht der verwendeten Schweineleber-, Darmfett- und Muskelproben der N- und U-Tiere zur Erfassung der 11 β -HSD1 Protein-Expression.	54
23	Übersicht der verwendeten Schweineleber-, Darmfett- und Muskelproben der N- und U-Tiere zur Bestimmung der 11 β -HSD1 Aktivität.	65

Literatur

- [1] K. Obunai, S. Jani, and G. D. Dangas, Cardiovascular morbidity and mortality of the metabolic syndrome., *Medical Clinics of North America* **91**(6), 1169–84, (Nov 2007).
- [2] G. M. Reaven, Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease., *Diabetes* **37**, 1595–1607 (Dec. 1988).
- [3] S. M. Grundy, J. I. Cleeman, S. R. Daniels, K. A. Donato, R. H. Eckel, B. A. Franklin, D. J. Gordon, R. M. Krauss, P. J. Savage, S. C. Smith, Jr, J. A. Spertus, F. Costa, A. H. A. , L. , National Heart, and B. Institute, Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement., *Circulation* **112**(17), 2735–2752 (Oct 2005).
- [4] B. Kuntz and T. Lampert, Socioeconomic factors and obesity., *Deutsches Ärzteblatt International* **107**(30), 517–522 (Jul 2010).
- [5] G. B. M. Mensink, T. Lampert, and E. Bergmann, [Overweight and obesity in Germany 1984-2003]., *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitschutz* **48**(12), 1348–1356 (Dec 2005).
- [6] Jeder zweite Erwachsene in Deutschland hat Übergewicht., *Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung vom 5. November 2014 – 386/14. .*
- [7] M. N. et al., Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013., *Lancet* **384**(9945), 766–781 (Aug 2014).
- [8] L. U. Monzillo, O. Hamdy, E. S. Horton, S. Ledbury, C. Mullooly, C. Jarema, S. Porter, K. Ovalle, A. Moussa, and C. S. Mantzoros, Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance., *Obesity Research* **11**(9), 1048–1054 (Sep 2003).
- [9] R. A. States, E. Pappas, and Y. Salem, Overground physical therapy gait training for chronic stroke patients with mobility deficits., *Cochrane Database of Systematic Reviews* (3), CD006075 (2009).
- [10] G. Tarantino, C. Finelli, A. Colao, D. Capone, M. Tarantino, E. Grimaldi, D. Chianese, S. Gioia, F. Pasanisi, F. Contaldo, F. Scopacasa, and S. Savastano, Are hepatic steatosis and carotid intima media thickness associated in obese patients

- with normal or slightly elevated gamma-glutamyl-transferase?, *J Transl Med* **10**, 50 (2012).
- [11] K. R. Fontaine, D. T. Redden, C. Wang, A. O. Westfall, and D. B. Allison, Years of life lost due to obesity., *JAMA* **289**(2), 187–193 (Jan 2003).
- [12] E. A. Finkelstein, D. S. Brown, L. A. Wrage, B. T. Allaire, and T. J. Hoerger, Individual and aggregate years-of-life-lost associated with overweight and obesity., *Obesity (Silver Spring)* **18**(2), 333–339 (Feb 2010).
- [13] J. E. Gerich, Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus., *Mayo Clinic Proceedings* **78**(4), 447–456 (Apr 2003).
- [14] International Diabetes Federation., *IDF Diabetes atlas sixth edition*, 2014 .
- [15] G. Danaei, M. M. Finucane, Y. Lu, G. M. Singh, M. J. Cowan, C. J. Paciorek, J. K. Lin, F. Farzadfar, Y.-H. Khang, G. A. Stevens, M. Rao, M. K. Ali, L. M. Riley, C. A. Robinson, M. Ezzati, and G. B. o. M. R. F. o. C. D. C. G. B. G. , National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants., *Lancet* **378**(9785), 31–40 (Jul 2011).
- [16] OECD, *Health at a Glance: Europe 2012*, OECD Publishing (2012).
- [17] P. Anagnostis, V. G. Athyros, K. Tziomalos, A. Karagiannis, and D. P. Mikhailidis, Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**(8), 2692–2701 (Aug 2009).
- [18] M. Wang, The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome., *Nutrition & Metabolism* **2**(1), 3 (Feb 2005).
- [19] G. Löffler, P. E. Petrides, and P. C. Heinrich, editors, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer, Berlin, 8., völlig neu bearb. Aufl. edition, 2006.
- [20] W. Arlt and P. M. Stewart, Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action., *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **34**(2), 293–313, viii (Jun 2005).

- [21] P. A. Tataranni, D. E. Larson, S. Snitker, J. B. Young, J. P. Flatt, and E. Ravussin, Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans., *American Journal of Physiology* **271**(2 Pt 1), E317–E325 (Aug 1996).
- [22] H. Hauner, P. Schmid, and E. F. Pfeiffer, Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells., *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **64**, 832–835 (Apr. 1987).
- [23] H. Hauner, G. Entenmann, M. Wabitsch, D. Gaillard, G. Ailhaud, R. Negrel, and E. F. Pfeiffer, Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium., *The Journal of clinical investigation* **84**, 1663–1670 (Nov. 1989).
- [24] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, and P. Ruth, editors, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte auflage edition, 2013, Literaturverzeichnis Seite [1059]-1061.
- [25] D. H. van Raalte and M. Diamant, Steroid diabetes: from mechanism to treatment?, *Netherlands Journal of Medicine* **72**(2), 62–72 (Feb 2014).
- [26] W. B. Pratt and D. O. Toft, Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones., *Endocrine Reviews* **18**(3), 306–360 (Jun 1997).
- [27] M. J. M. Schaaf and J. A. Cidlowski, Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity., *Molecular and Cellular Biology* **23**(6), 1922–1934 (Mar 2003).
- [28] P. K. Siiteri, J. T. Murai, G. L. Hammond, J. A. Nisker, W. J. Raymoure, and R. W. Kuhn, The serum transport of steroid hormones., *Recent Progress in Hormone Research* **38**, 457–510 (1982).
- [29] P. P. Löffler, G. and P. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*, volume 8, Heidelberg, Springer Verlag, 2006.
- [30] Y. Sen, D. Aygun, E. Yilmaz, and A. Ayar, Children and adolescents with obesity and the metabolic syndrome have high circulating cortisol levels., *Neuroendocrinology Letters* **29**(1), 141–145 (Feb 2008).
- [31] M. J. Weigensberg, C. M. Toledo-Corral, and M. I. Goran, Association between the metabolic syndrome and serum cortisol in overweight Latino youth., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**(4), 1372–1378 (Apr 2008).

- [32] M. Misra, M. A. Bredella, P. Tsai, N. Mendes, K. K. Miller, and A. Klibanski, Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls., *American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism* **295**(2), E385–E392 (Aug 2008).
- [33] D. I. Phillips, D. J. Barker, C. H. Fall, J. R. Seckl, C. B. Whorwood, P. J. Wood, and B. R. Walker, Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome?, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**(3), 757–760 (Mar 1998).
- [34] T. Reinehr and W. Andler, Cortisol and its relation to insulin resistance before and after weight loss in obese children., *Hormone Research* **62**(3), 107–112 (2004).
- [35] B. R. Walker, Cortisol—cause and cure for metabolic syndrome?, *Diabetic Medicine* **23**(12), 1281–1288 (Dec 2006).
- [36] A. Blum and E. Maser, Enzymology and molecular biology of glucocorticoid metabolism in humans., *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **75**, 173–216 (2003).
- [37] M. L. Ricketts, K. J. Shoesmith, M. Hewison, A. Strain, M. C. Eggo, and P. M. Stewart, Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in primary cultures of rat and human hepatocytes., *Journal of Endocrinology* **156**(1), 159–168 (Jan 1998).
- [38] Z. Krozowski, The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects., *Molecular and Cellular Endocrinology* **151**(1-2), 121–127 (May 1999).
- [39] E. Maser, B. Völker, and J. Friebertshäuser, 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase., *Biochemistry* **41**(7), 2459–2465 (Feb 2002).
- [40] E. Rask, B. R. Walker, S. Söderberg, D. E. W. Livingstone, M. Eliasson, O. Johnson, R. Andrew, and T. Olsson, Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87**(7), 3330–3336 (Jul 2002).

