

**Identifizierung potentieller Interaktionspartner der
Adiponectin Rezeptoren und Untersuchungen zur
Adiponectin-induzierten Genexpression in
Hepatozyten**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin der Universität
Regensburg**

vorgelegt von

Markus Neumeier aus Grafentraubach

März 2008

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2005 bis Februar 2008 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Univeritätsklinikums Regensburg unter der Anleitung von Frau PD. Dr. Christa Büchler.

Promotionsgesuch eingereicht am 18.02.2008

Kolloquium am 11.06.2008

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. Herbert Tschochner
	Erstgutachter:	Prof. Dr. Charalampos Aslanidis
	Zweitgutachter:	PD. Dr. Christa Büchler
	Dritter Prüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	ix
1	EINLEITUNG	1
1.1	Adipositas und das metabolische Syndrom	1
1.1.1	Das metabolische Syndrom	1
1.1.2	Medikamente zur Verbesserung der Insulinresistenz	1
1.1.2.1	Metabolische Effekte von Fenofibrat	2
1.1.2.2	Metabolische Effekte von Metformin	2
1.1.2.3	Metabolische Effekte von Glitazonen	2
1.1.3	Die Rolle des Fettgewebes im Metabolismus	3
1.2	Das Adipokin Adiponectin	5
1.2.1	Synthese und Struktur von Adiponectin	5
1.2.1.1	Synthese von Adiponectin	5
1.2.1.2	Struktur von Adiponectin	6
1.2.1.3	Adiponectinisoformen	6
1.2.2	Korrelation des systemischen Adiponectin mit dem BMI, der Insulinresistenz und der Leberfunktion	8
1.2.2.1	Assoziation von systemischen Adiponectin zum BMI und der Insulinresistenz	8
1.2.2.2	Korrelation von Adiponectin zu Lipoproteinen	8
1.2.2.3	Assoziation von Adiponectin und der Leberfunktion	9
1.2.2.4	Protektive Effekte von Adiponectin im Tiermodell	10
1.3	Molekulare Charakterisierung der Adiponectin Rezeptoren	10
1.3.1	Identifizierung der Adiponectin Rezeptoren	10
1.3.1.1	Struktur der Adiponectin Rezeptoren	11
1.3.1.2	Expression und Regulation der Adiponectin Rezeptoren	11
1.3.1.3	Adiponectin Rezeptor Signaltransduktion	12
1.3.2	N-terminale Interaktion der Adiponectin Rezeptoren mit APPL1	13
1.4	Struktur und Funktion von PDZ Proteinen	14
1.5	Ziel dieser Arbeit	15

2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Enzyme, Antikörper und Peptide	20
2.1.4.1	Enzyme	20
2.1.4.2	Primäre Antikörper	20
2.1.4.3	Sekundäre Antikörper	21
2.1.4.4	Peptide	21
2.1.5	Kit-Systeme	22
2.1.6	Organismen	23
2.1.6.1	Eukaryontische Zellen	23
2.1.6.2	Bakterien	23
2.1.6.3	Hefen	23
2.1.7	Plasmide	24
2.1.8	Oligonukleotide und siRNA	24
2.1.8.1	Primer für Klonierungen	24
2.1.8.1.1	Oligonukleotide für DNA Amplifikation zur Expression in humanen Zellen	24
2.1.8.1.2	Oligonukleotide für Amplifikation zur Expression in Hefe Zellen	25
2.1.8.1.3	Oligonukleotide für Sequenzierungen	25
2.1.8.2	Oligonukleotide für LightCycler-Analysen	26
2.1.8.2.1	Oligonukleotide zur Amplifikation humaner Gene	26
2.1.8.2.2	Oligonukleotide zur Amplifikation muriner Gene	27
2.1.8.2.3	Oligonukleotide zur Amplifikation von Ratten-Genen	28
2.1.8.3	siRNA	28
2.1.9	Kulturmedien	29
2.1.9.1	Medien für eukaryontische Zellen	29
2.1.9.1.1	Medien für humane Zellen und Zelllinien	29
2.1.9.1.2	Medien für Hefen	29
2.1.9.2	Medien für <i>E.coli</i>	30
2.1.10	Puffer und Lösungen	30
2.1.10.1	Lösungen für Arbeiten mit DNA	31

2.1.10.2	Lösungen für Arbeiten mit RNA	31
2.1.10.3	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	31
2.1.10.3.1	Lösungen für SDS-PAGE	32
2.1.10.3.2	Lösungen für Western Blotting	33
2.1.10.3.3	Lösungen für ELISA	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Anzucht und Kultivierung von Zellen	35
2.2.1.1	Anzucht von <i>E.coli</i> -Bakterien	35
2.2.1.2	Aufzucht und Kultivierung von Hefen	35
2.2.1.3	Kultivierung humaner Zelllinien	35
2.2.1.4	Kultivierung primärer humaner Hepatozyten	36
2.2.2	Arbeiten mit DNA	36
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	36
2.2.2.2	Reinigung von DNA	37
2.2.2.2.1	Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen	37
2.2.2.2.2	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	37
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	37
2.2.2.4	Agarosegelelektrophorese	37
2.2.2.5	Inkubation mit Restriktionsenzymen	38
2.2.2.6	Inkubation mit alkalischer Phosphatase	38
2.2.2.7	Ligation	38
2.2.2.8	„TOPO TA“ Klonierung	39
2.2.2.9	Klonierung mit Hilfe der Cre-Rekombinase	39
2.2.2.10	Transformation von <i>E.coli</i>	41
2.2.2.11	Herstellung kompetenter Hefen und Transformation	41
2.2.2.12	Polymerase Chain Reaction (PCR)	41
2.2.2.13	Einfügen von Punktmutationen in Plasmid-DNA	42
2.2.2.14	DNA-Sequenzierung	42
2.2.2.15	Real-time RT-PCR	43
2.2.2.16	Transfektion von humanen Zelllinien mit Plasmiden	44
2.2.2.17	In vitro Translation	45
2.2.3	Arbeiten mit RNA	46
2.2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	46

2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA	46
2.2.3.3	Reverse Transkription	46
2.2.3.4	Transfektion von humanen Zellen und Zelllinien mit siRNA	47
2.2.4	Proteinchemische Methoden	48
2.2.4.1	Präparation von Gesamtproteinextrakten	48
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	48
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.2.4.4	Coomassie-Färbung	49
2.2.4.5	Western Blot	49
2.2.4.6	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	50
2.2.4.7	Koimmunpräzipitation	50
2.2.5	Generierung polyklonaler Anti-Adiponectin Rezeptor Antikörper	51
2.2.6	GeneChip Analysen Adiponectin-stimulierter primärer humaner Hepatozyten	51
2.2.7	Analysen zur Genexpression Adiponectin-stimulierter Zellen	51
2.2.8	Das Hefe Two Hybrid System	52
2.2.8.1	Screening einer <i>pretransformed MATCHMAKER cDNA Library</i>	52
2.2.9	Hybridisierung des <i>PDZ Domain Array IV</i>	54
2.2.10	Indirekte Immunfluoreszenz	54
2.2.11	Bestimmung des ApoA-I vermittelten Phospholipid und Cholesterin Efflux	55
2.2.12	Tiermodelle	55
2.2.12.1	Tiermodell für Leberzirrhose durch Gallengangsligatur	55
2.2.12.2	Tiermodell für Fettleber durch Hochfettdiät	56
2.2.12.3	Syntrophin Knock-out Mäuse und metabolische Versuche	56
2.2.13	Statistische Auswertungen	57
3	ERGEBNISSE	58
3.1	Einfluss von Adiponectin auf Hepatozyten	58
3.1.1	Stimulation primärer humaner Hepatozyten mit Adiponectin	58
3.1.2	Einfluss von HMW-Apm, AICAR, Metformin und Fenofibrat auf die Expression der Aldehydoxidase 1 (AOX1)	58
3.1.2.1	Regulation der AOX1 durch HMW-Apm	58
3.1.2.2	Regulation der AOX1 durch AICAR und Metformin	61
3.1.2.3	Regulation der AOX1 durch Fenofibrat	61

3.1.2.4	Einfluss des PPAR- α Inhibitors RU486 auf die Reduktion der AOX1 durch HMW-Apm	62
3.1.2.5	Expression der AOX1 in der Fettleber von Ratten	63
3.1.2.6	Einfluss von Palmitinsäure und Leptin auf die Regulation der AOX1	64
3.1.3	Regulation der ApoA-I, ApoB und ApoE Freisetzung in Hepatozyten durch Adiponectin	65
3.1.3.1	Einfluss von HMW-Apm auf die Expression und Aktivität von ABCA1 in humanen Hepatozyten	65
3.1.3.2	ApoA-I wird durch HMW-Apm in primären Hepatozyten nicht induziert	66
3.1.3.3	HMW-Apm reduziert die hepatische ApoB Sekretion	67
3.1.3.4	HMW-Apm reduziert HNF4- α und HNF4- α regulierte Gene in primären Hepatozyten	68
3.1.3.5	HMW-Apm reduziert die ApoE Freisetzung von primären Hepatozyten	70
3.2	Expression und Regulation der Adiponectin Rezeptoren in Hepatozyten, der Fettleber und der zirrhotischen Leber	73
3.2.1	Identifizierung des AdipoR2 als 43 kDa Protein	73
3.2.2	Expression und Regulation des AdipoR1 in humanen Hepatozyten	74
3.2.2.1	Generierung und Verwendung polyklonaler Anti-Adiponectin Rezeptor Antikörper	74
3.2.2.2	Expression von AdipoR1 in hepatozytären Zelllinien und primären Hepatozyten	75
3.2.2.3	Expression von AdipoR1 in verschiedenen Zelllinien und humanen Geweben	76
3.2.3	Regulation von AdipoR1 in humanen Hepatozyten	76
3.2.3.1	Regulation von AdipoR1 in HepG2 Zellen durch Glitazone	76
3.2.3.2	Regulation von AdipoR1 in Hepatozyten durch 9-cis-Retinsäure und 25-Hydroxycholesterin	77
3.2.3.3	Regulation von AdipoR1 in Hepatozyten durch Fenofibrat und HMW-Apm	78
3.2.4	Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell der Fettleber und der Leberzirrhose	79
3.2.4.1	Regulation von AdipoR1 und AdipoR2 durch Insulin und Leptin	79
3.2.4.2	Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell für Fettleber	80
3.2.4.3	Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell für Leberzirrhose	83

3.3	Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Adiponectin Rezeptoren	86
3.3.1	Auswahl geeigneter Bereiche für ein Hefe Two Hybrid Screening	86
3.3.2	Identifizierung Adiponectin Rezeptor interagierender Proteine und deren Verifizierung	86
3.3.2.1	C-terminale Interaktion von AdipoR1 und AdipoR2 mit β 2 Syntrophin	87
3.3.2.2	Verifikation der Interaktionen durch Kotransformationsexperimente	87
3.3.2.3	Verifizierung der Interaktion durch Hybridisierung des TransSignal PDZ Domänen Arrays	89
3.3.2.4	Verifikation der Interaktion durch Koimmunpräzipitation	90
3.3.2.5	Orientierung der Adiponectin Rezeptoren in der Plasmamembran	91
3.3.2.6	Kolokalisation der Adiponectin Rezeptoren mit den Syntrophinen	92
3.3.3	Einfluss von HMW-Apm auf die Expression von SNTA und SNTB2 in Hepatozyten	94
3.3.4	In vitro Untersuchungen zur Rolle von SNTA und SNTB2 in der Adiponectin Signaltransduktion	95
3.3.4.1	In vitro Untersuchungen zur Adiponectin Signaltransduktion in SNTA und SNTB2 siRNA behandelten Hepatozyten	95
3.3.5	Expression der Adiponectin Rezeptoren und Adiponectin regulierter Gene in der Leber von Syntrophin Knock-out Mäusen	98
3.3.5.1	Expression der Adiponectin Rezeptoren in den SNTA, SNTB2 und SNTA/B2 Knock-out Tieren	98
3.3.5.2	Expression von Adiponectin regulierten Genen in der Leber der Syntrophin Knock-out Tiere	99
3.3.6	Metabolische Charakterisierung der Syntrophin Knock-out Tiere	100
4	DISKUSSION	106
4.1	Einfluss von HMW-Apm auf Hepatozyten	106
4.1.1	HMW-Apm und Fenofibrat vermindern die hepatische Aldehydoxidase 1 (AOX1)	106
4.1.1.1	Physiologische und pathophysiologische Funktionen der AOX1	106
4.1.1.2	Rolle der AOX1 in der Fettleber	107

4.1.2	Regulation der ApoB und ApoE Freisetzung in Hepatozyten durch HMW-Apm	108
4.1.2.1	Einfluss von HMW-Apm auf die ApoB Sekretion	108
4.1.2.2	Regulation der ApoE Freisetzung und der zellulären Triglyzeride durch HMW-Apm	109
4.1.2.3	Effekt von Adiponectin auf die Funktion des hepatischen ABCA1	110
4.2	Expression und Regulation der Adiponectin Rezeptoren in Hepatozyten, der Fettleber und der zirrhotischen Leber	111
4.2.1	Identifizierung des AdipoR2 als 43 kDa Protein	111
4.2.2	Expression und Regulation von AdipoR1 in humanen Hepatozyten	111
4.2.2.1	Regulation von AdipoR1 durch Glitazone	111
4.2.2.2	Regulation von AdipoR1 durch RXR/LXR Liganden	112
4.2.2.3	Regulation von AdipoR1 durch Fenofibrat und HMW-Apm	112
4.2.3	Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell der Fettleber und der Leberzirrhose	113
4.2.3.1	Die Adiponectin Rezeptoren im Tiermodell der Fettleber	113
4.2.3.2	Adiponectin im Tiermodell für Fettleber	114
4.2.3.3	Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell für Leberzirrhose	114
4.3	Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Adiponectin Rezeptoren	116
4.3.1	Identifizierung und Verifikation von SNTA und SNTB2 als Interaktionspartner der beiden Adiponectin Rezeptoren	116
4.3.2	In Vitro Untersuchungen zur Rolle von SNTA und SNTB2 in der Adiponectin Signaltransduktion	117
4.3.3	Metabolische Untersuchungen in der Lebern von SNTA und SNTB2 Knock-out Mäusen	118
5	ZUSAMMENFASSUNG	121
6	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	124
6.1	Publikationen	124
6.1.1	Erstautorenschaften	124
6.1.2	Koautorenschaften	125

6.1.3	Eingereichte Publikationen	128
6.2	Kongressbeiträge	129
6.2.1	Vorträge	129
6.2.2	Poster	129
7	LITERATURVERZEICHNIS	134

Abkürzungsverzeichnis

25-OH	25-Hydroxycholesterin
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
9-cRA	9-cis-Retinsäure (<i>Retinoid Acid</i>)
ABCA1	<i>ATP Binding Cassette, Subfamily A, Member 1</i>
ABCB4	<i>ATP Binding Cassette Subfamily BA, Member 4</i>
abs.	Absolut
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACOX	Acyl-CoA Oxidase
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AdipoR1	Adiponectin Rezeptor 1
AdipoR2	Adiponectin Rezeptor 2
Amp	Ampicillin
AMPK	<i>Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
AOX1	Aldehydoxidase 1
Apm	Adiponectin
ApoB, E, A-I, A-II,	Apolipoproteine B, E, A-I, A-II
APPL1	<i>Adaptor Protein Containing Pleckstrin Homology Domain, Phosphotyrosine-Binding Domain and a Leucine Zipper Motif</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>Area under the Curve</i>)
BAR	<i>Bin-Amphysin-Rvs</i>
BCA	Bicinchronsäure (<i>-acid</i>)
BD	DNA Bindedomäne
BDL	Gallengangsligatur (<i>Bile Duct Ligation</i>)
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
ChREBP	<i>Carbohydrate Response Element Binding Protein</i>
CoA	Koenzym A

C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCL8	Interleukin 8
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii (lat.: und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
E _x	Extinktion bei Wellenlänge x
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FFA	freie Fettsäure (<i>Free Fatty Acid</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flot-1	Flotillin-1
Foxo1	<i>Forkhead Box O1A</i>
GIPC	<i>Gaip C-Terminus Interacting Proteine</i>
GLUT2, 4	Glukosetransporter 2, 4
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HF	Hochfettdiät
His	Histidin
HMW	<i>High Molecular Weight Form</i>
HNF4- α	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha</i>
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
Leu	Leucin
LKB1	Serin/Threonin Protein Kinase 11

LMW	<i>Low Molecular Weight Form</i>
loxP	<i>Locus of Crossing Over</i> im Genom des Bakteriophagen P1
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
mAB	monoklonaler Antikörper
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1 CCL2</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MMW	<i>Medium Molecular Weight Form</i>
mRNA	messenger RNA
NAFLD	<i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NO	Stickoxid
nNOS	neuronale Stickoxid Synthase
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
NZY	NZ-Amine und Yeast Extract
OCT1	<i>Organic Cation Transporter 1</i>
OD	optische Dichte
pAB	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDZ	<i>PSD-95/Disc-Large/ZO-1</i>
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR- α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha</i>
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
PTB	Phosphotyrosin Bindemotiv
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Umdrehungen (<i>rounds</i>) pro Minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SC	Standarddiät (<i>Standard Chow</i>)
SD	<i>Synthetic Defined</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNTA	alpha-Syntrophin
SNTB1	beta1-Syntrophin
SNTB2	beta2-Syntrophin
SREBP-1c	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c</i>
SU	<i>Syntrophin Unique</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Trispuffer (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylendiamin
TG	Triglyzerid
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl-) aminomethan
Trp	Tryptophan
U	<i>Unit</i>
ÜN	über Nacht
uni	Univers
UV	Ultraviolett
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Adipositas und das metabolische Syndrom

1.1.1 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom tritt vermehrt bei Männern in den westlichen Industrieländern auf, wobei eine durch übermäßige Nahrungsaufnahme bei geringer körperlicher Aktivität bedingte Fettleibigkeit ursächlich für die Pathophysiologie ist. Ein metabolisches Syndrom liegt vor, wenn drei der insgesamt fünf folgenden Risikofaktoren vorliegen: ausgeprägte abdominelle Fettleibigkeit, Bluthochdruck, Glukoseintoleranz oder Insulinresistenz und atherogene Dyslipidämie, vorliegen [1].

Eine vermehrte viszerale Fettansammlung ist assoziiert mit einer erhöhten Menge an zirkulierenden freien Fettsäuren die dann vermehrt in den peripheren Geweben abgelagert werden und dort zu einer verminderten Insulinsensitivität führen [2, 3]. Somit ist die Ablagerung von Fetten in den peripheren Geweben eine wesentliche Ursache für die Insulinresistenz. Medikamente, die eine vermehrte Speicherung von Lipiden im Fettgewebe bewirken, bzw. den Abbau der Lipide in den peripheren Geweben steigern, verbessern somit die Insulinresistenz.

1.1.2 Medikamente zur Verbesserung der Insulinresistenz

Zur Behandlung von Patienten mit einem metabolischen Syndrom stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung, die ihre Wirkung über die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege vermitteln. Die Fibrate sind Agonisten des *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha* (PPAR- α) und wirken durch die Stimulation der Fettsäureoxidation einer Dyslipidämie entgegen. Glitazone aktivieren den *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPAR- γ) wodurch die Fettzeldifferenzierung und die Speicherung der Triglyzeride im Fettgewebe stimuliert wird. Metformin schaltet als Aktivator der *Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase* (AMPK) viele ATP produzierende Prozesse wie die β -Oxidation an, wodurch die peripher abgelagerten Fettsäuren abgebaut werden [4].