- [41] Y.-l. Zhang, X. Zhong, Z. Gjoka, Y. Li, W. Stochaj, M. Stahl, R. Kriz, J. F. Tobin, D. Erbe, and V. Suri, H6PDH interacts directly with 11beta-HSD1: implications for determining the directionality of glucocorticoid catalysis., *Archives of Biochemistry and Biophysics* **483**(1), 45–54 (Mar 2009).
- [42] A. Odermatt, P. Arnold, A. Stauffer, B. M. Frey, and F. J. Frey, The N-terminal anchor sequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane., *Journal of Biological Chemistry* **274**(40), 28762–28770 (Oct 1999).
- [43] C. A. Staab, J. P. Stegk, S. Haenisch, E. Neiss, K. Köbsch, B. Ebert, I. Cascorbi, and E. Maser, Analysis of alternative promoter usage in expression of HSD11B1 including the development of a transcript-specific quantitative real-time PCR method., *Chemico-Biological Interactions* **191**(1-3), 104–112 (May 2011).
- [44] G. M. Tannin, A. K. Agarwal, C. Monder, M. I. New, and P. C. White, The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization., *Journal of Biological Chemistry* **266**(25), 16653–16658 (Sep 1991).
- [45] S. S. S. V. Prasad, A. Prashanth, C. P. Kumar, S. J. Reddy, N. V. Giridharan, and A. Vajreswari, A novel genetically-obese rat model with elevated 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in subcutaneous adipose tissue., *Lipids in Health and Disease* **9**, 132 (2010).
- [46] D. E. Livingstone, G. C. Jones, K. Smith, P. M. Jamieson, R. Andrew, C. J. Kenyon, and B. R. Walker, Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats., *Endocrinology* **141**(2), 560–563 (Feb 2000).
- [47] Y. Liu, Y. Nakagawa, Y. Wang, R. Sakurai, P. V. Tripathi, K. Lutfy, and T. C. Friedman, Increased glucocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice., *Diabetes* **54**(1), 32–40 (Jan 2005).
- [48] P. Alberts, C. Nilsson, G. Selen, L. O. M. Engblom, N. H. M. Edling, S. Norling, G. Klingström, C. Larsson, M. Forsgren, M. Ashkzari, C. E. Nilsson, M. Fiedler, E. Bergqvist, B. Ohman, E. Björkstrand, and L. B. Abrahmsen, Selective inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains., *Endocrinology* **144**(11), 4755–4762 (Nov 2003).

- [49] A. Hermanowski-Vosatka, J. M. Balkovec, K. Cheng, H. Y. Chen, M. Hernandez, G. C. Koo, C. B. Le Grand, Z. Li, J. M. Metzger, S. S. Mundt, H. Noonan, C. N. Nunes, S. H. Olson, B. Pikounis, N. Ren, N. Robertson, J. M. Schaeffer, K. Shah, M. S. Springer, A. M. Strack, M. Strowski, K. Wu, T. Wu, J. Xiao, B. B. Zhang, S. D. Wright, and R. Thieringer, 11beta-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice., *Journal of Experimental Medicine* **202**(4), 517–527 (Aug 2005).
- [50] E. Torrecilla, G. Fernández-Vázquez, D. Vicent, F. Sánchez-Franco, A. Barabash, L. Cabrerizo, A. Sánchez-Pernaute, A. J. Torres, and M. A. Rubio, Liver upregulation of genes involved in cortisol production and action is associated with metabolic syndrome in morbidly obese patients., *Obesity Surgery* **22**(3), 478–486 (Mar 2012).
- [51] P. M. Stewart, A. Boulton, S. Kumar, P. M. Clark, and C. H. Shackleton, Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone→cortisol conversion in subjects with central adiposity., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**(3), 1022–1027 (Mar 1999).
- [52] R. Andrew, J. Westerbacka, J. Wahren, H. Yki-Järvinen, and B. R. Walker, The contribution of visceral adipose tissue to splanchnic cortisol production in healthy humans., *Diabetes* **54**(5), 1364–1370 (May 2005).
- [53] R. Andrew, D. I. Phillips, and B. R. Walker, Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**(5), 1806–1809 (May 1998).
- [54] E. Rask, T. Olsson, S. Söderberg, R. Andrew, D. E. Livingstone, O. Johnson, and B. R. Walker, Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**(3), 1418–1421 (Mar 2001).
- [55] R. H. Stimson, R. Andrew, N. C. McAvoy, D. Tripathi, P. C. Hayes, and B. R. Walker, Increased whole-body and sustained liver cortisol regeneration by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese men with type 2 diabetes provides a target for enzyme inhibition., *Diabetes* **60**(3), 720–725 (Mar 2011).
- [56] S. Dube, B. Norby, V. Pattan, R. K. Lingineni, R. J. Singh, R. E. Carter, A. Basu, and R. Basu, Hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in obesity and type 2 diabetes using a novel triple tracer cortisol technique., *Diabetologia* **57**(7), 1446–1455 (Jul 2014).

- [57] R. Basu, R. Singh, A. Basu, C. M. Johnson, and R. A. Rizza, Effect of nutrient ingestion on total-body and splanchnic cortisol production in humans., *Diabetes* **55**(3), 667–674 (Mar 2006).
- [58] R. Basu, A. Basu, M. Grudzien, P. Jung, P. Jacobson, M. Johnson, R. Singh, M. Sarr, and R. A. Rizza, Liver is the site of splanchnic cortisol production in obese nondiabetic humans., *Diabetes* **58**(1), 39–45 (Jan 2009).
- [59] P. Alberts, L. Engblom, N. Edling, M. Forsgren, G. Klingström, C. Larsson, Y. Rönquist-Nii, B. Ohman, and L. Abrahamssén, Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice., *Diabetologia* **45**(11), 1528–1532 (Nov 2002).
- [60] I. J. Bujalska, S. Kumar, and P. M. Stewart, Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"?, *Lancet* **349**(9060), 1210–1213 (Apr 1997).
- [61] S. J. Quirk, J. A. Slattery, and J. W. Funder, Epithelial and adipose cells isolated from mammary glands of pregnant and lactating rats differ in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity., *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **37**(4), 529–534 (Nov 1990).
- [62] J. W. Tomlinson, J. Moore, M. S. Cooper, I. Bujalska, M. Shahmanesh, C. Burt, A. Strain, M. Hewison, and P. M. Stewart, Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines., *Endocrinology* **142**(5), 1982–1989 (May 2001).
- [63] K. Handoko, K. Yang, B. Strutt, W. Khalil, and D. Killinger, Insulin attenuates the stimulatory effects of tumor necrosis factor alpha on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human adipose stromal cells., *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **72**(3-4), 163–168 (Mar 2000).
- [64] M. Friedberg, E. Zoumakis, N. Hiroi, T. Bader, G. P. Chrousos, and Z. Hochberg, Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in mature human subcutaneous adipocytes by hypothalamic messengers., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**(1), 385–393 (Jan 2003).
- [65] N. M. Morton, L. Ramage, and J. R. Seckl, Down-regulation of adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by high-fat feeding in mice: a potential adaptive mechanism counteracting metabolic disease., *Endocrinology* **145**(6), 2707–2712 (Jun 2004).

- [66] J. H. Goedecke, D. J. Wake, N. S. Levitt, E. V. Lambert, M. R. Collins, N. M. Morton, R. Andrew, J. R. Seckl, and B. R. Walker, Glucocorticoid metabolism within superficial subcutaneous rather than visceral adipose tissue is associated with features of the metabolic syndrome in South African women., *Clin Endocrinol (Oxf)* **65**(1), 81–87 (Jul 2006).
- [67] Z. Michailidou, M. D. Jensen, D. A. Dumesic, K. E. Chapman, J. R. Seckl, B. R. Walker, and N. M. Morton, Omental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity., *Obesity (Silver Spring)* **15**(5), 1155–1163 (May 2007).
- [68] I. J. Bujalska, S. Kumar, M. Hewison, and P. M. Stewart, Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase., *Endocrinology* **140**(7), 3188–3196 (Jul 1999).
- [69] S. K. Paulsen, S. B. Pedersen, S. Fisker, and B. Richelsen, 11Beta-HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization., *Obesity (Silver Spring)* **15**(8), 1954–1960 (Aug 2007).
- [70] H. J. Harwood, Jr, The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis., *Neuropharmacology* **63**(1), 57–75 (Jul 2012).
- [71] A. Tchernof and J.-P. Després, Pathophysiology of human visceral obesity: an update., *Physiological Reviews* **93**(1), 359–404 (Jan 2013).
- [72] R. S. Lindsay, D. J. Wake, S. Nair, J. Bunt, D. E. W. Livingstone, P. A. Permana, P. A. Tataranni, and B. R. Walker, Subcutaneous adipose 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic acid levels are associated with adiposity and insulinemia in Pima Indians and Caucasians., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**(6), 2738–2744 (Jun 2003).
- [73] K. Kannisto, K. H. Pietiläinen, E. Ehrenborg, A. Rissanen, J. Kaprio, A. Hamsten, and H. Yki-Järvinen, Overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 in adipose tissue is associated with acquired obesity and features of insulin resistance: studies in young adult monozygotic twins., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**(9), 4414–4421 (Sep 2004).
- [74] C. Veyrat-Durebex, N. Deblon, A. Caillon, R. Andrew, J. Altirriba, A. Odermatt, and F. Rohner-Jeanraud, Central glucocorticoid administration promotes weight gain and increased 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in white adipose tissue., *PLOS ONE* **7**(3), e34002 (2012).

- [75] H. Masuzaki and J. S. Flier, Tissue-specific glucocorticoid reactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1)—a promising drug target for the treatment of metabolic syndrome., *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **3**(4), 255–262 (Dec 2003).
- [76] E. Harno, E. C. Cottrell, B. G. Keevil, J. DeSchoolmeester, M. Bohlooly-Y, H. Andersén, A. V. Turnbull, B. Leighton, and A. White, 11-Dehydrocorticosterone causes metabolic syndrome, which is prevented when 11beta-HSD1 is knocked out in livers of male mice., *Endocrinology* **154**(10), 3599–3609 (Oct 2013).
- [77] Y. Kotelevtsev, M. C. Holmes, A. Burchell, P. M. Houston, D. Schmall, P. Jamieson, R. Best, R. Brown, C. R. Edwards, J. R. Seckl, and J. J. Mullins, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress., *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* **94**(26), 14924–14929 (Dec 1997).
- [78] S. A. Morgan, E. L. McCabe, L. L. Gathercole, Z. K. Hassan-Smith, D. P. Larner, I. J. Bujalska, P. M. Stewart, J. W. Tomlinson, and G. G. Lavery, 11beta-HSD1 is the major regulator of the tissue-specific effects of circulating glucocorticoid excess., *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* **111**(24), E2482–E2491 (Jun 2014).
- [79] R. Desbriere, V. Vuaroqueaux, V. Achard, S. Boullu-Ciocca, M. Labuhn, A. Dutour, and M. Grino, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients., *Obesity (Silver Spring)* **14**(5), 794–798 (May 2006).
- [80] O. Paulmyer-Lacroix, S. Boullu, C. Oliver, M.-C. Alessi, and M. Grino, Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87**(6), 2701–2705 (Jun 2002).
- [81] T. C. Sandeep, R. Andrew, N. Z. M. Homer, R. C. Andrews, K. Smith, and B. R. Walker, Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone., *Diabetes* **54**(3), 872–879 (Mar 2005).
- [82] S. Engeli, J. Böhnke, M. Feldpausch, K. Gorzelniak, U. Heintze, J. Janke, F. C. Luft, and A. M. Sharma, Regulation of 11beta-HSD genes in human adipose

- tissue: influence of central obesity and weight loss., *Obesity Research* **12**(1), 9–17 (Jan 2004).
- [83] B. Mlinar, J. Marc, M. Jensterle, E. V. Bokal, A. Jerin, and M. Pfeifer, Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in visceral and subcutaneous adipose tissues of patients with polycystic ovary syndrome is associated with adiposity., *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **123**(3-5), 127–132 (Feb 2011).
- [84] R. Baudrand, C. A. Carvajal, A. Riquelme, M. Morales, N. Solis, M. Pizarro, A. Escalona, C. Boza, G. Pérez, A. Domínguez, M. Arrese, and C. E. Fardella, Overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in hepatic and visceral adipose tissue is associated with metabolic disorders in morbidly obese patients., *Obesity Surgery* **20**(1), 77–83 (Jan 2010).
- [85] J. D. Smith, A.-L. Borel, J.-A. Nazare, S. M. Haffner, B. Balkau, R. Ross, C. Masien, N. Alméras, and J.-P. Després, Visceral adipose tissue indicates the severity of cardiometabolic risk in patients with and without type 2 diabetes: results from the INSPIRE ME IAA study., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**(5), 1517–1525 (May 2012).
- [86] A.-L. Borel, J.-A. Nazare, J. Smith, N. Alméras, A. Tremblay, J. Bergeron, P. Poirier, and J.-P. Després, Visceral and not subcutaneous abdominal adiposity reduction drives the benefits of a 1-year lifestyle modification program., *Obesity (Silver Spring)* **20**(6), 1223–1233 (Jun 2012).
- [87] D. B. Carr, K. M. Utzschneider, R. L. Hull, K. Kodama, B. M. Retzlaff, J. D. Brunzell, J. B. Shofer, B. E. Fish, R. H. Knopp, and S. E. Kahn, Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome., *Diabetes* **53**(8), 2087–2094 (Aug 2004).
- [88] C. Jang, V. R. Obeyesekere, R. J. Dilley, F. P. Alford, and W. J. Inder, 11Beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is expressed and is biologically active in human skeletal muscle., *Clin Endocrinol (Oxf)* **65**(6), 800–805 (Dec 2006).
- [89] C. B. Whorwood, S. J. Donovan, D. Flanagan, D. I. W. Phillips, and C. D. Byrne, Increased glucocorticoid receptor expression in human skeletal muscle cells may contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome., *Diabetes* **51**(4), 1066–1075 (Apr 2002).