1.1.2.1 Metabolische Effekte von Fenofibrat

Die Fibrate, wie z.B. Fenofibrat, können als kleine lipophile organische Moleküle die Plasmamembran durchqueren, und in den Zellkern gelangen, wo sie durch die Bindung an PPAR- α zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führen. Dadurch wird, neben vielen anderen Effekten, die Transkription der Lipoprotein Lipase und der Apolipoproteine A-I und A-II induziert [5], während die Expression von Apolipoprotein C-III [6] reduziert wird. Somit wird die Synthese von Triglyzeriden in der Leber reduziert und zugleich der Abbau triglyzeridreicher Lipoproteine wie LDL und VLDL induziert, was zu einem erhöhten HDL-Spiegel führt [7].

1.1.2.2 Metabolische Effekte von Metformin

Metformin ist eines der weltweit am häufigsten eingesetzten Medikamente zur Behandlung von Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus [8]. Die hauptsächlichen Effekte von Metformin werden über die Aktivierung der AMPK ausgeübt [9]. Die Aktivität der AMPK wird durch das zytosolische Verhältnis von AMP/ATP reguliert. AMP aktiviert dabei die AMPK zum einen allosterisch, zum anderen induziert AMP die Phosphorylierung der α -Untereinheit der AMPK und verhindert die Dephosphorylierung durch Phosphatasen [10]. Natürlicherweise wird die AMPK bei niedriger Energieladung der Zelle aktiviert. Diese Kinase unterdrückt energieverbrauchende Prozesse und induziert Stoffwechselwege die das Energieniveau der Zelle anheben. Die AMPK inhibiert die Transkriptionsfaktoren *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c* (SREBP-1c) und *Carbohydrate Response Element Binding Protein* (ChREBP) und die Enzyme Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und HMG-CoA-Reduktase wodurch die Fettsäure- und Cholesterinsynthese unterdrückt und die β -Oxidation induziert wird. Weiterhin reprimiert die AMPK die Expression der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) und der Glukose-6-Phosphatase wodurch die endogene Glukoseproduktion in Hepatozyten vermindert wird [11]. Metformin wirkt auf die AMPK nicht über die AMP/ATP Rate, sondern vermittelt seinen Effekt über die vorgeschaltete Kinase LKB1, wie Untersuchungen in LKB1 Knock-out Mäusen zeigen [8].

1.1.2.3 Metabolische Effekte von Glitazonen

Die Glitazone sind Agonisten des nukleären Rezeptors PPAR- γ , einem für die Adipogenese essentiellen Transkriptionsfaktors [12]. Diese bewirken nach Bindung an PPAR- γ eine

vermehrte Speicherung von Triglyzeriden im Fettgewebe was die periphere Insulinsensitivität erhöht.

Weiterhin wird die Expression des Glukose Transporters 4 (GLUT4), der es den Zellen erlaubt vermehrt Blutglukose aufzunehmen, erhöht wodurch der Blutglukosespiegel gesenkt wird [13, 14]. Eine weitere Wirkung der Glitazone ist die Reduzierung der systemischen Triglyzeride und eine Erhöhung von HDL [14].

Ein erst kürzlich beschriebener Effekt der Glitazone ist die Induktion der Adiponectinsynthese im Fettgewebe, die auch zu einer Erhöhung der systemischen Adiponectinspiegel führt [15]. Aus diesen Untersuchungen wurde gefolgert, dass ein Teil der protektiven Wirkung der Glitazone durch die vermehrte systemische Adiponectinmenge erklärt werden kann [16, 17].

1.1.3 Die Rolle des Fettgewebes im Metabolismus

Weißes Fettwebe erfüllt verschiedene physiologische Aufgaben. Es hat Stützfunktionen („Bauchfett“), dient als Energiespeicher (Speicherfett) und ist Herstellungsort verschiedenster Hormone, die als Adipokine bezeichnet werden. Das Fettgewebe setzt sich aus mehreren Zelltypen zusammen. Neben den reifen Adipozyten, die den Hauptteil des Fettgewebes ausmachen, findet man darin noch Prä-Adipozyten, Endothelzellen und Makrophagen [18] (Abbildung 1).

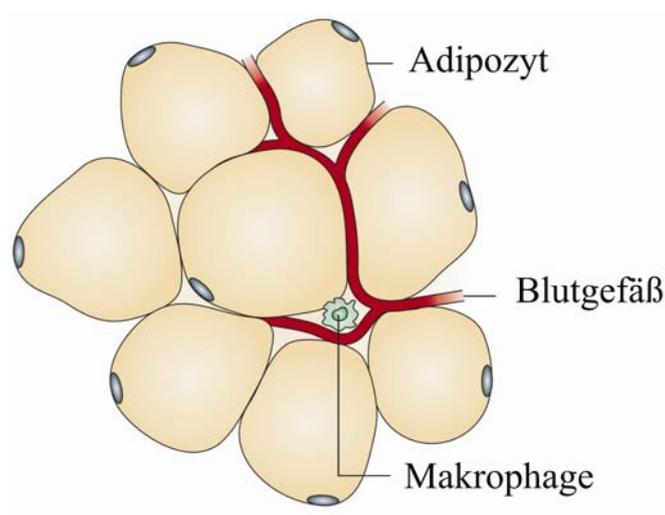


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fettgewebes [18].

Speicherfett findet sich vor allem unter der Haut (subkutan) und im Bauchraum (omental). Diese beiden Depots unterscheiden sich im Aufbau und der metabolischen Funktion, wobei vor allem die Zunahme an viszeralem Fettgewebe eine Verschlechterung der metabolischen Situation bewirkt. [19]. Dies erklärt sich durch eine vermehrte Lipolyse im viszeralem Fettgewebe wodurch vermehrt freie Fettsäuren direkt über die Portalvene in die Leber gelangen [20, 21]. In der Leber werden die freien Fettsäuren als Triglyzeride gespeichert und über das *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) in die Zirkulation freigesetzt. Dies führt systemisch zu einer Erhöhung des LDL und sekundär zu einer Reduktion von HDL. Die vermehrte Speicherung von Lipiden in der Leber resultiert in einer hepatischen Insulinresistenz und einem vermindertem Insulinabbau in der Leber, was zusammen mit der erhöhten Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle eine Hyperinsulinämie zur Folge hat. Die erhöhte Menge an systemischem Insulin aktiviert, trotz der hepatischen Insulinresistenz den Transkriptionsfaktor SREBP-1c und der hohe Blutglukosespiegel den Transkriptionsfaktor ChREBP, was zu einer erhöhten Synthese von freien Fettsäuren in der Leber führt, während gleichzeitig die β -Oxidation reprimiert wird [21, 22] (Abbildung 2).

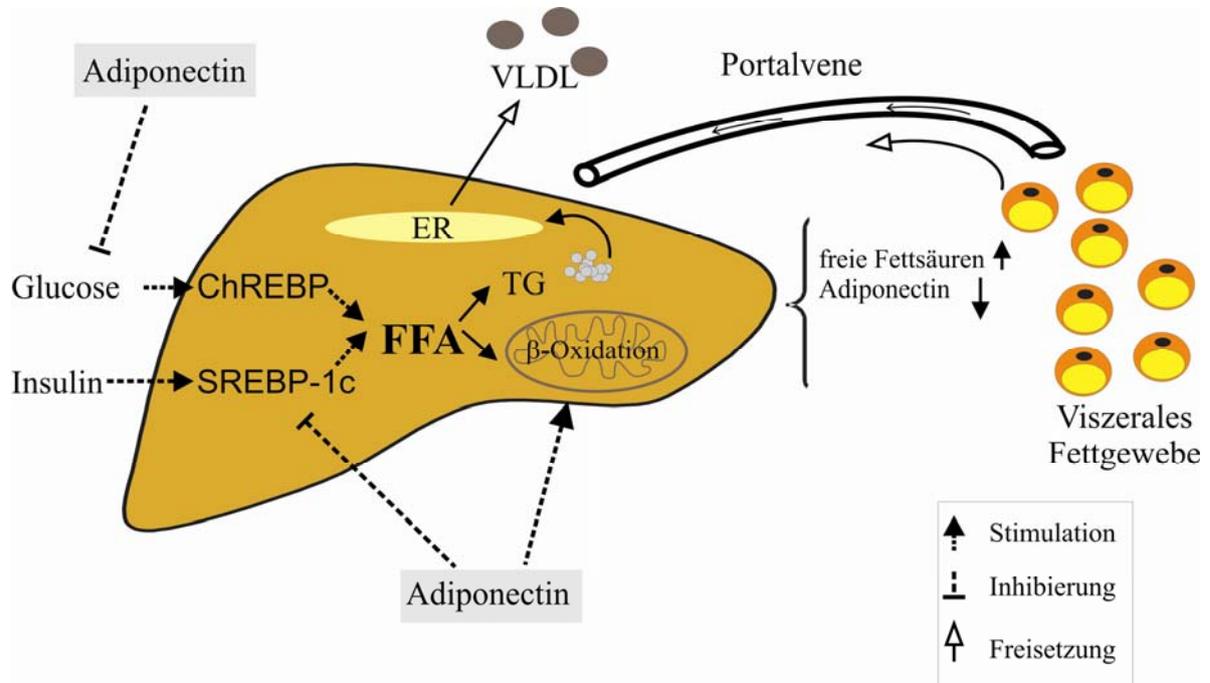


Abbildung 2: Der Einfluss von viszeralem Fettgewebe auf die Leber [21]. FFA, freie Fettsäure; TG, Triglyzerid; ER, endoplasmatisches Reticulum.

Das Fettgewebe stellt neben der dargestellten Funktion als Energiespeicher auch ein endokrines Organ dar und synthetisiert eine Vielzahl von metabolisch aktiven Substanzen,

die als Adipokine bezeichnet werden [23, 24]. Dazu zählen z.B. Interleukin -6 (IL-6), *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), Leptin, *Monocyte Chemoattractant Protein-1 CCL2* (MCP-1) und Adiponectin [25]. Dabei steht die Körperfettmasse in einem direkten Zusammenhang mit der Expression und Sekretion und dadurch auch mit der Serumkonzentration vieler Adipokine. Die meisten Adipokine zeigen eine positive Korrelation mit der Körperfettmasse, während Adiponectin als bisher einzig bekannte Ausnahme negativ dazu korreliert und somit die Konzentration von Adiponectin im Serum mit steigender Fettmasse abnimmt.

1.2 Das Adipokin Adiponectin

Das Adipokin Adiponectin wird ausschließlich von differenzierten Adipozyten im Fettgewebe sezerniert und ins Serum abgegeben [26]. Im Serum liegt Adiponectin mit 3 $\mu\text{g/ml}$ bis zu 30 $\mu\text{g/ml}$ in sehr hohen Mengen vor und stellt somit etwa 0,01 % der Gesamt-Proteinmenge im Serum dar [27]. Die Serumkonzentration von Adiponectin ist bei Adipositas, dem metabolischen Syndrom und Typ 2 Diabetes Mellitus erniedrigt. Eine Verminderung der Körperfettmasse führt zu einem Anstieg des Adiponectin Serumspiegels [28].

1.2.1 Synthese und Struktur von Adiponectin

Das humane Adiponectin (Acrp30, apM-1, AdipoQ, GBP28) ist ein ca. 30 kDa großes Protein, das spezifisch von Adipozyten sezerniert wird. Codiert wird dieses Protein vom Gen APM1, das sich auf dem Chromosom 3q27 befindet [29]. Das APM1 Gen besteht aus 3 Exonen, wobei nur Exon 2 und Exon 3 die Information für den codierenden Bereich des Adiponectins tragen [30].

1.2.1.1 Synthese von Adiponectin

Die Synthese von Adiponectin wird während der Differenzierung von Prä-Adipozyten zu reifen Adipozyten durch PPAR- γ induziert. Der Adiponectinspiegel im Serum und damit auch die Expression im Fettgewebe wird von verschiedenen Komponenten beeinflusst. Wie bereits erwähnt reduziert eine vermehrte Fettmasse die Expression von Adiponectin. Erklärt wird dies durch die erhöhte Synthese von IL-6 und TNF- α , die die Synthese von Adiponectin reprimieren [31]. Diese pro-inflammatorischen Zytokine sind ebenfalls mit der

Körperfettmasse assoziiert, im Gegensatz zu Adiponectin nimmt die Expression von IL-6 und TNF- α mit zunehmender Körperfettmasse zu [32] (Abbildung 3).

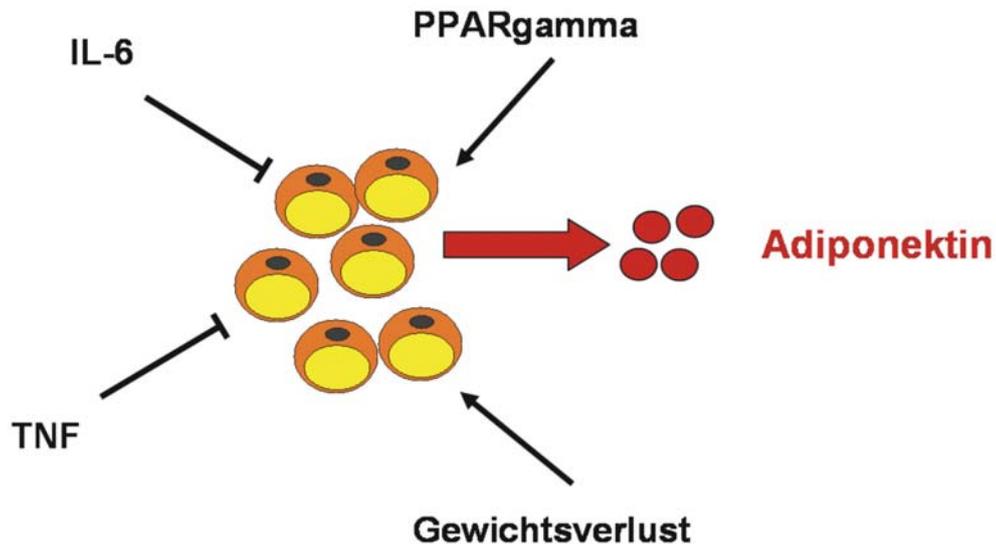


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Regulation der Adiponectinsynthese. \rightarrow fördert; \dashv reduziert.

1.2.1.2 Struktur von Adiponectin

Das humane Adiponectin ist ein 244 Aminosäuren langes Protein, wobei seine Domänenstruktur ähnlich der des Komplementfaktors C1q ist. Das Protein besteht aus einem Signalpeptid am N-Terminus gefolgt von 22 Kollagen-Tripelhelix Wiederholungen und einer globulären Domäne am C-Terminus [33]. Der globuläre Bereich weist eine hohe Homologie zu den globulären Domänen der Kollagene VIII und X auf [34] (Abbildung 4).



Abbildung 4: Schematischer Aufbau von Adiponectin.

1.2.1.3 Adiponectinisoformen

Das sezernierte Adiponectin kommt im humanen Serum als Homotrimer in der *Low Molecular Weight Form* (LMW), als Hexamer, bestehend aus zwei Homotrimeren in der *Medium Molecular Weight Form* (MMW) und als oligomere *High Molecular Weight Form*

(HMW), die aus vier bis sechs Homotrimeren besteht, vor [35]. Die Bildung der LMW Form wird durch die globuläre Domäne vermittelt, während die Formation der MMW und HMW Adiponectinisoformen durch Disulfidbrücken im Bereich der Kollagen-Domäne stabilisiert werden [36, 37]. Die Aktivität der höher molekularen Formen von Adiponectin wird weiterhin durch Hydroxylierungen und Glykosylierungen von Lysinen im Bereich der Kollagen-Domäne beeinflusst [38] (Abbildung 5).

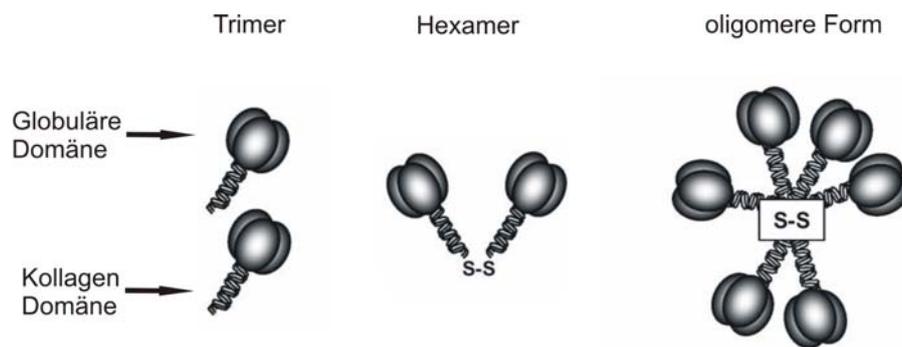


Abbildung 5: Schematische Darstellung der verschiedenen multimeren Isoformen von Adiponectin [39].

Um rekombinantes Adiponectin zu erhalten wurde das Protein von mehreren Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zellsystemen exprimiert. Die Expression von Adiponectin in *E.coli* liefert lediglich eine trimere Form, die durch inkorrekte Faltung und fehlende posttranslationale Modifikationen höchstwahrscheinlich inaktiv ist [37]. Die rekombinante Expression von Adiponectin in Zellen von höheren Eukaryonten hat den Vorteil, dass diese Zellen die für die korrekte Oligomerisierung erforderlichen Hydroxylierungen und Glykosylierungen durchführen und zur Ausbildung von Disulfidbrücken befähigt sind [40]. In den Überständen dieser Zellen konnten alle drei Adiponectinisoformen nachgewiesen werden [35].

Weiterhin zeigt sich, dass die verschiedenen Adiponectinisoformen sowohl gleiche, als auch für die jeweilige Isoform spezifische Effekte haben. So konnte an myeloiden Vorläuferzellen nachgewiesen werden, dass sowohl LMW- als auch HMW-Adiponectin die Apoptose dieser Zellen induzieren. In THP-1 Zellen wurde durch beide Isoformen die AMPK aktiviert, aber nur die LMW Form verringerte die Translokation von NF- κ B p65 in den Zellkern und reduzierte dadurch die Lipopolysaccharid stimulierte IL-6 und CXCL8 Sekretion. Die HMW Form hingegen induzierte die Sekretion von IL-6 und CXCL8 in Monozyten [35, 41, 42].

1.2.2 Korrelation des systemischen Adiponectin mit dem BMI, der Insulinresistenz und der Leberfunktion

1.2.2.1 Assoziation von systemischen Adiponectin zum BMI und der Insulinresistenz

Mehrere Publikationen zeigen einen reduzierten Adiponectinspiegel im Serum von Patienten mit Adipositas, metabolischem Syndrom oder Typ 2 Diabetes Mellitus [43]. Weiterhin wurde eine negative Korrelation zum Körperfett nachgewiesen [44]. Neben dem BMI besteht eine negative Korrelation von Adiponectin zu weiteren Parametern wie etwa Serumleptin-, Seruminsulin- und Nüchtern-Serumglukosespiegel unabhängig vom BMI [45].

Adiponectin im Serum zeigt eine negative Korrelation zur basalen und insulinabhängigen hepatischen Glukoneogenese [46]. So steht ein reduzierter Adiponectin Spiegel in direktem Zusammenhang mit einer verminderten hepatischen Insulinsensitivität [47].