- [90] C. B. Whorwood, S. J. Donovan, P. J. Wood, and D. I. Phillips, Regulation of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms and type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance?, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**(5), 2296–2308 (May 2001).
- [91] E. Itoh, K. Iida, D.-S. Kim, J. P. Del Rincon, K. T. Coschigano, J. J. Kopchick, and M. O. Thorner, Lack of contribution of 11betaHSD1 and glucocorticoid action to reduced muscle mass associated with reduced growth hormone action., *Growth Hormone and IGF Research* **14**(6), 462–466 (Dec 2004).
- [92] S. A. Morgan, M. Sherlock, L. L. Gathercole, G. G. Lavery, C. Lenaghan, I. J. Bujalska, D. Laber, A. Yu, G. Convey, R. Mayers, K. Hegyi, J. K. Sethi, P. M. Stewart, D. M. Smith, and J. W. Tomlinson, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle., *Diabetes* **58**(11), 2506–2515 (Nov 2009).
- [93] M. Zhang, X.-Y. Lv, J. Li, Z.-G. Xu, and L. Chen, Alteration of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skeletal muscle in a rat model of type 2 diabetes., *Molecular and Cellular Biochemistry* **324**(1-2), 147–155 (Apr 2009).
- [94] B. M. Abdallah, H. Beck-Nielsen, and M. Gaster, Increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in type 2 diabetic myotubes., *European Journal of Clinical Investigation* **35**(10), 627–634 (Oct 2005).
- [95] F. Salehzadeh, L. Al-Khalili, S. S. Kulkarni, M. Wang, F. Lönnqvist, and A. Krook, Glucocorticoid-mediated effects on metabolism are reversed by targeting 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human skeletal muscle., *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **25**(3), 250–258 (Mar 2009).
- [96] W. J. Inder, V. R. Obeyesekere, F. P. Alford, and C. Jang, Skeletal muscle 11betaHSD1 activity of nondiabetic subjects is unaltered in central obesity-associated insulin resistance., *Hormone and Metabolic Research* **43**(4), 257–260 (Apr 2011).
- [97] C. Jang, V. R. Obeyesekere, R. J. Dilley, Z. Krozowski, W. J. Inder, and F. P. Alford, Altered activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in skeletal muscle confers metabolic protection in subjects with type 2 diabetes., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**(8), 3314–3320 (Aug 2007).
- [98] R. M. Anderson and R. Weindruch, Calorie restriction: progress during mid-2005-mid-2006., *Experimental Gerontology* **41**(12), 1247–1249 (Dec 2006).

- [99] A. E. Civitarese, S. Carling, L. K. Heilbronn, M. H. Hulver, B. Ukropcova, W. A. Deutsch, S. R. Smith, E. Ravussin, and C. A. L. E. R. I. E. P. T. , Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans., *PLoS Medicine* **4**(3), e76 (Mar 2007).
- [100] W. Dong, M. K. Selgrade, I. M. Gilmour, R. W. Lange, P. Park, M. I. Luster, and F. W. Kari, Altered alveolar macrophage function in calorie-restricted rats., *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **19**(3), 462–469 (Sep 1998).
- [101] L. K. Heilbronn, L. de Jonge, M. I. Frisard, J. P. DeLany, D. E. Larson-Meyer, J. Rood, T. Nguyen, C. K. Martin, J. Volaufova, M. M. Most, F. L. Greenway, S. R. Smith, W. A. Deutsch, D. A. Williamson, E. Ravussin, and P. C. A. L. E. R. I. E. T. , Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial., *JAMA* **295**(13), 1539–1548 (Apr 2006).
- [102] J. O. Holloszy and L. Fontana, Caloric restriction in humans., *Experimental Gerontology* **42**(8), 709–712 (Aug 2007).
- [103] R. S. Sohal and R. Weindruch, Oxidative stress, caloric restriction, and aging., *Science* **273**(5271), 59–63 (Jul 1996).
- [104] C. C. Spaulding, R. L. Walford, and R. B. Effros, Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice., *Mechanisms of Ageing and Development* **93**(1-3), 87–94 (Feb 1997).
- [105] A. TANNENBAUM and H. SILVERSTONE, The influence of the degree of caloric restriction on the formation of skin tumors and hepatomas in mice., *Cancer Research* **9**(12), 724–727 (Dec 1949).
- [106] E. L. Goldberg, M. J. Romero-Aleshire, K. R. Renkema, M. S. Ventevogel, W. M. Chew, J. L. Uhrlaub, M. J. Smithey, K. H. Limesand, G. D. Sempowski, H. L. Brooks, and J. Nikolich-?ugich, Lifespan-extending caloric restriction or mTOR inhibition impair adaptive immunity of old mice by distinct mechanisms., *Aging Cell* **14**(1), 130–138 (Feb 2015).
- [107] M. Jové, A. Naudí, O. Ramírez-Núñez, M. Portero-Otín, C. Selman, D. J. Withers, and R. Pamplona, Caloric restriction reveals a metabolomic and lipidomic signature in liver of male mice., *Aging Cell* **13**(5), 828–837 (Oct 2014).

- [108] C. M. McCay, M. F. Crowell, and L. A. Maynard, The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935., *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.) **5**, 155–71; discussion 172 (1989).
- [109] R. W. Powers, M. Kaeberlein, S. D. Caldwell, B. K. Kennedy, and S. Fields, Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling., *Genes & development* **20**, 174–184 (Jan 2006).
- [110] M. Kaeberlein, R. W. Powers, K. K. Steffen, E. A. Westman, D. Hu, N. Dang, E. O. Kerr, K. T. Kirkland, S. Fields, and B. K. Kennedy, Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients., *Science* (New York, N.Y.) **310**, 1193–1196 (Nov 2005).
- [111] N. D. Bonawitz, M. Chatenay-Lapointe, Y. Pan, and G. S. Shadel, Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression., *Cell metabolism* **5**, 265–277 (Apr 2007).
- [112] L. Partridge, M. D. W. Piper, and W. Mair, Dietary restriction in *Drosophila*., *Mechanisms of ageing and development* **126**, 938–950 (Sep 2005).
- [113] R. J. Colman, R. M. Anderson, S. C. Johnson, E. K. Kastman, K. J. Kosmatka, T. M. Beasley, D. B. Allison, C. Cruzen, H. A. Simmons, J. W. Kemnitz, and R. Weindruch, Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys., *Science* **325**(5937), 201–204 (Jul 2009).
- [114] J. A. Mattison, G. S. Roth, T. M. Beasley, E. M. Tilmont, A. M. Handy, R. L. Herbert, D. L. Longo, D. B. Allison, J. E. Young, M. Bryant, D. Barnard, W. F. Ward, W. Qi, D. K. Ingram, and R. de Cabo, Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study., *Nature* **489**(7415), 318–321 (Sep 2012).
- [115] J. F. Trepanowski, R. E. Canale, K. E. Marshall, M. M. Kabir, and R. J. Bloomer, Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings., *Nutrition Journal* **10**, 107 (2011).
- [116] E. J. Masoro, Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms., *Biochimica et Biophysica Acta* **1790**(10), 1040–1048 (Oct 2009).

- [117] S.-i. Imai, SIRT1 and caloric restriction: an insight into possible trade-offs between robustness and frailty., *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **12**(4), 350–356 (Jul 2009).
- [118] D. L. Smith, Jr, T. R. Nagy, and D. B. Allison, Calorie restriction: what recent results suggest for the future of ageing research., *European Journal of Clinical Investigation* **40**(5), 440–450 (May 2010).
- [119] A. Macciò and C. Madeddu, Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications., *TheScientificWorldJournal* **11**, 2020–2036 (2011).
- [120] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance., *Science* **259**(5091), 87–91 (Jan 1993).
- [121] R. Feinstein, H. Kanety, M. Z. Papa, B. Lunenfeld, and A. Karasik, Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates., *The Journal of biological chemistry* **268**, 26055–26058 (Dec 1993).
- [122] H. Kolb and T. Mandrup-Poulsen, An immune origin of type 2 diabetes?, *Diabetologia* **48**, 1038–1050 (Jun 2005).
- [123] J. C. Pickup and M. A. Crook, Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?, *Diabetologia* **41**, 1241–1248 (Oct 1998).
- [124] C. Finelli, L. Sommella, S. Gioia, N. La Sala, and G. Tarantino, Should visceral fat be reduced to increase longevity?, *Ageing Research Reviews* **12**(4), 996–1004 (Sep 2013).
- [125] S. L. Norris, X. Zhang, A. Avenell, E. Gregg, B. Bowman, M. Serdula, T. J. Brown, C. H. Schmid, and J. Lau, Long-term effectiveness of lifestyle and behavioral weight loss interventions in adults with type 2 diabetes: a meta-analysis., *American Journal of Medicine* **117**(10), 762–774 (Nov 2004).
- [126] D. J. Goldstein, Beneficial health effects of modest weight loss., *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **16**(6), 397–415 (Jun 1992).
- [127] L. Bevilacqua, J. J. Ramsey, K. Hagopian, R. Weindruch, and M.-E. Harper, Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production., *American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism* **286**(5), E852–E861 (May 2004).