Andererseits bewirkt eine Gewichtsreduktion um mehrere kg Körpergewicht eine Zunahme der Adiponectin mRNA Expression im Fettgewebe und einen darin resultierenden Anstieg der Serumkonzentration [48]. Diese Erhöhung der Adiponectin Spiegel ist sowohl bei der Gewichtsreduktion auf Grund einer bariatrischen Operation mit einem Magenbypass als auch durch Ernährungsumstellung zu beobachten [31, 49]. Neben der Erhöhung des systemischen Adiponectins verändert sich auch das Verhältnis der Adiponectinisoformen zum Gesamtadiponectin. Die Rate an HMW Adiponectin zu Gesamtadiponectin wird erhöht, während die Menge an LMW Adiponectin im Serum abnimmt [41].

1.2.2.2 Korrelation von Adiponectin zu Lipoproteinen

Adiponectin zeigt im Serum von Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus eine positive Korrelation zum HDL Spiegel. Diese Korrelation ist unabhängig von anthropometrischen und metabolischen Kovariablen wie etwa Geschlecht, Alter, BMI oder Nüchtern-Insulin Spiegel [50]. Weiterhin wurde in manchen Studien eine negative Korrelation von Adiponectin mit systemischen Triglyzeriden, LDL und zur Menge an ApoB und ApoE gezeigt [51].

1.2.2.3 Assoziation von Adiponectin und der Leberfunktion

Mehrere Studien zeigen eine negative Korrelation zwischen Adiponectin und Alanin- bzw. Aspartat-Aminotransferasen (als Marker der Leberfunktion) in gesunden Spendern [21, 52, 53]. Eine vermehrte Einlagerung von Fett in die Leber (hepatische Steatose) oder eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ist, unabhängig vom BMI, ebenfalls mit einem reduzierten Serumspiegel von Adiponectin assoziiert [21].

Mit zunehmenden Fibrosierungsgrad nimmt auch die Menge an Adiponectin ab [54]. In Patienten mit einer Leberzirrhose dagegen ist der Adiponectin Spiegel erhöht. Da die Leber am Abbau von Adiponectin beteiligt ist, könnte aufgrund der starken Schädigung dieses Organs eine verminderte hepatische Exkretion die erhöhten systemischen Adiponectinwerte erklären [54].

Molekular wurden mehrere Effekte von Adiponectin beschrieben. Einerseits vermindert Adiponectin die hepatische Glukoseproduktion und Fettsäuresynthese, während es die β -Oxidation stimuliert [21, 55]. Dies erklärt sich zum Teil durch die Inhibierung des Transkriptionsfaktors SREBP-1c. Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Adiponectin können außerdem die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine durch die Kupfferzellen unterdrücken [21, 56]. Weiterhin hemmt Adiponectin die Proliferation und Aktivierung von hepatischen Sternzellen, die als ursächlich für die Fibrosierung der Leber betrachtet werden. Diese Zellen produzieren extrazelluläre Matrixproteine und tragen so entscheidend zur Entstehung und Progression einer Leberfibrose bei [21, 57] (Abbildung 6).

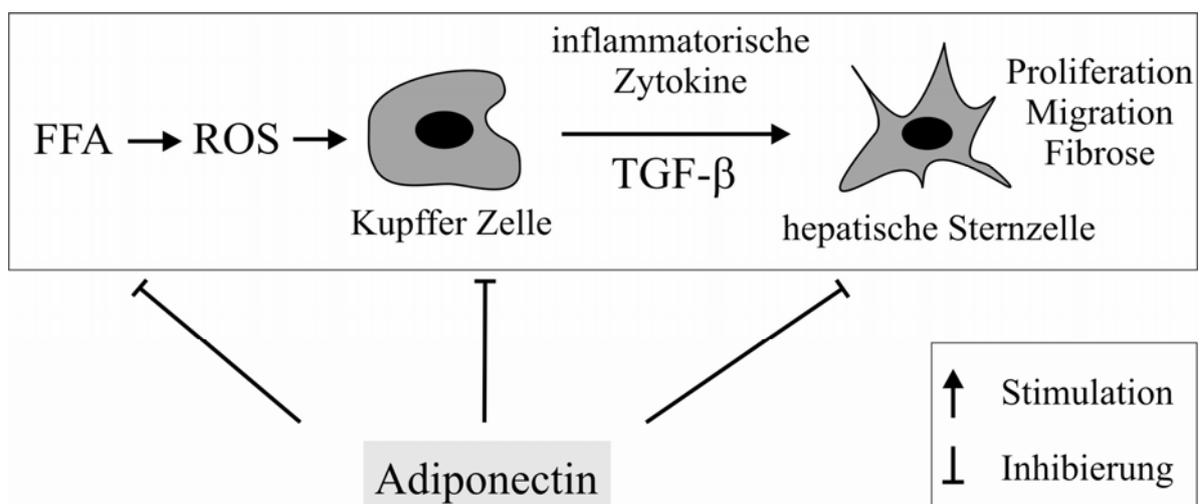


Abbildung 6: Protektive Eigenschaften von Adiponectin auf die Leberfunktion [21]. FFA, freie Fettsäure; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; TGF- β , *Transforming Growth Factor beta*.

1.2.2.4 Protektive Effekte von Adiponectin im Tiermodell

Die hepatoprotektiven Eigenschaften von Adiponectin wurden in verschiedenen Tiermodellen untersucht [58].

Die Adiponectin Knock-out Tiere unterscheiden sich hinsichtlich der Entwicklung einer Insulinresistenz phänotypisch von den Kontrolltieren. Es zeigen sich aber auch Unterschiede in Bezug auf den verwendeten Tierstamm. So entwickeln Adiponectin Knock-out Tiere, mit dem genetischen Hintergrund einer Kreuzung aus C57Bl/6 und 129/sv, bereits auf Standarddiät eine leichte Insulinresistenz [59]. Die Adiponectin Knock-out Tiere im Stamm C57Bl/6 entwickelt erst unter einer Hochfettdiät eine schwere Insulinresistenz, die sich in den Kontroll-ernährten Tieren nicht zeigt [60].

Der Effekt von Adiponectin wurde auch in Tieren, die auf Grund einer Mutation fettleibig sind und eine Insulinresistenz entwickeln, wie etwa die Leptin defiziente *ob/ob* Maus, untersucht. Die *ob/ob* Mäuse haben einen reduzierten Adiponectin Spiegel. Die Gabe von physiologischen Mengen Adiponectin reduziert in diesem Modell die Serumkonzentration an freien Fettsäuren, den Blutglukosespiegel und verbessert so die Insulinresistenz [58, 61].

Die *KK-A^y Obese* Maus, die adipös wird und einen Diabetes entwickelt, zeigt ebenfalls einen reduzierten Adiponectin Spiegel und eine verminderte Leberfunktion. Die Verabreichung von rekombinantem Adiponectin verbessert in diesen Tieren die Leberfunktion und vermindert die Nekrose und Apoptose von Hepatozyten [56]. In der Adiponectin Knock-out Maus (Stamm C57Bl/6) führt die Injektion von Tetrachlorkohlenstoff zu einer weitaus schwereren Leberfibrose als in Wildtyp Tieren [62]. Im selben Ansatz schützt adenoviral exprimiertes Adiponectin diese Tiere vor einer Tetrachlorkohlenstoff induzierten Leberfibrose.

1.3 Molekulare Charakterisierung der Adiponectin Rezeptoren

1.3.1 Identifizierung der Adiponectin Rezeptoren

In der Literatur sind drei Adiponectin Rezeptoren beschrieben. Neben AdipoR1 und AdipoR2 gilt T-Cadherin als weiterer Adiponectin Rezeptor, der aber ausschließlich HMW-Adiponectin bindet. T-Cadherin wird vor allem von Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert und scheint keine Bedeutung für die hepatischen Effekte von Adiponectin zu haben [63].

1.3.1.1 Struktur der Adiponectin Rezeptoren

Die Adiponectin Rezeptoren AdipoR1 (42 kDa) und AdipoR2 (35 kDa) wurden erstmals im Jahr 2003 von Yamauchi et al. beschrieben und zeigen auf Aminosäureebene eine 67%ige Homologie [64]. Beide Proteine gehören zu einer neuen Familie von Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die keine Homologie zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren aufweisen. In der Plasmamembran sind beide Rezeptoren so orientiert, dass der kurze C-Terminus extrazellulär und der wesentlich längere N-terminale Bereich intrazellulär liegt [64] (Abbildung 7).

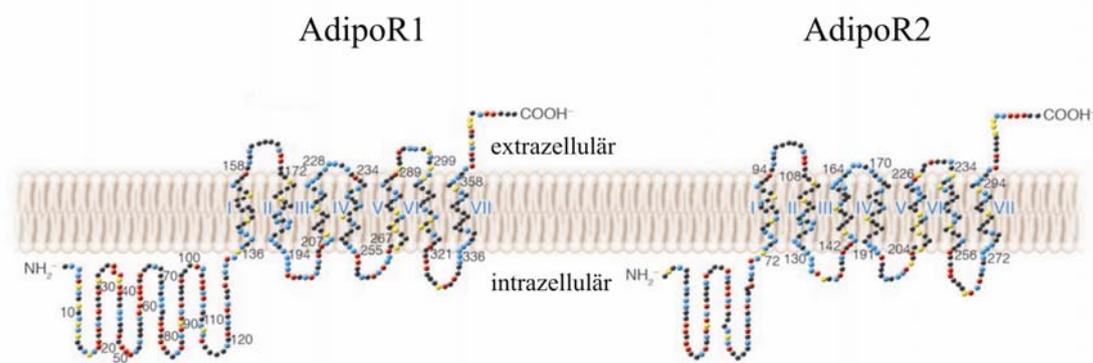


Abbildung 7: Topologie von AdipoR1 und AdipoR2 in der Plasmamembran [65].

Beide Adiponectin Rezeptoren binden Adiponectin, jedoch mit unterschiedlicher Affinität. So zeigt Adiponectin zu AdipoR2 eine höhere Bindungsaffinität als zu AdipoR1 [64].

1.3.1.2 Expression und Regulation der Adiponectin Rezeptoren

Die beiden Adiponectin Rezeptoren sind in Hepatozyten und hepatozytären Zelllinien exprimiert. Weitere Analysen zeigen, dass die Rezeptoren auf Muskelzellen, Adipozyten [66], Makrophagen [67], pankreatischen β -Zellen [68] hepatischen Sternzellen und Kupfferzellen nachgewiesen werden können [21].

Die Regulation von AdipoR1 und AdipoR2 wurde fast ausschließlich auf mRNA Ebene untersucht. So zeigen Tsuchida et al. [69] dass Insulin die mRNA Expression der beiden Adiponectin Rezeptoren über den *Forkhead Box O1A* (Foxo1) Weg in murinen Hepatozyten reprimiert. In humanen Hepatozyten hingegen führt Insulin nur zu einer reduzierten AdipoR2 mRNA Expression [70]. Die gleiche Studie zeigt, dass die hepatische AdipoR2 mRNA Expression bei Patienten mit nicht-alkoholischen Fettleber Erkrankung

(NAFLD) und im Besonderen bei Patienten mit einer Fettleber reduziert ist, während die Expression von AdipoR1 nicht verändert ist.

1.3.1.3 Adiponectin Rezeptor Signaltransduktion

Die spezifische Rolle von AdipoR1 und AdipoR2 in der Adiponectin Signaltransduktion der Leber wurde durch Überexpression der beiden Rezeptoren in der Leptinrezeptor defizienten *db/db* Maus, die eine verminderte Expression der beiden Rezeptoren zeigt, von Yamauchi et al. [71] untersucht. Eine Überexpression von AdipoR1 reduziert in diesem Modell die hepatische Glukoseproduktion durch Aktivierung des AMPK Signalweges und einer damit verbundenen Reduktion der Glukoneogeneseenzyme PEPCK und Glukose-6-Phosphatase. Die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors SREBP-1c wird ebenfalls über AdipoR1 inhibiert. Die Überexpression von AdipoR2 in dem Modell resultiert in einer gesteigerten Expression der Glukokinase, sowie von PPAR- α und den PPAR- α regulierten Genen Acetyl-CoA Oxidase und Uncoupling Protein 2, was zu einer erhöhten Fettsäureoxidation führt. Weiterhin hat die AdipoR2 Überexpression eine Reduktion von TNF- α und MCP-1 zur Folge, wodurch der oxidative Stress in der Leber verringert wird [71, 72].

Die AdipoR1 und AdipoR2 Knock-out Mäuse zeigen die gegenteiligen Effekte und bestätigen somit die physiologische Bedeutung von AdipoR1 und AdipoR2. Die AdipoR1 Knock-out Maus zeigt eine reduzierte Glukosetoleranz, eine Insulinresistenz und induzierte Expression der Glukoneogeneseenzyme. Die AdipoR2 Knock-out Maus hat lediglich erhöhte Insulinspiegel, während die AdipoR1/AdipoR2 Doppel-Knock-out Maus eine deutliche Glukoseintoleranz und einen erhöhten Insulinspiegel aufweist, was für eine Insulinresistenz spricht [71, 72]. Die Resultate werden von anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls AdipoR1 Knock-out Mäuse generierten, bestätigt [73, 74].

Zu den AdipoR2 Knock-out Mäusen finden sich unterschiedliche Ergebnisse. So wird von einer Arbeitsgruppe beschrieben, dass die AdipoR2 Knock-out Maus unter Hochfettdiät ein reduziertes Körpergewicht, eine verbesserte Insulinresistenz und Glukosetoleranz aufweist. Diese Mäuse werden jedoch unter einer Hochfettdiät diabetisch, da die pankreatischen β -Zellen weniger Insulin sezernieren [72, 73]. Die unterschiedlichen Resultate lassen sich vermutlich durch die verschiedenen genetischen Hintergründe der Knock-out Tiere erklären.

1.3.2 N-terminale Interaktion der Adiponectin Rezeptoren mit APPL1

Als erstes Adiponectin Rezeptor interagierendes Protein ist APPL1 (*Adaptor Protein Containing Pleckstrin Homology Domain, Phosphotyrosine-Binding Domain and a Leucine Zipper Motif*) identifiziert worden [75]. APPL1 ist ein 709 Aminosäure großes Protein mit unterschiedlichen Protein – Protein Interaktionsdomänen: einer *Pleckstrin Homology* (PH) Domäne, einem Phosphotyrosin Bindemotiv (PTB) und einer *Bin-Amphysin-Rvs* (BAR) Domäne [76]. Laut Mao et al. interagiert der N-Terminus des AdipoR1 mit der PTB Domäne von APPL1, wobei jedoch keine Tyrosin Phosphorylierung des Rezeptors erfolgt. Die Überexpression von APPL1 in C2C12 Myoblasten verstärkt die Wirkung von Adiponectin, während ein siRNA Knock-down von APPL1 die Adiponectin Wirkung reduziert. Der Knock-down von APPL1 zeigt weiterhin, dass dieses Protein wichtig für die Adiponectin stimulierte Phosphorylierung der AMPK und der ACC und somit für die Fettsäureoxidation und Glukoseaufnahme ist.

Adiponectin stimuliert die Assoziation von APPL1 und Rab5, wodurch die Translokation von GLUT4 an die Plasmamembran verstärkt wird. Allerdings führt die Überexpression von APPL1 unabhängig von Adiponectin zu einer verbesserten Insulinsensitivität in den Muskelzellen [75]. Im Gegensatz zu diesen Daten postuliert eine unlängst publizierte Arbeit, dass APPL1 an die Akt2 bindet und sowohl die Überexpression als auch der Knock-down von APPL1 die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme blockiert [77]. In einer weiteren Publikation zeigen Cheng und Kollegen, dass APPL1 in Endothelzellen die Adiponectin induzierte NO Synthese über die Bindung an AdipoR1 und AdipoR2 reguliert [78]. Neben der Akt2 sind als Interaktionspartner für APPL1 noch die katalytische p110 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [79], der *Follicle-Stimulating* Hormon Rezeptor [80] und der Androgen Rezeptor [81] beschrieben.

APPL1 und dessen Homologes APPL2 befinden sich auf den sogenannten *Signaling* Endosomen. *Epidermal Growth Factor* (EGF) und oxidativer Stress bewirken eine Translokation von APPL1 in den Zellkern, wo das Protein mit dem Histon Deacetylase Multiprotein Komplex NuRD/MeCP1, einem Regulator der Chromatinstruktur und Genexpression interagiert. Auf diese Weise wird die Zellproliferation gefördert [76].

APPL1 ist auch an der Signaltransduktion des Nervenwachstumsfaktor Rezeptor (TrkA) beteiligt. In diesem Signalweg findet zusätzlich eine Interaktion von APPL1 mit dem *PSD-95/Disc-Large/ZO-1* (PDZ) Protein *Gaip C-Terminus Interacting Proteine* (GIPC) statt. Endogenes GIPC bindet an den C-Terminus von APPL1. Dieser Komplex lagert sich an TrkA enthaltende endozytotische Vesikel, die sich durch die Bindung von

Nervenwachstumsfaktor an TrkA formieren, an GIPC, jedoch nicht APPL1, dissoziiert von den peripheren Endosomen während diese von der Zellperipherie in die Nähe des Zellkerns wandern. Die Interaktion von GIPC mit APPL1 ist für die TrkA induzierte Signaltransduktion essentiell [82].

1.4 Struktur und Funktion von PDZ Proteinen

Die PDZ Proteine gehören zu einer Klasse von Proteinen, die eine oder mehrere PDZ Domänen besitzen und bis auf eine bisher bekannte Ausnahme intrazellulär lokalisiert sind [83]. Die PDZ Domäne besteht aus 80 – 90 Aminosäuren, die eine kompakte globuläre Falte bilden, in der der N- und C-Terminus der PDZ Domäne eng beieinander liegen. Die Falte selber besteht aus sechs β -Faltblatt-Strukturen und zwei α -Helices [84]. In diese Falte können über den Mechanismus der β -Faltblatt-Addition kurze Peptide gebunden werden, ohne dass die Bindung des Liganden eine Strukturveränderung der PDZ Domäne nach sich zieht [85].

Über PDZ Domänen werden viele Protein – Protein Interaktionen vermittelt [86]. Die Hauptaufgabe der PDZ Domäne ist die Erkennung von spezifischen PDZ Bindemotiven am C-Terminus von Zielproteinen, die oft Rezeptoren oder Kanäle darstellen. Die Bindemotive bestehen aus bis zu fünf C-terminalen Aminosäuren dieser Oberflächenproteine und werden in die drei unterschiedliche Klassen I, II, und III eingeteilt. Bei der Bindung an die PDZ Domäne lagert sich der C-Terminus mit dem Bindemotiv über β -Faltblatt-Addition in die Falte der PDZ Domäne ein [86]. Entscheidend für die Erkennung und die Bindung der PDZ Domäne an das jeweilige Bindemotiv sind die letzte und die drittletzte Aminosäure des Bindemotivs [87]. Weiterhin ist für die Bindung ein freier C-Terminus essentiell. Mehrere Studien zeigen, dass die Mutation der letzten Aminosäure oder das Maskieren des freien C-Terminus eine Bindung zwischen PDZ Domäne und Bindemotiv verhindern [86, 88-90].