- [128] K. Hagopian, M.-E. Harper, J. J. Ram, S. J. Humble, R. Weindruch, and J. J. Ramsey, Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria., *American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism* **288**(4), E674–E684 (Apr 2005).
- [129] D.-H. Hyun, S. S. Emerson, D.-G. Jo, M. P. Mattson, and R. de Cabo, Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging., *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* **103**(52), 19908–19912 (Dec 2006).
- [130] T. A. Zainal, T. D. Oberley, D. B. Allison, L. I. Szwedda, and R. Weindruch, Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle., *FASEB Journal* **14**(12), 1825–1836 (Sep 2000).
- [131] Y. J. Kim, H. J. Kim, J. K. No, H. Y. Chung, and G. Fernandes, Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction., *Life Sciences* **78**(21), 2523–2532 (Apr 2006).
- [132] L. Fontana, The scientific basis of caloric restriction leading to longer life., *Curr Opin Gastroenterol* **25**(2), 144–150 (Mar 2009).
- [133] L. Fontana, T. E. Meyer, S. Klein, and J. O. Holloszy, Long-term low-calorie low-protein vegan diet and endurance exercise are associated with low cardiometabolic risk., *Rejuvenation research* **10**, 225–234 (Jun 2007).
- [134] L. L. Gathercole, G. G. Lavery, S. A. Morgan, M. S. Cooper, A. J. Sinclair, J. W. Tomlinson, and P. M. Stewart, 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1: translational and therapeutic aspects., *Endocrine Reviews* **34**(4), 525–555 (Aug 2013).
- [135] C. A. Staab and E. Maser, 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation., *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **119**(1-2), 56–72 (Mar 2010).
- [136] H. Masuzaki, J. Paterson, H. Shinyama, N. M. Morton, J. J. Mullins, J. R. Seckl, and J. S. Flier, A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome., *Science* **294**(5549), 2166–2170 (Dec 2001).
- [137] N. M. Morton, J. M. Paterson, H. Masuzaki, M. C. Holmes, B. Staels, C. Fievet, B. R. Walker, J. S. Flier, J. J. Mullins, and J. R. Seckl, Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice., *Diabetes* **53**(4), 931–938 (Apr 2004).

- [138] J. P. Stegk, B. Ebert, H.-J. Martin, and E. Maser, Expression profiles of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and type 2 in inflammatory bowel diseases., *Molecular and Cellular Endocrinology* **301**(1-2), 104–108 (Mar 2009).
- [139] B. R. Walker, Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obesity: cause or consequence?, *Growth Hormone and IGF Research* **11 Suppl A**, S91–S95 (Jun 2001).
- [140] M. Wamil and J. R. Seckl, Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target., *Drug Discov Today* **12**(13-14), 504–520 (Jul 2007).
- [141] C. Nebendahl, R. Krüger, S. Görs, E. Albrecht, K. Martens, S. Hennig, N. Storm, W. Höppner, R. Pfuhl, B. U. Metzler-Zebeli, H. M. Hammon, and C. C. Metges, Effects on transcriptional regulation and lipid droplet characteristics in the liver of female juvenile pigs after early postnatal feed restriction and refeeding are dependent on birth weight., *PLOS ONE* **8**, e76705 (2013).
- [142] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (May 1976).
- [143] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* **227**(5259), 680–685 (Aug 1970).
- [144] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications., *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* **76**(9), 4350–4354 (Sep 1979).
- [145] K. Giller, P. Huebbe, S. Hennig, J. Dose, K. Pallauf, F. Doering, and G. Rimbach, Beneficial effects of a 6-month dietary restriction are time-dependently abolished within 2 weeks or 6 months of refeeding-genome-wide transcriptome analysis in mouse liver., *Free Radic Biol Med* **61C**, 170–178 (Apr 2013).
- [146] K. Giller, P. Huebbe, F. Doering, K. Pallauf, and G. Rimbach, Major urinary protein 5, a scent communication protein, is regulated by dietary restriction and subsequent re-feeding in mice., *Proc Biol Sci* **280**(1757), 20130101 (2013).
- [147] A. Stomby, K. Simonyte, C. Mellberg, M. Ryberg, R. H. Stimson, C. Larsson, B. Lindahl, R. Andrew, B. R. Walker, and T. Olsson, Diet-induced weight loss

- has chronic tissue-specific effects on glucocorticoid metabolism in overweight postmenopausal women., *International journal of obesity* (2005) **39**, 814–819 (May 2015).
- [148] A. Blum, H. J. Martin, and E. Maser, Human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is enzymatically active in its nonglycosylated form., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**(2), 428–434 (Sep 2000).
- [149] V. Lakshmi and C. Monder, Purification and characterization of the corticosteroid 11 beta-dehydrogenase component of the rat liver 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex., *Endocrinology* **123**(5), 2390–2398 (Nov 1988).
- [150] E. Maser and G. Bannenberg, The purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from mouse liver microsomes., *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **48**(2-3), 257–263 (Feb 1994).
- [151] K. Aoki, M. Homma, T. Hirano, K. Oka, S. Satoh, K. Mukasa, S. Ito, and H. Sekihara, mRNA and enzyme activity of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 are elevated in C57BL/KsJ-db/db mice., *Life Sciences* **69**(21), 2543–2549 (Oct 2001).
- [152] N. M. Morton, M. C. Holmes, C. Fiévet, B. Staels, A. Tailleux, J. J. Mullins, and J. R. Seckl, Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice., *Journal of Biological Chemistry* **276**(44), 41293–41300 (Nov 2001).
- [153] Y. Liu, Y. Nakagawa, Y. Wang, R. Li, X. Li, T. Ohzeki, and T. C. Friedman, Leptin activation of corticosterone production in hepatocytes may contribute to the reversal of obesity and hyperglycemia in leptin-deficient ob/ob mice., *Diabetes* **52**(6), 1409–1416 (Jun 2003).
- [154] H. Masuzaki, H. Yamamoto, C. J. Kenyon, J. K. Elmquist, N. M. Morton, J. M. Paterson, H. Shinyama, M. G. F. Sharp, S. Fleming, J. J. Mullins, J. R. Seckl, and J. S. Flier, Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice., *Journal of Clinical Investigation* **112**(1), 83–90 (Jul 2003).
- [155] J. M. Paterson, N. M. Morton, C. Fievet, C. J. Kenyon, M. C. Holmes, B. Staels, J. R. Seckl, and J. J. Mullins, Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice.,

Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America **101**(18), 7088–7093 (May 2004).