1.5 Ziel dieser Arbeit

Adiponectin ist aufgrund der oben dargestellten Wirkungsweise ein wichtiger Mediator der Glukosehomeostase, wodurch die Erhöhung der systemischen Adiponectinmenge als auch geeignete Agonisten für die Adiponectin Rezeptoren als mögliche neue Therapieansätze für Krankheiten wie Typ 2 Diabetes Mellitus, Atherosklerose oder NAFLD denkbar sind.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Adiponectin auf Hepatozyten untersucht werden, da diese Zellen in der Leber für die Regulation der Glukose- und der Lipid-Homeostase verantwortlich sind. Dazu wurden primäre humane Hepatozyten mit Adiponectin inkubiert und die differenzielle Genexpression mittels GeneChip Hybridisierung analysiert. Die Regulation der Kandidatengene aus dem GeneChip Experiment sollte auf mRNA und Proteinebene verifiziert werden. Von Interesse waren dabei von der Leber sezernierte Proteine, deren Konzentrationen im Plasma von gesunden Personen und Patienten mit Adipositas, Typ 2 Diabetes Mellitus oder mit Lebererkrankungen gemessen werden können und von denen noch keine Assoziation zu Adiponectin bekannt war. Es wurden weiterhin Gene als reguliert erwartet, die die Korrelation von Adiponectin zu HDL-Cholesterin und die inverse Assoziation zu LDL-Cholesterin erklären könnten.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung der Adiponectin Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2. Dies umfasst die Regulation der Rezeptoren durch diabetogene Stimuli, sowie deren Expression in der geschädigten Leber. Weiterhin sollten Proteine identifiziert und charakterisiert werden, die mit den N- und C-terminalen Bereichen beider Rezeptoren in der Leber interagieren. Erwartet wurde aus diesen Untersuchungen ein besseres Verständnis der Signaltransduktion und der hepatoprotektiven Funktion von Adiponectin.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Peqlab
Agarosegelkammer (7 x 15 cm) und Zubehör	Bio-Rad
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
CCD-Kamera	Rainbow
Drehschieber Vakuumpumpe RZ 2	Vacubrand
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
FACSCalibur	BD
Geldokumentation	MWG-Biotech
Inkubationsschrank 37° Celsius, 5% CO ₂	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
LightCycler [®] LC Karussell Zentrifuge	Roche
LightCycler [®] Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Mikroskop und Zubehör	Nikon
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-Q Biocell	Millipore
PCR Cycler T-Gradient Thermocycler	Biometra.
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E445	Consort
Power Supply E835	Consort
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Schüttler 3013	GFL
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik
Schüttler IKA-Vibrax-VRX	Janke und Kunkel
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	Bio-Rad
SDS-Gelplatten und Zubehör	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Speed-Vac Alpha RVC	Christ

Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV/Vis Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex VF2	Janke und Kunkel
Wasserbad WPE 45	Memmert
X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,100 mm	Neubauer
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus Instruments
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Zentrifuge RC 5C Plus	Sorvall
Zentrifugenrotor SS34, SLA-1500	Sorvall

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette 5 ml	BD Falcon
Collagen Type 1 beschichtetes Deckglas	BD BioCoat
Dialyseschlauch 29 mm	Serva
ELISA 96 Lochplatte	Corning Costar®
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell BioScience
Hanndee™ Mini-Spin Säulchen	Pierce
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	Bio-Rad
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
Parafilm	American National Can™
Petrischalen (10 x 1,5 cm)	BD Falcon
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Rundfilterpapiere (ø 15 cm)	Macherey-Nagel
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt
Slide-A-Lyzer® Dialyse Kassetten	Pierce
Slide-A-Lyzer® Mini Dialyse Einheiten	Pierce
Sterile Einmalspritzen	BD Falcon
Sterile Filterspitzen (10 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Sterile Filter-Spitzen (100 µl, 200 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™

Sterilfilter 0,22 µm Porengröße	Millipore
Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose (0,2 µm)	Bio-Rad
Vakuum Sterilfiltrationssystem (50 ml, 150 ml, 500 ml)	Millipore
Zell Schaber	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatten 6-, 24-, 48 Loch	BD Falcon
Zellkulturplatten 96 Loch	Corning Costar®
Zellkulturschalen (10 x 2 cm)	BD Falcon

2.1.3 Chemikalien

1-Butanol	Merck
1-kb DNA Molekulargewichtsleiter	Invitrogen
25-Hydroxycholesterin	Sigma
2-Propanol	Merck
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma
Acrylamidlösung 40%	Bio-Rad
Adenosin - Hemisulfat	Sigma
Adiponectin, human, rekombinant	R&D Systems
AICA-Ribosid	Calbiochem
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Ratiopharm
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Biosafe™ Coomassie	Bio-Rad
Bisacrylamidlösung 2%	Bio-Rad
Borsäure	Calbiochem
Bromphenolblau	Sigma
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
DEPC	Fluka
Desoxycholat	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
Difco™ LB Agar, Miller	BD Biosciences
Difco™ LB Broth, Miller	BD Biosciences
Digitonin	Calbiochem
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
DMEM, Hochglukose Medium	Biochrom AG
DRAQ5	Axxora
Dropout Aminosäure-Supplement (-Leu)	Clontech
Dropout Aminosäure-Supplement (-Leu, -Trp)	Clontech
Dropout Aminosäure-Supplement (-Leu, -Trp, -His)	Clontech
Dropout Aminosäure-Supplement (-Leu, -Trp, -His, -Ade)	Clontech
Dropout Aminosäure-Supplement (-Trp)	Clontech
Essigsäure (99%)	Merck

Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fenofibrat	Sigma
Floureszenz-Träger Medium	Dako
Formaldehydlösung (37%)	Merck
Formamid	Sigma
Fötale Kälber Serum	Biochrom AG
Full Range Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Igepal	Sigma
Imidazol	Sigma
Insulin, bovines	Sigma
Kanamycin	Sigma
Leptin, human, rekombinant	Sigma
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
Metformin	Calbiochem
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Mifepristone (RU486)	Sigma
Minimal SD Agar	Clontech
Minimal SD Medium	Clontech
N, N, N', N' , - Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
NuSieve® 3:1 Agarose	Cambrex
Penicillin/Streptomycin	PAN
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Biochrom AG
Protein A Beads	Dynal
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
RPMI 1640	Biochrom AG
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SeaKem® GTG® Agarose	Cambrex
S.O.C. Medium	Invitrogen
Sucrose	Sigma

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween [®] 20	Sigma
Xylencyanol	Merck
YPD Agar	Clontech
YPD Medium	Clontech
β-Mercaptoethanol	Sigma

2.1.4 Enzyme, Antikörper und Peptide

2.1.4.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Garnele	Roche
Cre Rekombinase	Clontech
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Restriktionsenzym <i>Alu</i> I	Roche
Restriktionsenzym <i>Bam</i> H I	Roche
Restriktionsenzym <i>Bgl</i> II	Roche
Restriktionsenzym <i>Dpn</i> I	Roche
Restriktionsenzym <i>Eco</i> R I	Roche
Restriktionsenzym <i>Hind</i> III	Roche
Restriktionsenzym <i>Pst</i> I	Roche
Restriktionsenzym <i>Xba</i> I	Roche
Restriktionsenzym <i>Xho</i> I	Roche
T4 DNA Ligase	Metabion
Taq Polymerase	Roche

2.1.4.2 Primäre Antikörper

Anti-ABCA1 mAB Antikörper (Klon AB.H10)	Maus	Abcam
Anti-ABCA1 pAB Antikörper	Kaninchen	Abcam
Anti-ACC mAB Antikörper (Klon C83B10)	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-β-Actin pAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-ACOX1 pAB Antikörper	Maus	Abnova
Anti-Adiponectin mAB Antikörper (Klon 251321)	Ratte	R&D Systems
Anti-Adiponectin pAB Antikörper	Ziege	R&D Systems
Anti-AdipoR1 pAB Antikörper	Kaninchen	Pineda Antikörpersevice
Anti-AdipoR2 pAB Antikörper	Kaninchen	IBL
Anti-AMPKα pAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies

Anti-AOX1 mAB Antikörper	Maus	BD Transduction Laboratories
Anti-ApoE pAB Antikörper	Ziege	Calbiochem
Anti-ApoE pAB Antikörper	Ziege	Chemicon
Anti-ApoB pAB Antikörper	Ziege	Chemicon
Anti-FAS pAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FLAG [®] M2 mAB Antikörper, FITC konjugiert	Maus	Sigma
Anti-FLAG [®] pAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Flotillin-1 mAB Antikörper (Klon F65020)	Maus	Transduction Laboratories
Anti-GAPDH mAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-HNF4 α mAB Antikörper (Klon H6939)	Maus	R&D Systems
Anti-Phospho-ACC pAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Phospho-AMPK- α (Thr172) pAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-SCD1 pAB Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-SOD2 pAB Antikörper	Kaninchen	LabFrontier
Anti-SRBI pAB Antikörper	Kaninchen	USBiological
Anti-SREBP 1 mAB Antikörper (Klon 2A4)	Maus	Novus Biologicals
Anti-Syntaxin13 pAB Antikörper	Kaninchen	Synaptic Systems
Anti-Syntaxin-6 mAB Antikörper (Klon S55420)	Maus	Transduction Laboratories
Anti-Syntrophin mAB Antikörper (Klon 1351)	Maus	Acris
Anti- α -Syntrophin	Kaninchen	Marvin Adams
Anti- β 1-Syntrophin	Kaninchen	Marvin Adams
Anti- β 2-Syntrophin	Kaninchen	Marvin Adams
Anti-V5 HRP-konjugierter Antikörper	Maus	Invitrogen

2.1.4.3 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Antikörper	Esel	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Peroxidase-konjugierter Antikörper	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Ratte Peroxidase-konjugierter Antikörper	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Ziege Peroxidase-konjugierter Antikörper	Kaninchen	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Alexa Flour [®] 488 konjugierter Antikörper	Ziege	Invitrogen
Anti-Rabbit Alexa Flour [®] 488 konjugierter Antikörper	Ziege	Invitrogen
Anti-Maus Alexa Flour [®] 546 konjugierter Antikörper	Ziege	Invitrogen
Anti-Rabbit Alexa Flour [®] 546 konjugierter Antikörper	Ziege	Invitrogen

2.1.4.4 Peptide

AdipoR1 C-Term

HHHHHHGLEGGCTDDTLL

Metabion

AdipoR2 C-Term

HHHHHHSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL

Metabion

2.1.5 Kit-Systeme

Adiponectin (Multimer) EIA, human	Alpco Diagnostics
Adiponectin ELISA, Maus/Ratte	BioCat
BCA Protein Assay Kit	Pierce
BD OptEIA™ Set human IL-8	BD Biosciences
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human IL-10	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human IL-6	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
Freie Fettsäuren, Halbmikro-Test	Roche
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche
Leber cDNA-Expressionsbank, human, vor-transformiert	Clontech
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries	Clontech
mi-Flash Link DNA Ligation Kit	Metabion
Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Finnzymes
pcDNA3.1/V5-His [©] TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Mini Elute Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kit	Qiagen
QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
TNT® T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega
TOPO TA Cloning® Kit pCR2.1-TOPO®	Invitrogen
Totales humanes Apo-AI ELISA	ALerCHEK
Totales humanes Apo-B ELISA	ALerCHEK
TranSignal™ PDZ Domain Array IV	Biocat
Triglyceride GPO-PAP, Halbmikro-Test	Roche
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche
YeastMaker [©] Hefe Transformationssystem 2	Clontech

2.1.6 Organismen

2.1.6.1 Eukaryontische Zellen

Nachfolgend sind alle verwendeten humanen Zelllinien und Zellen aufgelistet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank mit konstanter Temperatur (37°C), CO₂-Gehalt (5%) und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Humane Zelllinien

HepG2	hepatozytäre Zelllinie
Hep3B	hepatozytäre Zelllinie
PLC/PRF/5	hepatozytäre Zelllinie
HuH-7	hepatozytäre Zelllinie
Hek 293T/17	embryonale Nierenzelllinie
TE-671	myosarcomale Zelllinie
Primäre humane Hepatozyten	Thomas Weiss (Chirurgie)

2.1.6.2 Bakterien

Nachfolgend sind die zur Transformation und Vermehrung von Plasmid DNA verwendeten *E.coli* Stämme aufgeführt. Die DNA wurde über Hitzeschock in die Zellen transformiert.

<i>E.coli</i> Stämme	Marker
DH5 α -T1 ^R	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ 39 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]
GC 5	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96relA1</i> Δ « T1R
GC 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 endA1 dam</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>araD139 galU galK nupG rpsL</i> λ -

2.1.6.3 Hefen

Der Hefestamm AH109 wurde zur Transformation und Kotransformation von Plasmid DNA verwendet. Der Stamm Y187 wurde für das Hefe Two Hybrid Screening eingesetzt. Im Stamm Y187 war die *Human Liver MATCHMAKER cDNA Library* vortransformiert.

Hefe Stämme	Marker
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2</i> : : <i>GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3</i> : : <i>MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met-</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3</i> : : <i>GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>

2.1.7 Plasmide

pCR® 2.1-TOPO	Invitrogen
pcDNA3.1/V5-His [®] TOPO [®] TA	Invitrogen
pExchange-2 Core Vector	Stratagene
pExchange module EC-Neo	Stratagene
pGBKT7	Clontech
pGADT7	Clontech
pACT2	Clontech

2.1.8 Oligonukleotide und siRNA

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Die spezifischen siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen.

2.1.8.1 Primer für Klonierungen

An den Primern befanden sich zusätzlich zur genspezifischen Sequenz noch die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*H I, *Bgl* II, *Eco*R I und *Pst* I. Diese Schnittstellen waren notwendig, um die cDNA anschließend in die entsprechenden Vektoren zu klonieren. Die Erkennungstellen für die Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

2.1.8.1.1 Oligonukleotide für DNA Amplifikation zur Expression in humanen Zellen

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
R2_Flag_uni	GGG <u>AGA TCT</u> CCA CCA TGG ATG AAC GAG CCA ACA GAA AAC
R2_Flag_rev	GGG <u>AGA TCT</u> CAG TGC ATC CTC TTC ACT
Flag_R2_uni	GGG <u>AGA TCT</u> TAA ACG AGC CAA CAG AAA AC
Flag_R2_rev	GGG <u>AGA TCT</u> TCA CAG TGC ATC CTC TTC ACT
R2_Flag_intern_uni	GGG <u>CTG CAG</u> TGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA TAA GGA AGA GGA TGC ACT GTG <u>AAG ATC</u> TGG G

R2_Flag_intern_rev	CCC <u>AGA TCT</u> TCA CAGTGC ATC CTC TTC CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC ACT <u>GCA GCC</u> C
R1_Flag_uni	GGG <u>GGA TCC</u> CCA TGG ATG TCT TCC CAC AAA GGA TCT GTC
R1_Flag_rev	GGG <u>GGA TCC</u> GAG AAG GGT GTC ATC AGT
Flag_R1_uni	GGG <u>AGA TCT</u> TAT CTT CCC ACA AAG GAT CTG TGG TG
Flag_R1_rev	GGG <u>AGA TCT</u> TCA GAG AAG GGT GTC ATC AGT
R1_Eco_mut_uni	GGC CTT TAT GCT GCT CGA ATA CCT GAG CGC TTC TTT CCT GG
R1_Eco_mut_rev	CCA GGA AAG AAG CGC TCA GGT ATT CGA GCA GCA TAA AGG CC
R1_Flag_intern_uni	GGG <u>GAA TTC</u> GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG AGT TAC GGC CTA GAA GGC
R1_Topo_uni	GAG ATG TCT TCC CAC AAA GGA TCT
R1_Topo_rev	GAG AAG GGT GTC ATC AGT ACA
R2L_Topo_uni	GAG ATG AAC GAG CCA ACA GAA AAC CGA
R2S_Topo_uni	GAG ATG GAA AAA ATG GAA GAA TTT GT
R2_Topo_rev	CAG TGC ATC CTC TTC ACT GCA G

2.1.8.1.2 Oligonukleotide für Amplifikation zur Expression in Hefe Zellen

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
PDZ-alpha_GAD_uni	GGG <u>GAA TTC</u> CGC GTG ACG GTG CGC AAG GCC GAC
PDZ-alpha_GAD_rev	GGG <u>GGA TCC</u> TTA CTT GAC CTC CAG CAC CAC CTC CTT
PDZ-beta1_GAD_uni	GGG <u>GAA TTC</u> GGC GTG AAG GTG CTG AAG CAG
PDZ-beta1_GAD_rev	GGG <u>GGA TCC</u> TTA GTA CTT CAC TTCCAG CAG CAC
PDZ-beta2_GAD_uni	GGG <u>GAA TTC</u> CGC CGG GTG CGG GTG GTG AAG
PDZ-beta2_GAD_rev	GGG <u>GGA TCC</u> TTA GAA CTT GAC CTC CAG CAG CAC
PDZ-gipc1_GAD_uni	GGG <u>GAA TTC</u> ATG TTT TGC ACC CTG AAC AC
PDZ-gipc1_GAD_rev	GGG <u>GGA TCC</u> CTA GTA GCG GCC GAC CTT GGC
THR1_C_uni	GGG <u>GGA TCC</u> TCG TCT CCA ACC TTC AGG AAT TCC GTT
THR1_C-kurz_uni	GGG <u>GGA TCC</u> AAG GCC TAG AAGGCG GCT GTA CTG ATG AC
THR1_C_rev	GGG <u>CTG CAG</u> TCA GAG AAG GGT GTC ATC AGT ACA
THR2s_C_uni	GGG <u>GAA TTC</u> TCA AAC CTC CAG GAG TTT CGT TTC
THR2s_C_rev	GGG <u>GGA TCC</u> TCA CAG TGC ATC CTC TTC ACT GCA
AD_Insert_ampl_uni	AGT TGA AGT GAA CTT GCG GGG GT
AD_Insert_ampl_rev	GTT TGG AAT CAC TAC AGG GAT GT

2.1.8.1.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
pEx2_Seq_uni	GCG ATT ACG CCA AGC TCG AA
pEx2_Seq_rev	TGG TAC CTA CAG ATC CTC TT
pACT2_Seq_uni	GCT TAC CCA TAC GAT GTT CCA G

Topo_uni	GTA AAA CGA CGG CCA G
Topo_rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pGBKT7_Seq_uni	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA
pGBKT7_Seq_rev	ATA CAA ATT TTA AAG TGA CTC TTA
pGADT7_Seq_uni	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA
pGADT7_Seq_rev	CTG TGC ATC GTG CAC CAT CT

2.1.8.2 Oligonukleotide für LightCycler-Analysen

Die Oligonukleotide für die LightCycler-Genexpressionsanalysen wurden so gewählt, dass die Sequenz der PCR-Primer sich über zwei benachbarte Exone erstreckt, um die Amplifizierung von genomischer DNA auszuschließen. Desweiteren wurden Fragmente bis maximal 400 bp amplifiziert, um die Elongationszeit im PCR-Programm für den LightCycler möglichst kurz zu halten. Weiterhin wurden sie im Hinblick auf die *Annealing*-Temperatur so entworfen, dass diese im Bereich von 60°C liegt (Roche, Universal ProbeLibrary Assay Design Center: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/center.jsp?id=030000>).

Die amplifizierte DNA wurde mittels Sequenzierung der PCR-Fragmente durch die Firma GeneArt verifiziert. Der jeweilige uni-Primer wurde für die Sequenzierung verwendet.

2.1.8.2.1 Oligonukleotide zur Amplifikation humaner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	PCR-Produkt (bp)
ABCAI_uni	TCTTTGCCCTTTTGAGAGGA	365
ABCAI_rev	GGCACAATTCCACAAGAACC	
ABCB4_uni	GGTTCGCAACCCCAAGAT	140
ABCB4_rev	CCGTAGACAGTCGGTGTGC	
Actin_uni	CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC	233
Actin_rev	GATGGAGCCGCGATCCACACGG	
Adiponectin_uni	TGAATGCTGAGCGGTAT	312
Adiponectin_rev	CATGACCAGGAAACCACGACT	
AdipoR1_uni	GGGGAATTCTCTTCCCACAAAGGATCTGTGGTG	387
AdipoR1_rev	GGGCTGCAGTTAAGTTTCTGTATGAATGCGGAAGAT	
AdipoR2_uni	GGGGAATTCAACAGACCAACAGAAAACCGATTG	400
AdipoR2_rev	GGGCTGCAGCTAAATGTTGCCTGTTTCTGTGTGTAT	
AOX1_uni	AGCCATTGACATAGGCCAGA	112
AOX1_rev	GTCTGGACCACGAGTGTGC	
ApoAI_uni	CCTTGGGAAAACAGCTAAACC	296

ApoA1_rev	CCAGAACTCCTGGGTCACA	
ApoB_uni	CAAGAAAGGCATCTCCACCT	232
ApoB_rev	CAGAGAGGTTAGCAAGCCAGA	
ApoE_uni	GGATCCTTGAGTCTACTCAGC	300
ApoE_rev	CTGTCTCCACCGCTTGCT	
Catalase_uni	CTCCGGAACAACAGCCTTC	386
Catalase_rev	TAAGCTTCGCTGCACAGGT	
GAPDH_uni	TTGGTATCGTGGAAGGACTCA	345
GAPDH_rev	TGTCATCATATTTGGCAGGTTT	
GLUT2_uni	GGAGTTGGCGCTGTAAACAT	249
GLUT2_rev	AAACTCAGCCACCATGAACC	
HNF4- α _uni	ATCGTCAAGCCCCTCTCTG	147
HNF4- α _rev	TCTTCCTTTGCCGTGACC	
OCT1_uni	CCTGCCTCGTCATGATTTTT	307
OCT1_rev	CCCTTGGTCTCTGGAAGAAGT	
PEPCK_uni	GCTTTTCAGCATCTCCAAGG	326
PEPCK_rev	GAACACTTGCCCTCTCTTGC	
PPAR- α _uni	GCACTGGAAGTGGATGACAG	353
PPAR- α _rev	CAGCTTCAGAACTCCTGGAAA	
Syntrophin α _uni	GAGGTGCTGAAGGCGAGAT	360
Syntrophin α _rev	CTCTGCAAAAGGCACTGGT	
Syntrophin β 1_uni	GAGGCAAAGATGGAGAGATTCA	132
Syntrophin β 1_rev	AGGCAAGTCACCCCTGTCT	
Syntrophin β 2_uni	TGCTGAGCTGATCAAGGAAG	140
Syntrophin β 2_rev	TCAAAGGGGTAGCGGTACAA	

2.1.8.2.2 Oligonukleotide zur Amplifikation muriner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	PCR Produkt (bp)
ACOX_m_uni	CAGCCTGACAGAAGCCTACAA	391
ACOX1_m_rev	GTCAAAGGCATCCACCAAAG	
Actin_m_uni	TGGAATCCTGTGGCATCCATG	285
Actin_m_rev	TAAAACGCAGCTCAGTAACAG	
AdipoR1_m_uni	AGGCCTGTCCACCATCAC	312
AdipoR1_m_rev	CAGAAGGAGCCCCATTGC	
AdipoR2_m_uni	CCCACAACCTTGCTTCATCT	326
AdipoR2_m_rev	AGAGCTGATGAGAGTGAAACCA	
AOX1_m_uni	AAACCCAGCCCTTGACATAG	399
AOX1_m_rev	GGCTCATCTCTTGGGATCAT	
Catalase_m_uni	AGCTTCAGCGCACCAGAG	374
Catalase_m_rev	GAGCACCGGAGTTACAGGTT	
GAPDH_m_uni	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	375

GAPDH_m_rev	AGGGAGATGCTCAGTGTTGG	
PEPCK_m_uni	CTTTGGTGGCCGTAGACCT	239
PEPCK_m_rev	CGAACATCCACTCCAGCAC	
PPAR- α _m_uni	AACTGGATGACAGTGACATTTCC	197
PPAR- α _m_rev	CCGAAGGTCCACCATTTTT	

2.1.8.2.3 Oligonukleotide zur Amplifikation von Ratten-Genen

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	PCR Produkt (bp)
Actin_r_uni	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG	290
Actin_r_rev	CTTGATCTTCATGGTGCTAGG	
AdipoR1_r_uni	CGACAGGCCTAAGTGTCCAT	315
AdipoR1_r_rev	CTTACCCTTCTCCTCCAGCA	
AdipoR2_r_uni	GAAGGAGGGTCAACTCACCA	320
AdipoR2_r_rev	CATCAAGTTGGTGCCCTTTT	
AOX1_r_uni	ACCATGGAAGCTCACTAGTCCT	249
AOX1_r_rev	AGCAGTGCTGTGGATGATTCT	

2.1.8.3 siRNA

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Silencer*[®] Pre-designed siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen.

siRNA	Sequenz (5' → 3')
Syntrophin α _sense	GGUCAAGUAUAUGAAGGACTt
Syntrophin α _antisense	GUCCUUCAUAUACUUGACCtc
Syntrophin β 1_sense	CCUUUUAUAUCUAUGACAGCtt
Syntrophin β 1_antisense	GCUGUCAUAGAUUAAAAGGtc
Syntrophin β 2_sense	GGUGAGGCUUACUAUUCACTt
Syntrophin β 2_antisense	GUGAAUAGUAAGCCUCACCtc

Als Kontrolle für die genspezifischen siRNAs diente die *Silencer*[®] Negative Controll #1 siRNA der Firma Ambion.

2.1.9 Kulturmedien

2.1.9.1 Medien für eukaryontische Zellen

2.1.9.1.1 Medien für humane Zellen und Zelllinien

Die hepatozytären Zellen HepG2, Hep3B, HuH-7 und PLC/PRF/5 wurden in RPMI 1640 supplementiert mit 10% FCS, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium) kultiviert. Primäre humane Hepatozyten wurden in DMEM, supplementiert mit Hydrocortison (4 ng/ml), Insulin (1,67 mU/ml), Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 0,1 mg/ml) und FCS (5 %) kultiviert.

Die Kultivierung der Hek 293T/17 Zellen erfolgte in DMEM supplementiert mit 15% FCS, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium)

2.1.9.1.2 Medien für Hefen

Der Hefestamm AH109 wurde auf YPDA-Agar kultiviert. Die Anzucht erfolgte in flüssigem YPDA.

YPDA-Medium:	50	g YPD Medium
Adenosin Hemisulfat 0,2 %	15	ml
	ad 1	l ddH ₂ O
YPDA-Agar:	70	g YPD Agar Medium
Adenosin Hemisulfat 0,2 %	15	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Nach Transformation, für das Hefe Two Hybrid Screening oder zur Bestätigung von Interaktion, wurden die Hefen auf Agarplatten, denen definierte Aminosäuren fehlten, kultiviert.

SD/-Leu Agar:	46,7	g Minimal SD Agar Base
-Leu DO Supplement	0,69	g
	ad 1	l ddH ₂ O
SD/-Trp Agar:	46,7	g Minimal SD Agar Base
-Trp DO Supplement	0,74	g
	ad 1	l ddH ₂ O
SD/-Leu/-Trp Agar:	46,7	g Minimal SD Agar Base
-Leu/-Trp DO Supplement	0,64	g
	ad 1	l ddH ₂ O

SD/-Leu/-Trp/-His/-3-AT Agar:	46,7 g Minimal SD Agar Base
-Leu/-Trp/-His DO Supplement	0,62 g
3-AT 1M	15 ml
	ad 1 l ddH ₂ O
SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Agar:	46,7 g Minimal SD Agar Base
-Leu/-Trp/-His/-Ade DO Supplement	0,60 g
	ad 1 l ddH ₂ O

2.1.9.2 Medien für *E.coli*

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme DH5 α -T1^R, TOP10, GC 5 und GC 10 erfolgte in Luria-Broth-Medium (LB-Medium). Der *E.coli*-Stamm XL1 Blue wurde in NZY-Medium angezogen.

LB-Medium:	25 g Luria-Broth-Base
	ad 1 l ddH ₂ O
LB-Agar:	25 g Luria-Broth-Agar
	ad 1 l ddH ₂ O
NZY-Medium:	21 g NZY Medium
	ad 1 l ddH ₂ O
NZY-Agar:	21 g NZY-Medium
	15 g Bacto TM Agar
	ad 1 l ddH ₂ O

Für die Selektion plasmidtragender Klone wurde dem LB-Medium und dem LB-Agar entweder Kanamycin oder Ampicillin zugesetzt. Beide Antibiotika werden in ddH₂O zu einer Stammlösung von 100 mg/ml für Ampicillin und 50 mg/ml für Kanamycin gelöst. Dem autoklavierten Medium werden sie im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Im Medium lag die Endkonzentration für Ampicillin bei 100 μ g/ml und für Kanamycin bei 50 μ g/ml.

Bei der Herstellung des NZY-Medium und NZY-Agar wurde ausschließlich Kanamycin als selektionierendes Antibiotikum verwendet.

2.1.10 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Herstellung von Puffern und Lösungen beschrieben. Soweit nicht anders vermerkt wurden wässrige Lösungen hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Herstellung wurde stets ddH₂O verwendet.

2.1.10.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50-fach:

Tris-NH ₃	121	g
Essigsäure (99%)	28,85	ml
EDTA	50	ml einer 0,5 M Stammlösung pH 8,0
	ad 0,5	l ddH ₂ O

10x Gel-Loading Puffer:

Glyzerin 87%	5,8	ml
Bromphenolblau	0,025	g
Xylencyanol	0,025	g
	ad 10	ml einer 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.1.10.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA

DEPC-Wasser:

DEPC	1	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Nach Zugabe von DEPC wurde das Wasser über Nacht bei Raumtemperatur belassen und am nächsten Tag autoklaviert.

Ethanol 70%:

Ethanol	35	ml
DEPC-Wasser	15	ml

2.1.10.3 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

RIPA-Lysepuffer:

150 mM NaCl	2,5	ml
Igepal 1%	500	µl
Desoxycholat 0,5%	0,25	g
SDS 0,1%	250	µl einer 20%igen Stammlösung
50 mM Tris	2,5	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Lysepuffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Der Puffer wurde dann bei 4°C aufbewahrt.

2.1.10.3.1 Lösungen für SDS-PAGE

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
SDS 20%	50	ml
Tris-NH ₃	30	g

2x SDS-Probenpuffer (2 x Lämmli) [91]:

Glyzerin 20%	2	ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	120	µl
SDS 20%	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Der Puffer wurde stets im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Probenlysat vermischt.

5x SDS-Probenpuffer (5 x Lämmli) [91]:

Glyzerin 20%	5	ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	300	µl
SDS 20%	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Der Puffer wurde stets im Verhältnis 1:4 mit dem jeweiligen Probenlysat vermischt.

10%iges Trenngel:

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,9	ml
3 M Tris-NH ₃ pH 8,7	7,5	ml
SDS 20%	300	µl
ddH ₂ O	28,5	ml

15%iges Trenngel:

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	6,9	ml
3 M Tris-NH ₃ pH 8,7	10,0	ml
SDS 20%	400	µl
ddH ₂ O	33,0	ml

5%iges Sammelgel:

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
1 M Tris-NH ₃ pH 6,8	5,0	ml
SDS 20%	200	µl
ddH ₂ O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde der Acrylamidlösung 10%-ige APS-Lösung im Verhältnis 1:200 und TEMED im Verhältnis 1:250 zugesetzt.

2.1.10.3.2 Lösungen für Western Blotting**Wettransfer-Puffer:**

Methanol	200	ml
SDS-Gellaufpuffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

TBS, pH 7,6, 10-fach:

Tris-NH ₃	24,2	g
SDS 20%	80,0	g
	ad 1	l ddH ₂ O

PBST:

Tween [®] 20	1	ml
	ad 1	l PBS

TBST:

Tween [®] 20	1	ml
	ad 1	l TBS

Blockierlösungen:

Zur Herstellung der Blockierlösungen wurden 5 g Magermilchpulver in 100 ml PBST oder TBST gelöst, was eine 5%ige Milchlösung ergibt. Sie wurden bei 4°C aufbewahrt.

Antikörperlösung:

Zur Herstellung der Antikörperlösung wurden 1,5 g BSA und 0,1 g Natriumazid in 100 ml PBST oder TBST gelöst und anschließend sterilfiltriert. In diesen Lösungen wurden die primären Antikörper in der Regel im Verhältnis 1:1000 verdünnt und bei 4°C gelagert.

2.1.10.3.3 Lösungen für ELISA**Waschpuffer:**

Tween® 20	ml
	ad 1 l PBS

Reagent Diluent:

BSA	1 g
	ad 100 ml PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Substratlösung:

Die beiden von R&D Systems gelieferten Substratlösungen (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) wurden vor der Zugabe im Verhältnis 1:1 vermengt.

Stopplösung:

Schwefelsäure, rauchend	5,7 ml
	ad 50 ml ddH ₂ O

Verdünnungen der Antikörper:

Wie in der Vorschrift zu den ELISAs angegeben wurde der Capture Antikörper in PBS und der Detection Antikörper in Reagent Diluent verdünnt.

Verdünnungen des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Das HRP-Streptavidin-Konjugat wurde laut Packungsangabe in Reagent Diluent verdünnt.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht und Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Anzucht von *E.coli*-Bakterien

Kulturen von *E.coli* werden bei 37°C auf Agarplatten oder in flüssigem Medium (LB oder NZY) vermehrt. Um daraus Einzelkolonien zu erhalten, werden die Kulturen auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Der Agar enthält ein Antibiotikum (z.B. Ampicillin), um eine positive Selektion auf Einzelkolonien zu ermöglichen, die ein Plasmid tragen. Die Einzelkolonie wird mit einer sterilen Pipettenspitze in Flüssigmedium überführt. Das Flüssigmedium enthält dasselbe Antibiotikum.

2.2.1.2 Aufzucht und Kultivierung von Hefen

Hefekulturen werden bei 30°C auf Agarplatten oder in flüssigem Medium vermehrt. Um daraus Einzelkolonien zu erhalten, werden die Kulturen auf Agarplatten ausgestrichen und bei 30°C über mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion und Untersuchungen von Proteininteraktionen werden die Hefen nach Kotransformation oder Verpaarung auf Mangelagar ausplattiert. Findet eine Interaktion von Proteinen statt können die Hefen auf Agarplatten ohne Histidin wachsen. Ist die Interaktion stark, so wachsen diese Hefen auch auf Agarplatten denen Histidin und Adenin fehlt.

2.2.1.3 Kultivierung humaner Zelllinien

Humane Zellen stellen an ihre Kultivierung größere Ansprüche. Sie benötigen eine konstante Temperatur von 37°C, dazu eine Atmosphäre mit hoher Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO₂-Gehalt. Sie wachsen in 75 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt) mit 10 ml Medium. Die Kultivierung erfolgt in einem speziellen Brutschrank.

Die Leberzelllinien HepG2, Hep3B, HuH-7 und PLC/PRF/5 werden in Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen mit 10 ml RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% FCS kultiviert. Die Kultivierung der embryonalen Nierenkarzinomzellen Hek 293T/17 erfolgt in Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen mit 10 ml DMEM Medium, supplementiert mit 15% FCS. Die Passagierung der Zellen erfolgt nach 3-4 Tagen, wenn der Zellmonolayer 80-90% des Flaschenbodens bedeckt. Dazu wird das Medium abgesaugt und 3 ml Trypsin/EDTA

auf die Zellen gegeben. Das Trypsin löst die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ab und spaltet die Zell-Zell Kontakte auf, wodurch sich die Zellen ablösen. Die Zellen werden in ein Gefäß, in dem 3 ml Medium mit Serum vorgelegt sind, überführt. Serum inaktiviert das Trypsin, damit die Zellen keinen weiteren Schaden nehmen. Nach dem Zentrifugieren (300 g, 5 min) werden die Zellen resuspendiert und auf die neuen Flaschen verteilt. Die Passagierung erfolgt in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:7.

2.2.1.4 Kultivierung primärer humaner Hepatozyten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären humanen Hepatozyten werden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Thomas Weiss (Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) aus der Leber von Spendern (Diagnose meist Leberkarzinom) aus dem angrenzenden gesunden Gewebe isoliert. Es werden 100.000 Zellen pro cm² auf eine 6- oder eine 12 - Loch-Platte ausgesät.

Die Zellen werden initial in DMEM, supplementiert mit Hydrocortison (4 ng/ml), Insulin (1,67 mU/ml) Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 0,1 mg/ml) und FCS (5 %) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel zu Serum- und Supplementfreiem DMEM. Die weiteren Stimulationen und Inkubationen erfolgen ebenfalls in Serum- und Supplementfreiem DMEM.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen [92]. Hierbei werden die Zellen durch Zugabe von Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen und Proteine und genomische DNA durch Neutralisation gefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Anschließend wird die Plasmid-DNA an eine Silikamembran gebunden und verbliebene Verunreinigungen durch Waschen der Matrix entfernt. Der Reinheitsgrad der erhaltenen Plasmid-DNA ist ausreichend für Klonierungen und Sequenzierungen.

Aus einer 3 ml Übernachtskultur von Bakterien wurde Plasmid-DNA isoliert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend erfolgte, unter Verwendung des Plasmid-Kits *QIAprep® Spin Miniprep Kit* von Qiagen, die Isolierung der Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.2 Reinigung von DNA

2.2.2.2.1 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Um DNA aus Reaktionsansätzen zu reinigen, wurde der *QIAquick® PCR Purification Mini Elute* Kit von Qiagen, entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.2.2.2 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Sollen DNA-Fragmente aus Agarosegelen gereinigt werden, so wurde die entsprechende Bande auf dem UV-Flächenstrahler mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gelstück erfolgte nach dem Protokoll des *QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kits* (Qiagen).

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen lässt sich aus der Extinktion bei 260 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmen. Gemessen wird dabei in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen Wasser als Referenz. Es wird stets eine 1:100 Verdünnung der DNA-Lösung in einem Endvolumen von 1000 µl verwendet. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgt nach folgender Formel.

$$c_{dsDNA} (\mu g / \mu l) = E_{260} \cdot k$$

c_{dsDNA} :	Konzentration an dsDNA [$\mu g/\mu l$]
E_{260} :	Extinktion bei der Wellenlänge 260 nm
K:	Extinktionskoeffizient; $k = 5$ für DNA

Für die Messung wurde sowohl ein Wert bei 260 nm als auch ein Wert bei 280 nm ermittelt. Daraus wurde der Quotient OD_{260}/OD_{280} errechnet. Dieser Quotient ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte im Idealfall bei 2,0 liegen.

2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte in einem Agarosegel. Die Agarose für die Gele wurde in 100 ml 1 x TAE gelöst, in einer handelsüblichen Mikrowelle aufgekocht, mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 vol. 10 x Gel-Loading Puffer versetzt und in die Taschen gefüllt.

Als Längenstandard diente die 1 kb-Ladder der Firma Invitrogen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V durchgeführt. Im Anschluss an den Lauf wurden schließlich die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 350 nm sichtbar gemacht und fotografiert. Gegebenenfalls wurden einzelne Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (2.2.2.2.2).

2.2.2.5 Inkubation mit Restriktionsenzymen

Die Inkubation mit den Restriktionsenzymen erfolgte bei 37°C für 60 min bis 90 min. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über Agarosegelelektrophorese (2.2.2.4) analysiert.

2.2.2.6 Inkubation mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung der Religation von Plasmiden, die mit Restriktionsenzymen zur Klonierung vorbereitet wurden, erfolgte eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase für 10 min bei 37°C. Dabei wird das 5' Ende der DNA dephosphoryliert. Ein Inaktivierungsschritt bei 65°C für 10 min beendet die Reaktion.