- [156] V. S. Densmore, N. M. Morton, J. J. Mullins, and J. R. Seckl, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 induction in the arcuate nucleus by high-fat feeding: A novel constraint to hyperphagia?, *Endocrinology* **147**, 4486–4495 (Sept. 2006).
- [157] Z.-K. Wan, E. Chenail, J. Xiang, H.-Q. Li, M. Ipek, J. Bard, K. Svenson, T. S. Mansour, X. Xu, X. Tian, V. Suri, S. Hahm, Y. Xing, C. E. Johnson, X. Li, A. Qadri, D. Panza, M. Perreault, J. F. Tobin, and E. Saiah, Efficacious 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I inhibitors in the diet-induced obesity mouse model., *Journal of medicinal chemistry* **52**, 5449–5461 (Sept. 2009).
- [158] S. J. Y. Wang, S. Birtles, J. de Schoolmeester, J. Swales, G. Moody, D. Hislop, J. O’Dowd, D. M. Smith, A. V. Turnbull, and J. R. S. Arch, Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 reduces food intake and weight gain but maintains energy expenditure in diet-induced obese mice., *Diabetologia* **49**, 1333–1337 (June 2006).
- [159] M. M. Véniant, C. Hale, R. Komorowski, M. M. Chen, D. J. St Jean, C. Fotsch, and M. Wang, Time of the day for 11beta-HSD1 inhibition plays a role in improving glucose homeostasis in DIO mice., *Diabetes, obesity & metabolism* **11**, 109–117 (Feb. 2009).
- [160] J. Rosenstock, S. Banarer, V. A. Fonseca, S. E. Inzucchi, W. Sun, W. Yao, G. Hollis, R. Flores, R. Levy, W. V. Williams, J. R. Seckl, and R. Huber, The 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor INCB13739 improves hyperglycemia in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by metformin monotherapy., *Diabetes Care* **33**, 1516–1522 (July 2010).
- [161] P. U. Feig, S. Shah, A. Hermanowski-Vosatka, D. Plotkin, M. S. Springer, S. Donahue, C. Thach, E. J. Klein, E. Lai, and K. D. Kaufman, Effects of an 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, MK-0916, in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome., *Diabetes, obesity & metabolism* **13**, 498–504 (June 2011).
- [162] R. H. Stimson and B. R. Walker, The role and regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome., *Horm Mol Biol Clin Investig* **15**(2), 37–48 (Sep 2013).

- [163] H. Stambergová, L. Zemanová, T. Lundová, B. Malceková, A. Skarka, M. Safr, and V. Wsól, Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids?, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **155**, 112–119 (Jan. 2016).
- [164] D. E. Livingstone, C. J. Kenyon, and B. R. Walker, Mechanisms of dysregulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats., *Journal of Endocrinology* **167**(3), 533–539 (Dec 2000).
- [165] R. H. Stimson, A. M. Johnstone, N. Z. M. Homer, D. J. Wake, N. M. Morton, R. Andrew, G. E. Lobley, and B. R. Walker, Dietary macronutrient content alters cortisol metabolism independently of body weight changes in obese men., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**(11), 4480–4484 (Nov 2007).
- [166] E. Harno, E. C. Cottrell, A. Yu, J. DeSchoolmeester, P. M. Gutierrez, M. Denn, J. G. Swales, F. W. Goldberg, M. Bohlooly-Y, H. Andersén, M. J. Wild, A. V. Turnbull, B. Leighton, and A. White, 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1) inhibitors still improve metabolic phenotype in male 11beta-HSD1 knockout mice suggesting off-target mechanisms., *Endocrinology* **154**(12), 4580–4593 (Dec 2013).
- [167] G. G. Lavery, A. E. Zielinska, L. L. Gathercole, B. Hughes, N. Semjonous, P. Guest, K. Saqib, M. Sherlock, G. Reynolds, S. A. Morgan, J. W. Tomlinson, E. A. Walker, E. H. Rabbitt, and P. M. Stewart, Lack of significant metabolic abnormalities in mice with liver-specific disruption of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1., *Endocrinology* **153**(7), 3236–3248 (Jul 2012).
- [168] E. Hu, P. Liang, and B. M. Spiegelman, AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity., *Journal of Biological Chemistry* **271**(18), 10697–10703 (May 1996).
- [169] J. G. Neels and J. M. Olefsky, Inflamed fat: what starts the fire?, *Journal of Clinical Investigation* **116**(1), 33–35 (Jan 2006).
- [170] M. E. Trujillo, S. Sullivan, I. Harten, S. H. Schneider, A. S. Greenberg, and S. K. Fried, Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**(11), 5577–5582 (Nov 2004).
- [171] G. van Hall, A. Steensberg, M. Sacchetti, C. Fischer, C. Keller, P. Schjerling, N. Hiscock, K. Møller, B. Saltin, M. A. Febbraio, and B. K. Pedersen, Interleukin-6

- stimulates lipolysis and fat oxidation in humans., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**(7), 3005–3010 (Jul 2003).
- [172] M. Brönnegård, P. Arner, L. Hellström, G. Akner, and J. A. Gustafsson, Glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in different regions of human adipose tissue., *Endocrinology* **127**(4), 1689–1696 (Oct 1990).
- [173] A. Veilleux, C. Rhéaume, M. Daris, V. Luu-The, and A. Tchernof, Omental adipose tissue type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase oxoreductase activity, body fat distribution, and metabolic alterations in women., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**(9), 3550–3557 (Sep 2009).
- [174] J. M. Friedman and R. L. Leibel, Tackling a weighty problem., *Cell* **69**, 217–220 (Apr. 1992).
- [175] M. A. Pelleymounter, M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, and F. Collins, Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice., *Science (New York, N.Y.)* **269**, 540–543 (July 1995).
- [176] A. J. Drake, D. E. W. Livingstone, R. Andrew, J. R. Seckl, N. M. Morton, and B. R. Walker, Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high-fat feeding in Wistar rats., *Endocrinology* **146**(2), 913–919 (Feb 2005).
- [177] T. Y. Man, Z. Michailidou, A. Gokcel, L. Ramage, K. E. Chapman, C. J. Kenyon, J. R. Seckl, and N. M. Morton, Dietary manipulation reveals an unexpected inverse relationship between fat mass and adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1., *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**(6), E1076–E1084 (Jun 2011).
- [178] B. Mariniello, V. Ronconi, S. Rilli, P. Bernante, M. Boscaro, F. Mantero, and G. Giacchetti, Adipose tissue 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in obesity and Cushing’s syndrome., *European Journal of Endocrinology* **155**(3), 435–441 (Sep 2006).
- [179] C. Leyvraz, C. Verdumo, M. Suter, A. Paroz, J.-M. Calmes, P. M. Marques-Vidal, and V. Giusti, Changes in gene expression profile in human subcutaneous adipose tissue during significant weight loss., *Obes Facts* **5**(3), 440–451 (2012).
- [180] J. W. Tomlinson, B. Sinha, I. Bujalska, M. Hewison, and P. M. Stewart, Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue is not increased in human obesity., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87**(12), 5630–5635 (Dec 2002).

- [181] R. H. Stimson, J. Andersson, R. Andrew, D. N. Redhead, F. Karpe, P. C. Hayes, T. Olsson, and B. R. Walker, Cortisol release from adipose tissue by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in humans., *Diabetes* **58**(1), 46–53 (Jan 2009).
- [182] E. Maser and G. Bannenberg, The purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from mouse liver microsomes., *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **48**, 257–263 (Feb. 1994).
- [183] K. A. Hughes, K. N. Manolopoulos, J. Iqbal, N. L. Cruden, R. H. Stimson, R. M. Reynolds, D. E. Newby, R. Andrew, F. Karpe, and B. R. Walker, Recycling between cortisol and cortisone in human splanchnic, subcutaneous adipose, and skeletal muscle tissues in vivo., *Diabetes* **61**, 1357–1364 (Jun 2012).
- [184] K. Chapman, M. Holmes, and J. Seckl, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action., *Physiological Reviews* **93**(3), 1139–1206 (Jul 2013).
- [185] V. Lakshmi, R. R. Sakai, B. S. McEwen, and C. Monder, Regional distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain., *Endocrinology* **128**, 1741–1748 (Apr. 1991).
- [186] B. J. Waddell, S. Hisheh, Z. S. Krozowski, and P. J. Burton, Localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the male reproductive tract., *Endocrinology* **144**, 3101–3106 (July 2003).
- [187] R. M. Reynolds, K. E. Chapman, J. R. Seckl, B. R. Walker, P. M. McKeigue, and H. O. Lithell, Skeletal muscle glucocorticoid receptor density and insulin resistance., *JAMA* **287**, 2505–2506 (May 2002).
- [188] M. L. Fournier, A. Paulson, N. Pavelka, A. L. Mosley, K. Gaudenz, W. D. Bradford, E. Glynn, H. Li, M. E. Sardu, B. Fleharty, C. Seidel, L. Florens, and M. P. Washburn, Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin., *Molecular and cellular proteomics : MCP* **9**, 271–284 (Feb 2010).
- [189] J. R. Katz, V. Mohamed-Ali, P. J. Wood, J. S. Yudkin, and S. W. Coppack, An in vivo study of the cortisol-cortisone shuttle in subcutaneous abdominal adipose tissue., *Clinical endocrinology* **50**, 63–68 (Jan 1999).