2.2.2.7 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA ist die T4-DNA-Ligase besonders gut geeignet, da mit diesem Enzym sowohl komplementäre *sticky ends* als auch *blunt ends* ligiert werden können. Der passende Reaktionspuffer wird mit dem Enzym geliefert. Das molare Verhältnis zwischen Vektor und DNA-Fragment sollte bei 1:3 liegen. Ein typischer Ligationsansatz enthält folgende Komponenten.

DNA-Fragment (~ 0,9 µg)	4,0 µl
Vektor-DNA (~ 0,15 µg)	0,5 µl
5 x Ligasepuffer	4,0 µl
T4-DNA-Ligase	1,0 µl
ddH ₂ O	11,5 µl

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgt ÜN bei 14°C.

2.2.2.8 „TOPO TA“ Klonierung

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten eignet sich besonders gut der *TOPO TA Cloning-Kit*[®] der Firma Invitrogen. Der pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor besitzt an den Enden je ein 3'-überhängendes Thymidin, an welches kovalent über einen Tyrosin-Rest die Topoisomerase I gebunden ist. Das PCR-Fragment, das aufgrund der matrizenunabhängigen Terminaltransferaseaktivität der *Taq*-Polymerase ein 3'-überhängendes Adenosin aufweist, kann in Abwesenheit einer Ligase sehr effizient in den pCR[®] 2.1-TOPO[®] Vektor ligiert werden. Dabei wird die Phospho-Tyrosinbindung zwischen der Topoisomerase I und dem Vektor durch den Angriff des 5'-Hydroxylrestes des PCR-Fragments geöffnet. Die Aktivität der Topoisomerase I verbindet Vektor und DNA-Fragment, was zu einer Freisetzung der Topoisomerase I führt. Ein Klonierungsansatz sieht folgendermaßen aus:

DNA-Fragment	1 µl
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	1 µl
Salzlösung	1 µl
ddH ₂ O	3 µl

Die Inkubation erfolgte 5 min bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird gekühlt (Eis) und unmittelbar zur Transformation von *E.coli* (2.2.2.10) verwendet.

2.2.2.9 Klonierung mit Hilfe der Cre-Rekombinase

Der Bakteriophage P1 besitzt ein eigenes Replikationssystem, dessen eigentliche Aufgabe in der Auflösung von DNA-Dimeren liegt, die bei der Ring-zu-Ring-Replikation der Phagen-DNA entstehen. Die Cre-Rekombinase bindet dabei an die Erkennungsstellen (*loxP*-Stellen) und vermittelt das Schneiden und kreuzweise Verknüpfen von DNA-Strängen. Die *loxP*-Stellen bestehen aus zwei 13 bp langen umgekehrten Sequenzwiederholung, zwischen denen sich eine Spacer-Region aus 8 bp befindet. Die DNA im Bereich zwischen zwei *loxP*-Stellen kann entweder deletiert oder inseriert werden [93]. Es lagern sich dabei immer 2 Moleküle Cre-Rekombinase an eine *loxP*-Stelle an. Im Verlauf dieser Reaktion lagern sich insgesamt 4 Cre-Rekombinasen zusammen, wodurch auch zwei DNA-Stränge in unmittelbarer Nähe zueinander kommen. Die Cre-Rekombinasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum einen Tyrosin-Rest, der das Rückgrat des DNA-Stranges angreift und unter Bildung einer Phospho-Tyrosinbindung öffnet. Zwei gegenüberliegende Cre-Rekombinasen öffnen auf diese Weise die DNA-Stränge, wodurch

2 freie 5'-OH-Enden entstehen, die ihrerseits wieder mit den gegenüberliegenden Phospho-Tyrosinbindungen reagieren und so eine überkreuzte Struktur bilden. Im Folgenden öffnen nun die Tyrosin-Reste der anderen beiden Cre-Rekombinasen auf die gleiche Weise die DNA-Stränge. Mithilfe dieses Systems kann DNA deletiert bzw. inseriert werden.

Die beschriebene Funktionsweise der Cre-Rekombinase kann dazu verwendet werden DNA-Fragmente in Vektoren einzubringen. Das *Exchanger*[®] System von Stratagene bedient sich der Funktionsweise der Cre-Rekombinase um in den pExchange-2 Expressionsvektor das von 2 *loxP*-Stellen flankierte eukaryotisches Gen für die Neomycin-Resistenz zu transferieren. Der pExchange-2 Expressionsvektor besitzt einen Flag-Tag der von 2 *multiple cloning sites* (MCS) flankiert wird. Der Vektor trägt weiterhin eine Ampicillin-Resistenz und eine *loxP*-Stelle ca 1200 bp von der MCS entfernt.

Das gewünschte DNA-Fragment wurde auf herkömmliche Weise in eine der beiden MCS kloniert, je nachdem ob der Flag-Tag C- oder N-terminal liegen sollte. Die Amplifikation des Vektors erfolgte in *E.coli*, zur Selektion wird dem Agar Ampicillin zugesetzt. Nach der Identifizierung der positiven Klone mittels Restriktionsverdau (2.2.2.5) und Sequenzierung (2.2.2.14) wurden die Plasmide isoliert und mittels Cre-lox-Reaktion das eukaryotische Neomycin-Resistenzgen eingebracht. Die Reaktion erfolgte nach folgendem Schema:

pExchange-2 Expressionsvektor	500	ng
pExchange Module EC-Neo	100	ng
10 x Cre-Reaktions Puffer	2	µl
10 x BSA (1 mg/ml)	2	µl
Cre-Rekombinase	1	µl
	ad 20	µl ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 min auf 70°C erhitzt. Das Resistenzgen zwischen den *loxP*-Stellen des pExchange Moduls wurde dabei in den Expressionsvektor übertragen.

Nach der Transformation in *E.coli* (2.2.2.10) wurden die Bakterien auf den NZY-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und so einer positiven Selektion der DNA-Insertion unterzogen. Der Erfolg der Cre-lox-Reaktion wird zusätzlich mittels Restriktionsverdau überprüft.

2.2.2.10 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut und auf die Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wird 30 min auf Eis gehalten, anschließend für 30 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und dann 5 min auf Eis gestellt.

Die nun transformierten Zellen wurden in ca. 500 µl antibiotikafreiem S.O.C. Medium für 1 Stunde geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Bakterien auf vorgewärmte LB-, oder NZY-Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten enthielten das zur positiven Selektion nötige Antibiotikum.

2.2.2.11 Herstellung kompetenter Hefen und Transformation

Zur Herstellung kompetenter Hefen und deren Transformation wurde das *Yeastmaster*TM *Yeast Transformation System 2* von Clontech, entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Hefen wurden durch mehrere Wasch- und Inkubationsschritte mit Tris-EDTA/Lithium-Acetat (TE/LiAc) kompetent gemacht und auf die Plasmid-DNA gegeben. Nach der Zugabe von Polyethylenglycol 3350/Lithium Acetat (PEG/LiAc) erfolgte ein 15 minütiger Hitzeschock bei 42°C.

Die nun transformierten Zellen wurden in YPD Plus Flüssigmedium für 90 min inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Hefen in 0,9 %-iger NaCl aufgenommen und auf vorgewärmten Selektionsplatten (2.1.9.1.2) ausplattiert. Die ersten Kolonien bildeten sich nach einer Inkubationsphase von 3 – 6 Tagen bei 30°C.

2.2.2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten [94]. Sie ermöglicht die selektive Vervielfachung einer Matrize aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus. Die PCR basiert auf einer Anlagerung (*Annealing*) und Extension zweier Primer, die auf den gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer doppelsträngigen DNA flankieren.

Zu Beginn der PCR steht ein 10 minütiger initialer Denaturierungsschritt (95°C) um die hier speziell verwendete, hitzeaktivierbare *Taq*-Polymerase zu aktivieren. Anschließend wird die Amplifikation durchgeführt, die sich aus jeweils drei Stufen zusammensetzt. Im Denaturierungsschritt (95°C, 30 s) wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen aufgeschmolzen und in Einzelstränge überführt. Durch das folgende Absenken der

Temperatur in der *Annealing*-Phase kommt es zur Anlagerung der beiden spezifischen Primer an ihre komplementäre Zielregion auf der denaturierten Matrizen-DNA. In der anschließenden Elongationssphase werden die Primer komplementär zur Matrize durch eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert. Die *Annealing*-Temperatur hängt von der Sequenz und Länge der verwendeten Primer ab. Die Elongation wird bei 72°C durchgeführt. Die Zeit der Elongation richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei pauschal 1 min für 1 kb angenommen wird. Durch eine Wiederholung dieser drei Zyklen kommt es schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz. Nach einer 30- bis 45-fachen Wiederholung der Amplifikationszyklen folgt noch ein 10 minütiger terminaler Elongationsschritt bei 72°C.

Bei der Wahl der Primer wurde auf ähnliche Schmelztemperaturen geachtet, wodurch die *Annealing*-Temperatur meist im Bereich von 60 – 65°C lag. Bis zur Weiterverarbeitung der PCR-Produkte wurden die Proben bei 4°C gekühlt, anschließend über Agarosegelelektrophorese (2.2.2.4) analysiert und nach der Aufreinigung (2.2.2.2) für Klonierungen verwendet.

2.2.2.13 Einfügen von Punktmutationen in Plasmid-DNA

Die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen wurden über das Einfügen von Punktmutationen eliminiert. Dazu wurde der *QuikChange*[®] *XL Site-Directed Mutagenesis* Kit von Stratagene verwendet. Die Primer für diese PCR gestützte Methode waren ca. 40 bp lang, lagen über der zu mutierenden Stelle und besaßen genau in der Mitte die Punktmutation. Mittels PCR (2.2.2.12) wurde nun ausgehend von diesen Primern der Vektor amplifiziert und so die Mutation eingeführt. Ein anschließender Restriktionsverdau (2.2.2.5) mit dem Enzym *Dpn* I, das spezifisch nur methylierte DNA schneidet, degradiert die Template Plasmid-DNA. Der so mutierte Vektor wurde zur Transformation von *E.coli* (2.2.2.10) eingesetzt und nach Isolierung der Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung (2.2.2.14) auf den Erfolg der Mutagenese hin überprüft

2.2.2.14 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden im Auftrag von der Firma GeneArt (Regensburg) durchgeführt. Hierzu wurde das Kettenabbruchverfahren [95] verwendet. Zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden wurden noch fluoreszenzfarbstoffmarkierte 2'-3'-

Didesoxynukleotide zu der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion [96] zugesetzt, so dass es in der polymerasekatalysierten DNA-Strangsynthese zu zufälligen Einzelstrang Abbruchfragmenten kam, die 3'-terminal fluoreszenzmarkiert waren. Die so entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch in einer Kapillare aufgetrennt und anhand der 3'-endständigen Fluoreszenz, spezifisch für das jeweilige Nukleotid, detektiert. Die Primer für die Sequenzierreaktion waren entweder Sequenz- oder Vektor-spezifisch.

2.2.2.15 Real-time RT-PCR

Die Real-time RT-PCR stellt ein innovatives Verfahren zur schnellen, sensitiven und reproduzierbaren Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Durch sie ist es möglich, über den gesamten Reaktionsverlauf der PCR, die Amplifikation der Ausgangs-DNA zu beobachten und durch eine Standardkurve die relative bzw. absolute DNA-Menge der Reaktion zu ermitteln.

Das Prinzip der Quantifizierung bei der Real-time RT-PCR beruht dabei auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes SYBR[®] Green I an doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenzaktivität dieses interkalierenden Agens verhält sich proportional zur neu gebildeten DNA-Menge. Bei Eintreten der PCR-Reaktion in die exponentielle Phase wird die Zunahme der Fluoreszenz detektiert. In diesem exponentiellen Bereich der PCR wird der sog. *Crossing Point* (C_T) errechnet, der Punkt in der Kurve, bei dem die Fluoreszenz messbar zunimmt. Je früher die PCR in die exponentielle Phase eintritt, umso geringer ist der Wert des C_T .

Um die Effizienz unterschiedlicher PCR-Reaktionen für die Quantifizierung zu berücksichtigen bedient man sich einer Standardkurve. Dabei werden die C_T -Werte der gemessenen Proben über die Standardkurve in arbiträre Werte umgerechnet. Dies erlaubt es PCR-Reaktionen mit unterschiedlicher Effizienz zu vergleichen. Die Standardkurve wird aus einer DNA hergestellt, die ähnlich der zu untersuchenden Probe ist und schrittweise 1:1 verdünnt wurde.

Die Real-time RT-PCR-Versuche in dieser Arbeit wurden alle semiquantitativ durchgeführt. Dazu wurde der *LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I* Kit nach Herstellerangaben verwendet. Da bei diesem Kit-System bereits dNTPs, SYBR[®] Green I, entsprechender PCR-Puffer und die HotStart Taq-Polymerase in einem Master-Mix enthalten war, beschränkt sich der Einzelansatz auf folgendes Schema:

Master-Mix	2	µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	µl
universe Primer (5 pmol/µl)	1	µl
reverse Primer (5 pmol/µl)	1	µl
cDNA	2	µl
ddH ₂ O	11,6	µl

Am Anfang des Protokolls steht die Aktivierung der HotStart Taq-Polymerase durch einen 10 minütigen Hitzeschritt bei 95°C. Das anschließende Programm besteht aus 40-45 Zyklen mit jeweils 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, einer 10 s *Annealing*-Phase und einer 10 s Elongationsphase bei 72°C. Die Fluoreszenz wird bei jedem Zyklus unmittelbar nach der Elongationsphase gemessen. Diese Messtemperatur und die Temperatur in der *Annealing*-Phase sind Primer- bzw. Produktspezifisch. Nach Ende der Amplifikation wird noch eine Schmelzkurve zur Analyse der amplifizierten DNA erstellt. Dazu wird die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Ist die PCR-Reaktion spezifisch, d.h. wird nur ein PCR-Produkt generiert, so nimmt die Fluoreszenz an einer für das Produkt charakteristischen Temperatur abrupt ab. In dieser Arbeit wurde die Spezifität der LightCycler-PCR-Produkte bei jedem Lauf über die Schmelzkurve validiert.

Um bei der Analyse von stimulierten Zellen eine Aussage über die veränderte Expression der beobachteten Gene treffen zu können, wurde neben der cDNA für die Zielgene auch die cDNA für ein sog. „*housekeeping gene*“ anhand spezifischer Primer zu jeder cDNA Probe in einem eigenen LightCycler-Lauf analysiert. Ein „*housekeeping gene*“ wird durch die entsprechende Stimulation nicht reguliert. Daraus lässt sich nun ein Quotient Zielgen/*Housekeeper* errechnen, der einen auf das „*housekeeping gene*“ normalisierten Wert wiedergibt. Für die Berechnung der relativen Expression des Zielgens wird der Quotient der normalisierten Probe mit dem Stimulus und der unstimulierten Kontrolle gebildet.

2.2.2.16 Transfektion von humanen Zelllinien mit Plasmiden

Der pExchange-2 Core Vector, in den alle Konstrukte zur Überexpression der Adiponectin Rezeptoren in humanen Zelllinien kloniert wurden, trägt, den Promotor des Cytomegalievirus (CMV). Dieser frühe Promotor erlaubt eine starke und konstitutive Expression der klonierten DNA.

Die Transfektion von humanen Zelllinien mit Plasmid-DNA wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGENE[®] HD von Roche durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen:

Plasmid-DNA	2	µg
FuGENE [®] HD	10	µl
Zellkulturmedium	ad 100	µl

Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Cup 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu 900 µl Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann 72 h mit dem Transfektionsansatz im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.17 In vitro Translation

Die über PCR amplifizierte cDNA von AdipoR1 und AdipoR2 wurde mittels TOPO TA Klonierung (2.2.2.8) in den pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA Expressionsvektor eingebracht. Der Vektor besitzt eine MCS mit der TOPO[®] Cloning Site in der Mitte, der ein T7 Promotor vorgeschaltet, ein V5 Epitop und Polyhistidin Tag nachgeschaltet ist. Nach erfolgreicher Klonierung der beiden Adiponectin Rezeptoren entsteht bei der Expression ein Fusionsprotein aus AdipoR1 oder AdipoR2 mit einem C-terminalen V5/His-Tag.

Diese Plasmide wurden zur in vitro Translation mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega eingesetzt. Das Reticulozytenlysat dieses Kits enthielt alle Komponenten zur Generierung von mRNA und deren Translation in Proteine. Ausgehend vom T7 RNA-Polymerase Promotor auf dem pcDNA Vektor wurde über die mRNA von AdipoR1 oder AdipoR2 ein Fusionsprotein mit dem V5/His-Tag translatiert. Die in vitro translatierten AdipoR1 und AdipoR2 Proteine wurden für Western Blot Analysen verwendet.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit dem *RNeasy*[®] *Mini* Kit von Qiagen oder dem TRIzol Reagenz von Invitrogen. Dazu wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS in 500 µl des jeweiligen Lysereagenz (RLT oder TRIzol) aufgenommen und zum Scheren der genomischen DNA durch eine dünne Kanüle auf- und abgezogen. Die weiteren Schritte zur Isolation der RNA erfolgten gemäß den Protokollen der Hersteller. Die RNA wurde am Ende der Isolierung in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA erfolgte analog zur Konzentrationsbestimmung von DNA (2.2.2.3). Allerdings ist in der Formel zur Konzentrationsbestimmung der Wert des Extinktionskoeffizienten 4. Als Referenz dient auch hier Wasser.

2.2.3.3 Reverse Transkription

Da für die PCR als Ausgangsmaterial DNA bzw. cDNA benötigt wird, muss die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde das *Reverse Transkription System* von Promega benutzt. Als Reverse Transkriptase enthält dieses Kit-System die AMV (avian myeloblastosis virus) Reverse Transkriptase. Dieses Enzym benutzt RNA als Matrize, um ausgehend von einem Primer den komplementären DNA-Strang (cDNA) zu synthetisieren. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurden *random hexamer* Primer benutzt. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

MgCl ₂ (25 mM)	8	µl
10 x RT-Puffer	4	µl
dNTP-Mix (10 mM)	4	µl
<i>random hexamer</i> Primer (0,5 µg/µl)	1	µl
rRNasin Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl)	0,5	µl
AMV Reverse Transkriptase (25 U/µl)	1,2	µl
RNA (0,5 – 2 µg) in nukleasefreiem Wasser	21,3	µl

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 42°C inkubiert, anschließend für 5 min bei 95°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase denaturiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Transfektion von humanen Zellen und Zelllinien mit siRNA

Bei der siRNA-Transfektion wird doppelsträngige RNA, deren Sequenz einem bestimmten mRNA Abschnitt entspricht, in die Zellen eingebracht. Dies führt zu einer spezifischen Degradation der Ziel-mRNA und man spricht von einem Knock-down des Zielgens. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) in einer Zelle die Expression des Zielgens reduziert ohne die Expression anderer Gene zu verändern. Die dsRNA wird in der Zelle vom *Dicer- RNA deficient-1* gebunden und in 19 – 22 bp lange siRNA Oligonukleotide gespalten. Der Antisensestrang der siRNA wird vom *RNA induced silencing complex* zur gerichteten mRNA Spaltung und Degradation verwendet. Somit ist es möglich die Expression von ausgewählten Genen zu unterdrücken.

Die Transfektionen der siRNAs wurden mit dem *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent* von Roche durchgeführt. Ein Ansatz für die Transfektion enthielt:

siRNA	75 - 100 nM
X-tremeGene	2,5 µl
Zellkulturmedium	ad 100 µl

Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Cup 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen in 900 µl frisches Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden dann 48 bzw. 72 h mit dem Transfektionsansatz im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Präparation von Gesamtproteinextrakten

Die Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Säugerzellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Der Zellüberstand wurde abgezogen, die Zellen mit einem Schaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde im gleichen Volumen eiskaltem RIPA-Zelllysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die genomische DNA im Zelllysat mit Ultraschall geschert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit der Bicinchronsäure (BCA) Methode [97]. Proteine bilden dabei über ihr Rückgrat mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex, wobei die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen reduziert werden. Diese Cu^{+} -Ionen bilden mit Bicinchinonsäure einen violetten Farbkomplex aus, der photometrisch gemessen werden kann. Die Bildung dieses Farbkomplexes steigt linear mit der vorhandenen Proteinmenge an. Um die Menge an Protein in der Probe quantifizieren zu können, wird jeweils parallel eine Standardkurve mit BSA erzeugt, aus der sich die Konzentrationen der unbekanntenen Proben berechnen lassen.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine werden dazu mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgeköcht [91]. Dadurch denaturieren die Proteine und interagieren mit SDS, wobei das SDS durch seine aliphatischen Seitenketten die Proteine partiell auffaltet. Der Zusatz von β -Mercaptoethanol zum SDS-Probenpuffer sorgt dafür, dass alle Disulfidbrücken in einem Peptid gespalten werden.

In dieser Arbeit wurden 10%ige- und 15%ige Trenngele und kommerziell erworbene Gele mit einem Dichtegradienten von 4% bis 20% (Bio-Rad) benutzt. Zum Gießen der Gele wurden 5 ml der Trenngellösung und 2,5 ml der Sammelgellösung (2.1.10.3.1) jeweils mit entsprechenden Mengen an APS und TEMED versetzt, die die radikalische

Polymerisierungsreaktion auslösen. In das noch flüssige Sammelgel wurde zur Ausbildung der Taschen ein Kamm mit 10 oder 15 Zähnen gesetzt.

Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophoreseapparatur gespannt und unter 1 x SDS-Gellaufpuffer gesetzt. Anschließend wurden die aufgekochten Proben in die Taschen pipettiert, der *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker*, der eine Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine erlaubt, wurde in die letzte Tasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel.

2.2.4.4 Coomassie-Färbung

Bei der Coomassie-Färbung bildet der Coomassie-Farbstoff der *Biosafe™ Coomassie*-Lösung nicht-kovalente Komplexe mit Proteinen aus. Dabei entstehen blau-violette Banden. Die SDS-Gele und PVDF-Membranen wurden nach Ende der Elektrophorese 10 min in ddH₂O gewaschen und anschließend in *Biosafe™ Coomassie* inkubiert bis eine Färbung der Banden auftritt. Gegebenfalls musste die *Biosafe™ Coomassie*-Lösung gewechselt werden, um eine deutlichere Färbung zu bekommen. Nach der Färbung wurden die Gele und Membranen in ddH₂O gewaschen und auf Whatman Papier getrocknet.

2.2.4.5 Western Blot

Unter Western Blot versteht man den Transfer von Proteinen, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran, mit anschließendem immunologischem Nachweis [98]. In dieser Arbeit wurde ein *Wettransfer*-Verfahren angewendet, bei dem die Proteine mittels Elektroblot auf die Membran transferiert wurden. Die Proteine werden auf eine *Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 μm)* (Bio-Rad) übertragen, die vor Gebrauch kurz in Methanol und anschließend in *Wettransfer*-Puffer äquilibriert wird. Die jeweils verwendeten Netze, Whatman-Filterpapiere und das Gel wurden ebenfalls mit *Wettransfer*-Puffer äquilibriert. Aus den Filterpapieren, der Membran und dem Gel wird ein „Blot-Sandwich“ aufgebaut und in die Blot-Apparatur eingespannt. Bei einer Spannung von 80 V erfolgt der Transfer der Proteine auf die Membran, währenddessen der Transferpuffer unter Kühlung mit einem Magnetrührer ständig gemischt wird.

Um für die anschließende Detektion der Proteine mittels Antikörper unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde in Blockierlösung (2.1.10.3.2) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen à 10 min mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Antikörperlösung. Die Inkubation erfolgte

meist über Nacht bei 4°C oder mindestens für 120 min bei Raumtemperatur. Die Membran wurde im Anschluss gewaschen um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, in 10 ml Blockierlösung. Der sekundäre Antikörper wurde 1:5000 verdünnt, für 60 min inkubiert und die Membran anschließend wieder gewaschen. Zur Detektion der HRP wurde die *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* Lösung verwendet. Die beiden Reagenzien der ECL-Lösung wurden laut Herstellerangaben gemischt und 1 ml sofort auf die Membran gegeben. Nach 5 min wurde überschüssiges Reagenz entfernt und die Membran in einer Klarsichtfolie in die lichtdichte Filmkassette gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte mit *Hyperfilm ECL™*, abhängig von der Intensität des Signals über einen Zeitraum von 1 min bis zu 60 min.

2.2.4.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) können gelöste Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Das Nachweisprinzip des ELISAs beruht, analog zum Western Blotting, auf einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion. Das Protein wird zunächst über einen am Plattenboden gebundenen Antikörper (*Capture* AK) immobilisiert und anschließend mit einem zweiten Antikörper (*Detection* AK) detektiert. Der zweite Antikörper wird über eine spezifische Interaktion an ein Enzym gekoppelt, das ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Diese Art des ELISA wird als Sandwich-ELISA bezeichnet. Der Farbstoff wird proportional zur Menge des gebundenen Proteins gebildet und kann photometrisch nachgewiesen werden. Über eine Standardkurve lässt sich somit die Proteinkonzentration der Proben berechnen. Diese ELISA-Art wird als „Sandwich-ELISA“ bezeichnet.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen und murinen ELISAs beruhen auf diesem Prinzip und wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2.4.7 Koimmunpräzipitation

Für die Koimmunpräzipitation wurde das Lebergewebe von drei Mäusen (Stamm C57Bl/6) in RIPA-Lysepuffer aufgenommen und die Gesamtproteinextrakte der drei Proben zusammengeführt. 20 µg Gesamtprotein dieses gepoolten Zelllysats wurden mit AdipoR1 oder AdipoR2 Antikörper, kovalent gekoppelt an Protein A Dynabeads® (Dyna) über Nacht bei 4°C unter schütteln inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die an die

Antikörper gebundenen Proteine durch Erhitzen in Laemmli Probenpuffer eluiert. Die eluierten Präzipitate wurden mittels Western Blot mit den spezifischen Pan-Syntrophin Antikörpern auf den Gehalt Syntrophin untersucht.

2.2.5 Generierung polyklonaler Anti-Adiponectin Rezeptor Antikörper

Um polyklonale Peptid-Antikörper gegen AdipoR1 und AdipoR2 zu erhalten wurden Kaninchen mit synthetischen Peptiden immunisiert. Die Immunisierungen der Kaninchen wurden von der Firma Pineda Antikörper Service (Berlin) durchgeführt. Für die Immunisierung gegen AdipoR2 wurden Kaninchen mit zwei Peptiden, einmal vom C-Terminus des AdipoR2 mit der Sequenz NH₂-KEFRFMIGGGCSEEDAL-COOH und vom N-terminalen Bereich des AdipoR2 mit der Sequenz NH₂-FLLHGHRPPMPSFRAC-CONH₂ immunisiert. Mit der Peptidsequenz NH₂-KRVIANPPKAEQQTC-CONH₂ aus dem N-terminalen Bereich des AdipoR1 erfolgte die Immunisierung von Kaninchen gegen AdipoR1. Die Spezifität der Antiseren wurde mit in vitro translatiertem AdipoR1 und AdipoR2 Protein überprüft.

2.2.6 GeneChip Analysen Adiponectin-stimulierter primärer humaner Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten von 3 Spendern wurden mit PBS (Kontrolle) oder mit 10 µg/ml HMW-Apm oder 2 µg/ml LMW -Apm für 24 h stimuliert und Gesamt-RNA isoliert. 1 µg dieser Gesamt-RNA wurde zur Hybridisierung des Affymetrix *Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips*[®] eingesetzt. Die Hybridisierungen der GeneChips wurden vom Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (Regensburg) im Auftrag durchgeführt.

2.2.7 Analysen zur Genexpression Adiponectin-stimulierter Zellen

Die Stimulation mit rekombinantem Adiponectin bewirkt in Zellen eine veränderte differentielle Genaktivität gegenüber unstimulierten Zellen. Diese Veränderungen wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht.

Für Untersuchungen auf mRNA Ebene wurde, wie im Abschnitt 2.2.3 dargestellt, aus den stimulierten und nicht-stimulierten Zellen Gesamt-RNA isoliert, die dann mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Die Analysen dieser cDNAs erfolgte über Real-time RT-PCR mit dem LightCycler und diente als Verifikation der GeneChip Daten.

Für die Untersuchungen auf Proteinebene wurde Gesamtzelllysat von stimulierten und nicht-stimulierten Zellen isoliert und mittels Western Blot (2.2.4.5) analysiert. Dies diente als zusätzliche Verifikation der GeneChip und LightCycler Daten.

2.2.8 Das Hefe Two Hybrid System

Das Hefe Two Hybrid System stellt eine Methode zum Nachweis von Protein-Proteininteraktionen dar. Das System basiert auf dem Transkriptionsfaktor GAL4, der aus zwei Domänen besteht, einer DNA-Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD). GAL4 kann über die DNA-Bindedomäne an eine *upstream activating sequence* (UAS) oder eine TATA-Box binden wodurch ein nachgeschaltetes Reporter gen aktiviert wird.

Auf diesem Prinzip beruht das *Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3* von Clontech, das in dieser Arbeit verwendet wurde. Dabei wird der Transkriptionsfaktor GAL4 in die beiden Domänen geteilt und die Sequenz für die jeweilige Domäne in zwei unterschiedliche Vektoren, den *bait* Vektor für die BD- und den *prey* Vektor für die AD-Domäne eingebracht. In diese beiden Vektoren kann man nun DNA-Fragmente klonieren. Nach einer erfolgreichen Kotransformation dieser Vektoren in Hefe werden die Proteine als Fusionsproteine mit der jeweiligen BD- oder AD-Domäne exprimiert. Interagieren die *bait*- und *prey*-Proteine, so gelangen die beiden Domänen des GAL4 Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe und aktivieren die Transkription nachgeschalteter Reporter gene, in diesem System ADE2 und HIS3. Der *prey* Vektor trägt zusätzlich das Gen für die Aminosäure Leucin und der *bait* Vektor das Gen für Tryptophan. Mit Selektionsplatten, denen entweder Leucin (SD/-Leu), oder Tryptophan (SD/-Trp), oder beide Aminosäuren (SD/-Leu/-Trp) fehlen, lässt sich die Aufnahme der Plasmide in die Hefen überprüfen. Die Interaktion der beiden Proteine erlaubt den Hefen ein Wachstum auf Platten denen zusätzlich Histidin fehlt (SD/-Leu/-Trp/-His), bzw. auf Platten denen Histidin und Adenin fehlt (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade), wenn eine stärkere Interaktion der Proteine vorliegt.

2.2.8.1 Screening einer *pretransformed MATCHMAKER cDNA Library*

In dieser Arbeit wurde eine *pretransformed MATCHMAKER Human Liver cDNA Library* der Firma Clontech verwendet. Diese *Library* ist in den pACT2 AD-Vektor kloniert und in den Hefestamm Y187 transformiert, in dem theoretisch die gesamten cDNAs der *Library* als Fusionsproteine mit der AD-Domäne exprimiert werden.

Zum Screening dieser Leber cDNA-Expressionsbank wurden die C-Termini der beiden Adiponectin Rezeptoren R1 und R2 verwendet. Dazu wurden vom AdipoR1 einmal die 63 und weiterhin die 36 C-terminalen und vom AdipoR2 die 63 C-terminalen bp als *bait* in den pGBKT7 BD-Vektor kloniert. Die Vektoren wurden in den Hefestamm AH109 transformiert.

Die Hefestämme Y187 und AH109 sind jeweils haploid und weisen einen unterschiedlichen *mating type* auf (*MAT α* für Y187; *MATa* für AH109; 2.1.6.3). Sie lassen sich durch *Mating* in einen diploiden Zustand überführen. Auf diese Weise wurde der AdipoR1- oder AdipoR2 C-Terminus im Stamm AH109 mit der cDNA-Expressionsbank im Stamm Y187 verpaart und anschließend auf Selektionsmedien ausplattiert. Interagierte der jeweilige C-Terminus mit einem unbekanntem Protein aus der Genbank, so entstand ein funktioneller GAL4 Transkriptionsfaktor was in einer Aktivierung des Reportergenes HIS3 resultierte. Diese Hefen konnten auf Selektionsplatten, denen neben Leucin und Tryptophan noch Histidin als zusätzlicher Selektionsmarker fehlte (SD/-Leu/-Trp/-His), wachsen und bildeten nach 3 – 8 Tagen Kolonien. Um die Stärke der Interaktion zu bestimmen wurden die Hefen, die auf den SD/-Leu/-Trp/-His Platten deutliche Kolonien bildeten, auf stringenteren Selektionsplatten, denen zusätzlich Adenin fehlte (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) erneut ausgestrichen. Das Wachstum dieser Kolonien auf den Hochselektionsplatten spricht deutlich für eine Interaktion der C-Termini der Adiponectin Rezeptoren mit den unbekanntem Proteinen aus der Leber cDNA-Expressionsbank.

Die DNA, die für den unbekanntem Interaktionspartner codiert, wurde mittels Kolonie-PCR mit AD-Vektor spezifischen Primern aus den Hefen nach folgendem Schema amplifiziert:

MgCl ₂ (25 mM)	2	μl
10 x PCR-Puffer	5	μl
DMSO	0,5	μl
dNTP-Mix (25 mM)	3,2	μl
AD_Insert_ampl_uni+rev (10 pM)	2	μl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (25 U/μl)	1,3	μl
ddH ₂ O	36	μl

Von der SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatte wurden verschiedene Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, nummeriert und die Kolonien in den PCR-Mix überführt. Die PCR lief nach folgendem Programm: einem initialen 5 min Denaturierungsschritt bei 95°C folgte das eigentliche Programm aus 35 Zyklen mit jeweils 20 s Denaturierungsphase bei 94°C, einer 20 s *Annealing*-Phase bei 58°C und einer 2 min Elongationsphase bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus folgt noch ein 5 min Elongationsschritt bei 72°C. Ein 5 μl Aliquot

der PCR wurde anschließend mit *Alu* I inkubiert um anhand des Restriktionsmusters gleiche Klone auszuschließen. Die restliche PCR wurde aufgereinigt und sequenziert.

2.2.9 Hybridisierung des *PDZ Domain Array IV*

Der *TranSignal™ PDZ Domain Array IV* besteht aus einer Membran auf der die PDZ Domänen von 33 verschiedenen Proteinen doppelt aufgebracht sind.

Der *PDZ Domain Array IV* wurde mit den C-terminalen Peptiden von AdipoR1 und AdipoR2 (2.1.4.4) entsprechend den Herstellerangaben hybridisiert. Die Interaktion der Peptide mit den verschiedenen PDZ Domänen erfolgte direkt auf der Membran. Der Polyhistidin-Tag der Peptide erlaubte eine Detektion mittels HRP-konjugierten Anti-Histidin Antikörper.

2.2.10 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzversuche wurden HuH-7 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit den Konstrukte für AdipoR1 und AdipoR2 mit jeweils einem C- oder N-terminalem FLAG-Tag, bzw. einem Kontrollvektor transfiziert. Die Zellen wurden für 48 h mit und für weitere 24 h ohne Serum kultiviert und anschließend nach dem Protokoll von Ohsaki et al. [99] fixiert. Die Hälfte der Deckgläschen mit Zellen wurde mit 0,01 % Digitonin, gelöst in PBS, für 30 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 % BSA, gelöst in PBS, für 1 h blockiert und nach einem Waschschrift mit PBS über Nacht mit dem primären Antikörper in 1 % BSA in PBS inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit den sekundären Antikörpern, Alexa Fluor[®] 488 F(ab')₂ Ziege Anti-Rabbit/Anti-Maus oder Alexa Fluor[®] 546 F(ab')₂ Ziege Anti-Rabbit/Anti-Maus für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor die Zellen mit einem speziellen Trägermedium für Fluoreszenzfarbstoffe eingedeckelt wurden, wurde die DNA mit dem Farbstoff DRAQ5 gefärbt. Die auf diese Weise gefärbten Zellen wurden dem konfokalem Lasermikroskop Zeiss LSM510-Meta analysiert. Dazu wurde ein 63 x PlanApochromat Objektiv verwendet (Numerische Apertur 1,4). Die Fluoreszenzsignale des Alexa Fluor 488, die mit einem Argon Laser bei der Wellenlänge 488 nm angeregt wurden, wurden mit einem 505 – 550 nm Bandpass-Filter detektiert, während die Signale des Alexa Fluor 546, angeregt durch Helium-Neon Laser bei 543 nm, mit einem 560 – 615 nm Bandpass-Filter aufgenommen wurden. Das DRAQ5 Signal, ebenfalls mit dem Helium-Neon Laser bei 543 nm angeregt wurde mit einem 650 Longpass-Filter aufgenommen. Zur Detektion der Fluoreszenzsignale

wurde ein sequentielles Aufnahmeverfahren verwendet das die Fluoreszenzsignale nacheinander anregt und aufnimmt. So wird spezifisch nur das emittierte Fluoreszenzsignal eines Farnstoffes aufgenommen. Mit der LSM-Software wurden die aufgenommenen Bilder überlagert und ausgewertet.

2.2.11 Bestimmung des ApoA-I vermittelten Phospholipid und Cholesterin Efflux

Die Versuche zum Phospholipid und Cholesterin Efflux wurden in Kooperation mit Dr. Alexander Sigrüner (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Uniklinikum Regensburg) durchgeführt. Dazu wurden HepG2 Zellen mit radioaktiv markierten [³H]Cholin und [¹⁴C]Cholesterin für 34 h beladen und anschließend mit 0,2 % BSA alleine oder 0,2 % BSA plus 10 µg/ml ApoA-I inkubiert [100, 101]. Zusätzlich wurden die Zellen noch mit PBS oder 10 µg/ml Adiponectin inkubiert. Bestimmt man im Überstand der Zellen die Radioaktivität und subtrahiert diese von der Gesamt-Radioaktivität, so erhält man den Lipidefflux. Subtrahiert man vom ApoA-I vermittelten Efflux den BSA vermittelten, so ergibt sich daraus der spezifische Lipidefflux.

2.2.12 Tiermodelle

2.2.12.1 Tiermodell für Leberzirrhose durch Gallengangsligatur

Die Induktion einer Leberzirrhose durch eine Gallengangsligatur (BDL) in Mäusen wurden in Kooperation mit Dr. E. Gäbele (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Uniklinikum Regensburg) durchgeführt. Dazu wurde von zwölf männlichen C57Bl/6 Mäuse unter Betäubung die Peritonealhöhle eröffnet und der Hauptgallengang freigelegt. In sechs Tieren wurde der Gallengang zweimal abgebunden und zwischen den Ligaturen durchtrennt. Bei den restlichen sechs Tieren wurde der Gallengang mit einer Pinzette dreimal leicht gequetscht, um die Ligaturen und die Durchtrennung zu simulieren. Die kontrolloperierten und die gallengangsligierten Tiere wurden für drei Wochen unter Standardbedingungen gehalten. In dieser Zeitperiode entwickeln die Tiere mit Gallengangsligatur eine Leberzirrhose. Nach diesen drei Wochen wurde Serum gewonnen, anschließend die Tiere getötet, die Leber entnommen, gewogen und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Aus einem Teil des Lebergewebes wurde Gesamt Protein oder Gesamt RNA isoliert. Diese Tierversuche wurden entsprechend den ethischen Richtlinien des

Uniklinikums Regensburg und mit Genehmigung der örtlichen Tierethikkommission durchgeführt.