- [190] R. Basu, R. J. Singh, A. Basu, E. G. Chittilapilly, M. C. Johnson, G. Toffolo, C. Cobelli, and R. A. Rizza, Obesity and type 2 diabetes do not alter splanchnic cortisol production in humans., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**(7), 3919–3926 (Jul 2005).
- [191] R. Basu, R. J. Singh, A. Basu, E. G. Chittilapilly, C. M. Johnson, G. Toffolo, C. Cobelli, and R. A. Rizza, Splanchnic cortisol production occurs in humans: evidence for conversion of cortisone to cortisol via the 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-hsd) type 1 pathway., *Diabetes* **53**, 2051–2059 (Aug. 2004).
- [192] A. C. Asmal, W. J. Butterfield, K. J. Collins, and J. D. Few, Arteriovenous studies on the uptake and metabolism of cortisol in human forearm., *Clinical science and molecular medicine* **47**, 345–358 (Oct 1974).
- [193] S. H. M. van Uum, A. R. M. M. Hermus, C. G. J. Sweep, B. R. Walker, H. A. Ross, P. W. de Leeuw, and J. W. M. Lenders, Short-term cortisol infusion in the brachial artery, with and without inhibiting 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, does not alter forearm vascular resistance in normotensive and hypertensive subjects., *European journal of clinical investigation* **32**, 874–881 (Dec. 2002).
- [194] Q. R. Ahmad, D. H. Nguyen, M. A. Wingerd, G. M. Church, and M. A. Steffen, Molecular weight assessment of proteins in total proteome profiles using 1D-PAGE and LC/MS/MS., *Proteome Sci* **3**(1), 6 (Jun 2005).
- [195] J. Ozols, Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase., *The Journal of biological chemistry* **270**, 2305–2312 (Feb. 1995).
- [196] A. K. Agarwal, T. Mune, C. Monder, and P. C. White, Mutations in putative glycosylation sites of rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase affect enzymatic activity., *Biochimica et biophysica acta* **1248**, 70–74 (Apr 1995).
- [197] E. Oken and M. W. Gillman, Fetal origins of obesity., *Obesity research* **11**, 496–506 (Apr 2003).
- [198] C. H. T. Tam, Y. Wang, J. Luan, H. M. Lee, A. O. Y. Luk, G. E. Tutino, P. C. Y. Tong, G. T. C. Ko, R. Ozaki, W. H. Tam, A. P. S. Kong, W. Y. So, J. C. N. Chan, and R. C. W. Ma, Non-linear relationship between birthweight and cardiometabolic risk factors in Chinese adolescents and adults., *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **32**, 220–225 (Feb 2015).

- [199] D. J. P. Barker, The developmental origins of chronic adult disease., *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992). Supplement **93**, 26–33 (Dec 2004).
- [200] R. Pasquali, V. Vicennati, M. Cacciari, and U. Pagotto, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome., *Annals of the New York Academy of Sciences* **1083**, 111–128 (Nov. 2006).
- [201] E. Kanitz, W. Otten, M. Tuchscherer, M. Gräbner, K.-P. Brüßow, C. Rehfeldt, and C. C. Metges, High and low protein? carbohydrate dietary ratios during gestation alter maternal-fetal cortisol regulation in pigs., *PLOS ONE* **7**(12), e52748 (2012).
- [202] L. Jacobson, D. Zurakowski, and J. A. Majzoub, Protein malnutrition increases plasma adrenocorticotropin and anterior pituitary proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the rat., *Endocrinology* **138**(3), 1048–1057 (Mar 1997).
- [203] X. Belda, S. Ons, J. Carrasco, and A. Armario, The effects of chronic food restriction on hypothalamic-pituitary-adrenal activity depend on morning versus evening availability of food., *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **81**(1), 41–46 (May 2005).
- [204] C. C. Metges, S. Görs, K. Martens, R. Krueger, B. U. Metzler-Zebeli, C. Nebendahl, W. Otten, E. Kanitz, A. Zeyner, H. M. Hammon, R. Pfuhl, and G. Nürnberg, Body composition and plasma lipid and stress hormone levels during 3 weeks of feed restriction and refeeding in low birth weight female pigs., *Journal of animal science* **93**, 999–1014 (Mar. 2015).
- [205] M. E. Spurlock and N. K. Gabler, The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome., *Journal of Nutrition* **138**(2), 397–402 (Feb 2008).
- [206] R. A. S. Schweizer, M. Zürcher, Z. Balazs, B. Dick, and A. Odermatt, Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: species-specific differences between the rat, human, and hamster enzyme., *The Journal of biological chemistry* **279**, 18415–18424 (Apr. 2004).
- [207] J. W. Tomlinson, J. S. Moore, P. M. S. Clark, G. Holder, L. Shakespeare, and P. M. Stewart, Weight loss increases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in human adipose tissue., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**(6), 2711–2716 (Jun 2004).

- [208] J. Q. Purnell, S. E. Kahn, M. H. Samuels, D. Brandon, D. L. Loriaux, and J. D. Brunzell, Enhanced cortisol production rates, free cortisol, and 11beta-HSD-1 expression correlate with visceral fat and insulin resistance in men: effect of weight loss., *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **296**, E351–E357 (Feb. 2009).
- [209] K. Simonyte, T. Olsson, I. Näslund, J.-E. Angelhed, L. Lönn, C. Mattsson, and E. Rask, Weight loss after gastric bypass surgery in women is followed by a metabolically favorable decrease in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in subcutaneous adipose tissue., *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **95**, 3527–3531 (July 2010).
- [210] J. K. Dowman, L. J. Hopkins, G. M. Reynolds, M. J. Armstrong, M. Nasiri, N. Nikolaou, E. L. A. F. van Houten, J. A. Visser, S. A. Morgan, G. G. Lavery, A. Oprescu, S. G. Hübscher, P. N. Newsome, and J. W. Tomlinson, Loss of 5alpha-reductase type 1 accelerates the development of hepatic steatosis but protects against hepatocellular carcinoma in male mice., *Endocrinology* **154**, 4536–4547 (Dec. 2013).
- [211] R. Upreti, K. A. Hughes, D. E. W. Livingstone, C. D. Gray, F. C. Minns, D. P. Macfarlane, I. Marshall, L. H. Stewart, B. R. Walker, and R. Andrew, 5alpha-reductase type 1 modulates insulin sensitivity in men., *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **99**, E1397–E1406 (Aug. 2014).
- [212] A. Napolitano, M. W. Voice, C. R. Edwards, J. R. Seckl, and K. E. Chapman, 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in adipocytes: expression is differentiation-dependent and hormonally regulated., *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **64**(5-6), 251–260 (Mar 1998).
- [213] D. J. Wake, N. Z. M. Homer, R. Andrew, and B. R. Walker, Acute in vivo regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity by insulin and intralipid infusions in humans., *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**, 4682–4688 (Nov. 2006).
- [214] R. H. Stimson, N. A. Mohd-Shukri, J. L. Bolton, R. Andrew, R. M. Reynolds, and B. R. Walker, The postprandial rise in plasma cortisol in men is mediated by macronutrient-specific stimulation of adrenal and extra-adrenal cortisol production., *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **99**, 160–168 (Jan. 2014).

- [215] M. Nixon, D. J. Wake, D. E. Livingstone, R. H. Stimson, C. L. Esteves, J. R. Seckl, K. E. Chapman, R. Andrew, and B. R. Walker, Salicylate downregulates 11beta-HSD1 expression in adipose tissue in obese mice and in humans, mediating insulin sensitization., *Diabetes* **61**(4), 790–796 (Apr 2012).
- [216] M. L. Dansinger, J. A. Gleason, J. L. Griffith, H. P. Selker, and E. J. Schaefer, Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone diets for weight loss and heart disease risk reduction: a randomized trial., *JAMA* **293**(1), 43–53 (Jan 2005).
- [217] J. D. Douketis, C. Macie, L. Thabane, and D. F. Williamson, Systematic review of long-term weight loss studies in obese adults: clinical significance and applicability to clinical practice., *International journal of obesity (2005)* **29**, 1153–1167 (Oct. 2005).
- [218] A. R. Walker, Obesity: a time bomb to be defused., *Lancet (London, England)* **352**, 912 (Sept. 1998).
- [219] J. D. Douketis, J. W. Feightner, J. Attia, and W. F. Feldman, Periodic health examination, 1999 update: 1. Detection, prevention and treatment of obesity. Canadian Task Force on Preventive Health Care., *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **160**, 513–525 (Feb. 1999).
- [220] Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults., *The American journal of clinical nutrition* **68**, 899–917 (Oct. 1998).
- [221] R. L. Leibel, M. Rosenbaum, and J. Hirsch, Changes in energy expenditure resulting from altered body weight., *New England Journal of Medicine* **332**(10), 621–628 (Mar 1995).
- [222] E. Doucet, S. St-Pierre, N. Alm eras, J. P. Despr es, C. Bouchard, and A. Tremblay, Evidence for the existence of adaptive thermogenesis during weight loss., *British Journal of Nutrition* **85**(6), 715–723 (Jun 2001).
- [223] A. G. Dulloo, J. Jacquet, and J.-P. Montani, Pathways from weight fluctuations to metabolic diseases: focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat., *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **26 Suppl 2**, S46–S57 (Sep 2002).

- [224] S. C. Langley-Evans, Developmental programming of health and disease., Proceedings of the Nutrition Society **65**(1), 97–105 (Feb 2006).
- [225] S. N. Blair, J. Shaten, K. Brownell, G. Collins, and L. Lissner, Body weight change, all-cause mortality, and cause-specific mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial., Annals of Internal Medicine **119**(7 Pt 2), 749–757 (Oct 1993).
- [226] C. N. Hales and D. J. Barker, Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis., Diabetologia **35**(7), 595–601 (Jul 1992).
- [227] J. DeSchoolmeester, J. Palming, T. Persson, M. J. Pereira, E. Wallerstedt, H. Brown, D. Gill, F. Renström, M. Lundgren, M. K. Svensson, A. Rees, and J. W. Eriksson, Differences between men and women in the regulation of adipose 11beta-HSD1 and in its association with adiposity and insulin resistance., Diabetes, obesity and metabolism **15**, 1056–1060 (Nov 2013).

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Christine Sabine Lörz
Dorfstraße 20
21614 Buxtehude

Geburtstag: 18. Februar 1985
Geburtsort: Hannover
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul- und Hochschulausbildung

Oktober 2011- April 2017

Promotion im Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zum Thema „Regulation der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 im Verlauf einer Kalorienrestriktion“

September 2010 - Juli 2011

Diplomarbeit im Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zum Thema „Studien zur Hemmung der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 durch Pflanzenextrakte“

April 2008 - August 2010

Hauptstudium im Fach Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Oktober 2005 - März 2008

Grundstudium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juli 2005

Abitur am Fachgymnasium Bremervörde

„Peer-reviewed“ Original-Arbeiten

- Loerz C, Staab-Weijnitz C, Huebbe P, Giller K, Metges C, Rimbach G, Maser E (2017). Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 following caloric restriction and re-feeding is species dependent. Chem.-Biol. 2017 Feb 27. doi.org/10.1016/j.cbi.2017.02.018
- Hintzpeter J, Stapelfeld C, Loerz C, Martin MJ, Maser E (2014). Green Tea and one of its constituents, Epigallocatechine-3-gallate, are potent inhibitors of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. PLoS One. 2014 Jan 3;9(1):e84468. doi:10.1371/journal.pone.0084468.eCollection 2014.
- Blum A, Loerz C, Martin HJ, Staab-Weijnitz CA, Maser E (2012). Momordica charantia extract, a herbal remedy for type 2 diabetes, contains a specific 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor. J Steroid Biochem Mol Biol. 2012 Jan;128(1-2):51-5. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.09.003. Epub 2011 Oct 1.

Praktische Tätigkeit

09/2011- 03/2013

BMBF-Projekt: „Das Cortisol-aktivierende Enzym 11 β -HSD1 an der Schnittstelle zwischen Metabolischem Syndrom und Entzündung“

seit September 2011

Anstellung als wissenschaftliche Angestellte im Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel

Vorträge

18th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Barcelona 2016

„Does caloric restriction influence the expression of the cortisol-activating enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in glucocorticoid target tissues?“ (07/2016)

Posterpräsentationen

18th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Barcelona 2016

„Does caloric restriction influence the expression of the cortisol-activating enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in glucocorticoid target tissues?“ (07/2016)

DGPT Jahrestagung 2015, Kiel

„Monitoring 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 levels in mouse liver during caloric restriction“ (03/2015)

DGPT Jahrestagung 2013, Halle

„Assessment of 11 β -HSD1 levels in pig tissue during the course of caloric restriction“ (03/2013)

3. Statusseminar Ernährung (Ernährungsforschung des BMBF) 2012, Berlin

„The cortisol-activating enzyme 11 β -HSD1 at the interface between the metabolic syndrome and inflammation“ (11/2012)

16th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, Plön 2012

„Analysis of *HSD11B1* mRNA expression in pig tissues during caloric restriction“ (07/2012)

Kongressteilnahme (ohne Posterpräsentation)

DGPT Jahrestagung 2014, Hannover

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Edmund Maser für die Themenstellung und die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung am Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler durchzuführen. Vor allem aber bedanke ich mich für die Freiheiten, die er mir während der gesamten Zeit gewährte.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder möchte ich mich herzlich Bedanken für die Übernahme Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Jörg Martin, der mich in Detailfragen und bei der Ausgestaltung der Arbeit wesentlich unterstützte.

Danke an Frau Dr. Claudia Staab-Weijnitz, die mich in die Thematik dieser Arbeit einwies.

Frau MTLA Katrin Köbsch danke ich für ihre Einführung in das molekularbiologische Arbeiten und ihre Unterstützung während des praktischen Teils dieser Arbeit.

Frau Dipl.-Chemikerin Claudia Stapelfeld gilt ein großer Dank für ihren fachlichen und moralischen Beistand während der gesamten Doktorarbeit.

Dr. Bettina Ebert, Dr. Michael Kisiela und Dr. Jan Hintzpeter danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Ein großer Dank gilt meiner Freundin Dr. Petra Malátková für das Korrekturlesen und dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein Dankeschön an den gesamten Arbeitskreis für die tolle und unvergessliche Zeit zusammen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer für mich da ist.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit

„Regulation der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 im Verlauf einer Kalorienrestriktion“

nach Inhalt und Form, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, selbstständig von mir erstellt wurde und ihre Inhalte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden sind.

Diese Arbeit wurde weder vollständig noch in Teilen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, April 2017

Christine Sabine Lörz