2.2.12.2 Tiermodell für Fettleber durch Hochfettdiät

Zur Ausbildung einer Fettleber in männlichen Wistar Ratten wurden die Tiere auf einer Hochfettdiät, basierend auf Schweineschmalz, mit einem Fettanteil von 43 % gehalten. Die entsprechenden Kontrolltiere erhielten eine Standarddiät mit einem Fettanteil von 12 %. Die Tiere wurden für 12 Wochen auf den Diäten gehalten, anschließend Serum gewonnen, getötet, die Leber entnommen, gewogen und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Aus einem Teil des Lebergewebes wurde Gesamt Protein oder Gesamt RNA isoliert. Die Tierversuche wurden in Kooperation mit PD. Dr. R. Büttner (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Uniklinikum Regensburg) entsprechend den ethischen Richtlinien des Uniklinikums Regensburg und mit Genehmigung der örtlichen Tierethikkommission durchgeführt.

2.2.12.3 Syntrophin Knock-out Mäuse und metabolische Versuche

Die Syntrophinisoform defizienten Mäuse, alpha-Syntrophin (SNTA $^{-/-}$), beta2-Syntrophin (SNTB2 $^{-/-}$), die alpha-Syntrophin/beta2-Syntrophin (SNTA/B2 $^{-/-}$) Doppel-Knock-out Mäuse und Wildtyp (WT) Mäuse wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Marvin E Adams (Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle) untersucht [102, 103]. In allen Experimenten wurden die Tiere auf Standarddiät gehalten. Von vier Tieren aus jeder Gruppe (WT, SNTA $^{-/-}$, SNTB2 $^{-/-}$ und SNTA/B2 $^{-/-}$), die über Nacht kein Futter erhalten hatten, wurde Lebergewebe entnommen, aus dem Gesamt-RNA (2.2.3) und Gesamt-Protein (2.2.4.1) extrahiert wurde.

Der intraperitoneale Glucosetoleranztest (IPGTT) und der Insulintoleranztest (ITT) wurden im Labor von Prof. Dr. Stanley Froehner durchgeführt. Dazu wurde den Tieren nach 16 h Fasten für den IPGTT 1 mg Glucose oder für den ITT 1 mU Insulin pro g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Es wurden 6 männliche WT Tiere und je 5 männliche SNTA $^{-/-}$ und SNTB2 $^{-/-}$ Tiere untersucht. Die SNTA/B2 $^{-/-}$ Gruppe setzte sich aus 3 männlichen und 3 weiblichen Tieren zusammen. Den Tieren wurden zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 90, und 120 min nach der Glucose- bzw. Insulininjektion venöses Blut von der Schwanzspitze entnommen und davon die Blutglucosespiegel und der Plasmainsulinspiegel bestimmt. Das

Plasmaadiponectin wurde im Serum von 5 männlichen WT, SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und 4 männlichen SNTA/B2^{-/-} Tieren gemessen.

2.2.13 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden in Microsoft Office Excel 2003 nach der Statistik des Student's t-test berechnet. Eine signifikante Änderung ($p < 0,05$) wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Diagramme wurden in SPSS 15 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Adiponectin auf Hepatozyten

3.1.1 Stimulation primärer humaner Hepatozyten mit Adiponectin

Die primären humanen Hepatozyten von drei verschiedenen Spendern wurden mit PBS oder mit 10 µg/ml HMW-Apm bzw. 2 µg/ml LMW-Apm für 24 h inkubiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde für GeneChip Analysen verwendet. Damit konnte die Änderung der globalen Genexpression durch die Apm-Stimulation analysiert werden. In der Auswertung der erhaltenen Daten wurde von jedem der drei Probensätze der stimulierte Zustand mit der jeweiligen Kontrolle verglichen. Dabei zeigte sich, dass durch HMW-Apm 344 Gene auf mRNA Ebene reguliert wurden, während LMW-Apm drei Gene induzierte. Ein Teil der durch HMW-Apm regulierten Gene wurde unabhängig auf mRNA Ebene verifiziert und die Regulation auf Proteinebene bestätigt.

3.1.2 Einfluss von HMW-Apm, AICAR, Metformin und Fenofibrat auf die Expression der Aldehydoxidase 1 (AOX1)

3.1.2.1 Regulation der AOX1 durch HMW-Apm

Die Auswertung der GeneChip Daten zeigte für ein Probenstet (ID 205082_s_at) reduzierte AOX1 mRNA in allen drei mit HMW-Apm stimulierten Hepatozytenkulturen, während ein zweites Probenstet (ID 205083_at) eine Verminderung nur für eine Apm stimulierte Probe zeigte, während die AOX1 in den Hepatozyten der beiden anderen Spender nicht reguliert war.

Ausgehend von diesem GeneChip Ergebnis wurde die mRNA Expression der AOX1 in Hepatozyten von fünf Spendern, mit und ohne HMW-Apm Stimulation, mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Die erhaltenen Werte wurden mit β -Actin als *Housekeeper* normalisiert. Durch die Stimulation mit HMW-Apm sank die mRNA Expression auf $8,1 \pm 2,9$ gegenüber $14,2 \pm 6,0$ ($p = 0,02$) in den Kontroll-stimulierten Hepatozyten (Abbildung 8 A). Im Folgenden wird die Inkubation mit dem Lösungsmittel der jeweiligen Substanz als Kontrolle bezeichnet.

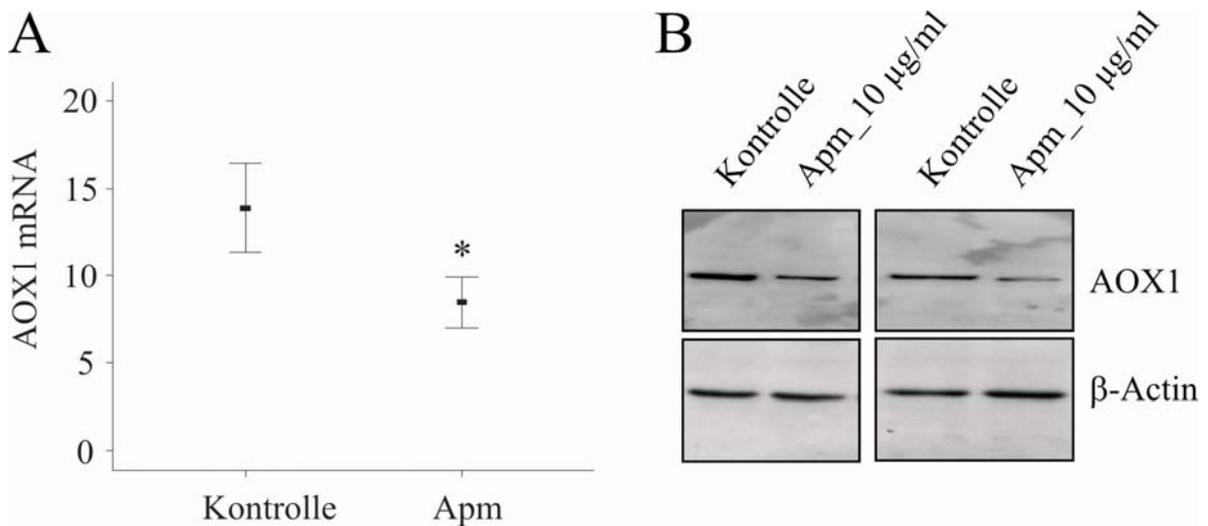


Abbildung 8: (A) Real-Time RT-PCR Analyse der AOX1 mRNA Expression in primären humanen Hepatozyten, die mit PBS als Kontrolle oder 10 μ g/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert wurden. Die Daten wurden gegen β -Actin normalisiert,* $p = 0,02$. (B) Western Blot primärer humaner Hepatozyten von zwei Spendern, inkubiert mit PBS als Kontrolle oder 10 μ g/ml HMW-Apm für 24 h. AOX1 und β -Actin wurden mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Um die Regulation auf Proteinebene zu bestätigen wurde mit Western Blot das Gesamtprotein von Hepatozyten zweier Spender analysiert. Wie in Abbildung 8 B dargestellt, zeigte sich, dass eine Stimulation mit 10 μ g/ml HMW-Apm die Menge an AOX1 Protein reduzierte.

Die Inkubation von primären Hepatozyten mit geringeren Konzentrationen an HMW-Apm ergab, dass 0,1, 1 und 2,5 μ g/ml HMW-Apm die Menge an AOX1 Protein nicht veränderten, während eine Stimulation mit 5 μ g/ml bereits eine leichte Reduktion bewirkte (Abbildung 9).

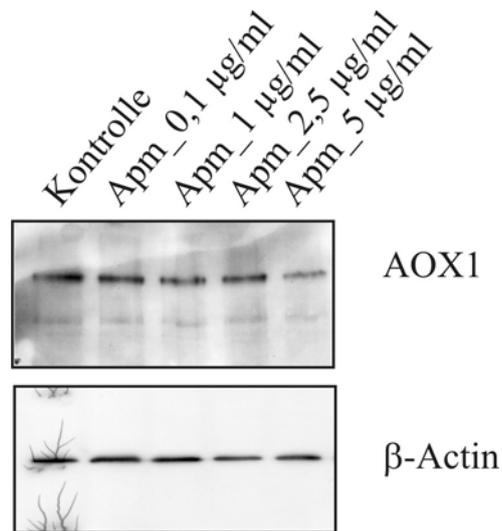


Abbildung 9: Primäre humane Hepatozyten wurden mit PBS als Kontrolle oder 0,1, 1, 2,5 oder 5 µg/ml HMW-Apm für 24 h inkubiert. Die Expression von AOX1 und β-Actin als Ladungskontrolle wurde mittels Western Blot bestimmt.

Weiterhin wurden die hepatozytären Zelllinien Hep3B, HepG2 und PLC/PRF/5 auf AOX1 Protein hin untersucht. Wie Abbildung 10 zeigt, konnte nur in den HepG2 Zellen AOX1 Protein detektiert werden. In den Hep3B und PLC/PRF/5 Zellen war kein oder nur wenig AOX1 Protein vorhanden. Es wurden je zwei unabhängige Kulturen dieser Zellen untersucht.

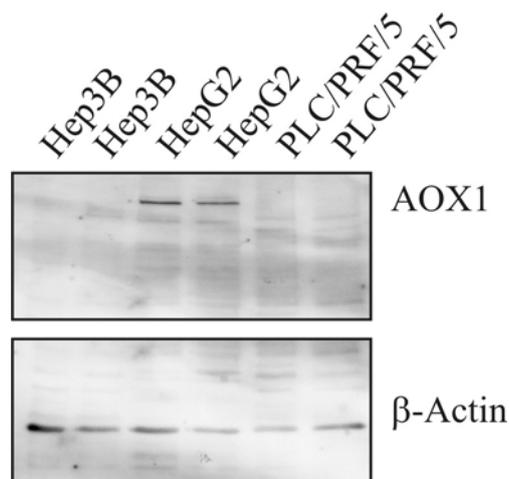


Abbildung 10: Western Blot der hepatozytären Zelllinien Hep3B, HepG2 und PLC/PRF/5 gegen AOX1 und β-Actin.

Daher konnten HepG2 Zellen, neben den primären Hepatozyten für weitere Experimente verwendet werden.

3.1.2.2 Regulation der AOX1 durch AICAR und Metformin

Es ist bekannt, dass Adiponectin unter anderem die AMPK aktiviert. Um zu untersuchen, ob die AOX1 über diesen Weg reguliert wird, wurde der Einfluss von zwei AMPK Aktivatoren, AICAR und Metformin, untersucht. Dazu wurden primäre Hepatozyten von fünf Spendern entweder mit AICAR oder mit Metformin für 24 h stimuliert. Die Konzentrationen für AICAR waren 2 und 4 mM und die für Metformin lagen bei 1 und 2 mM. Aus diesen Zellen wurde nach 24 h Protein extrahiert und der Einfluss beider Substanzen auf die AOX1 über Western Blot untersucht. Abbildung 11 zeigt repräsentativ den Western Blot von Hepatozyten eines Spenders.

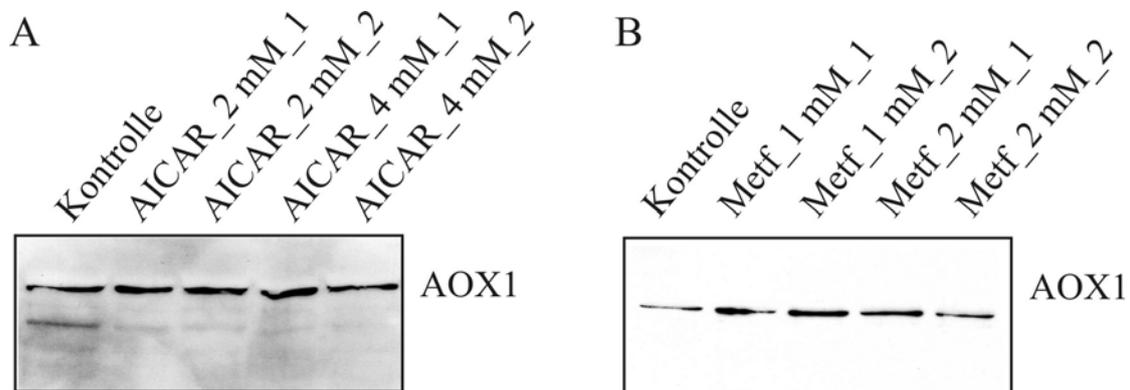


Abbildung 11: Regulation der AOX1 durch AICAR und Metformin. (A) Western Blot gegen AOX1 mit Zelllysaten von primären Hepatozyten inkubiert mit H₂O als Kontrolle oder mit 2 und 4 mM AICAR. (B) Western Blot gegen AOX1 mit Zelllysaten von primären Hepatozyten inkubiert mit H₂O als Kontrolle oder mit 1 und 2 mM Metformin (Metf). 1 und 2 bezeichnet je zwei unterschiedliche Ansätze.

Die Western Blots in Abbildung 11 zeigen, dass weder AICAR noch Metformin AOX1 auf Proteinebene reduzieren. Es ist sogar eine leichte Induktion der AOX1 durch AICAR und Metformin zu sehen.

3.1.2.3 Regulation der AOX1 durch Fenofibrat

Einen anderen Signalweg, über den Adiponectin seinen Einfluss vermittelt, stellt PPAR- α dar. Um eine Regulation der AOX1 über diesen Weg zu untersuchen, wurde der Einfluss des PPAR- α Agonisten Fenofibrat analysiert. Für diesen Versuch wurden HepG2 Zellen verwendet, die mit 500 μ M Fenofibrat für 24 h stimuliert wurden. Die Analyse über Western Blot zeigte in den Fenofibrat stimulierten Zellen eine reduzierte Menge an AOX1 Protein (Abbildung 12).

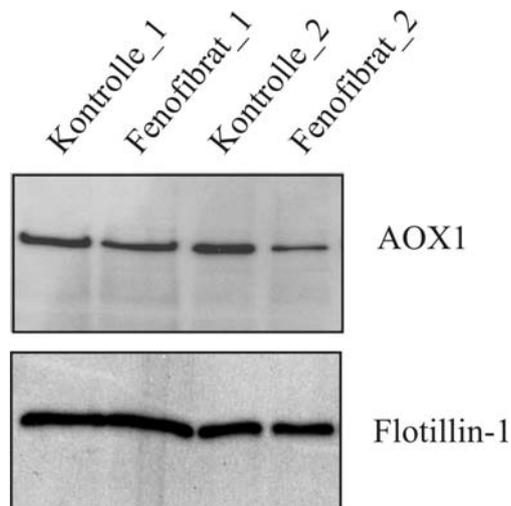


Abbildung 12: Western Blot gegen AOX1 von HepG2 Zelllysaten, die mit Ethanol als Kontrolle oder 500 μ M Fenofibrat stimuliert wurden. Flotillin-1 diente als Ladungskontrolle.

3.1.2.4 Einfluss des PPAR- α Inhibitors RU486 auf die Reduktion der AOX1 durch HMW-Apm

Um herauszufinden, ob die Repression der AOX1 durch Adiponectin spezifisch über die Aktivierung von PPAR- α erfolgt, wurde der PPAR- α Antagonist RU486 verwendet. Primäre humane Hepatozyten wurden dazu mit 10 μ M RU486 für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 10 μ g/ml HMW-Apm kostimuliert. Die Zellen wurden wieder nach 24 h geerntet und das Gesamtprotein extrahiert (Abbildung 13).

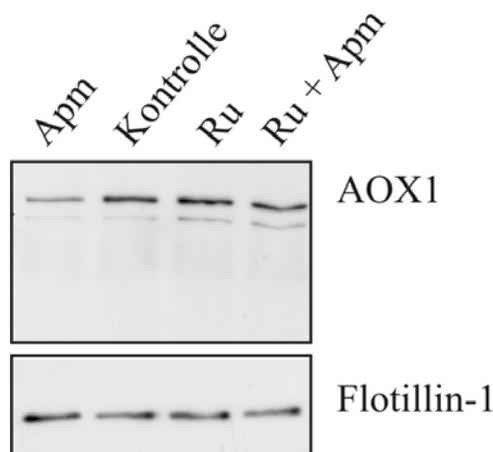


Abbildung 13: Western Blot gegen AOX1 mit Zelllysaten von primären humanen Hepatozyten, die mit Ethanol als Kontrolle, mit 10 μ g/ml HMW-Apm, mit 10 μ M RU486 oder in mit 10 μ M RU486 plus 10 μ g/ml HMW-Apm stimuliert wurden. Flotillin-1 diente als Ladungskontrolle.

Wie erwartet, senkte die Inkubation mit HMW-Apm die Menge an AOX1 Protein gegenüber der Kontrolle. Die Kostimulation mit 10 μ M RU486 und 10 μ g/ml HMW-Apm zeigte keine Reduktion der AOX1, was deutlich dafür spricht, dass der Effekt von Adiponectin über PPAR- α vermittelt wird. Der Inhibitor alleine hatte keinen Einfluss auf die Expression der AOX1.

3.1.2.5 Expression der AOX1 in der Fettleber von Ratten

Die Fettleibigkeit ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Fettleber. Weiterhin ist die Adipositas mit einem erniedrigten Plasmaadiponectinspiegel assoziiert und zeigt im Tiermodell eine reduzierte Menge an hepatischem PPAR- α Protein [104].

Um die AOX1 in den Lebern von übergewichtigen Ratten zu untersuchen wurden männliche Wistar Ratten für 12 Wochen mit einer Hochfettdiät (HF), die auf Schweineschmalz basiert, gefüttert oder auf einer Standarddiät (SC) gehalten. Die Tiere auf der Hochfettdiät zeigten einen reduzierten Plasmaadiponectinspiegel und entwickelten eine Fettleber [105]. Von sechs Tieren aus jeder Gruppe (HF-1 bis HF-6 und SC-1 bis SC-6) wurde die Leber entnommen und daraus Gesamtprotein gewonnen. Die so erhaltenen Leberextrakte wurden mittels Western Blot auf die Expression der AOX1 hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass in allen Proben der HF-Tiere, verglichen zu den SC-Tieren, die Menge an AOX1 Protein deutlich erhöht war. Abbildung 14 zeigt repräsentativ den Western Blot von je 4 Tieren.

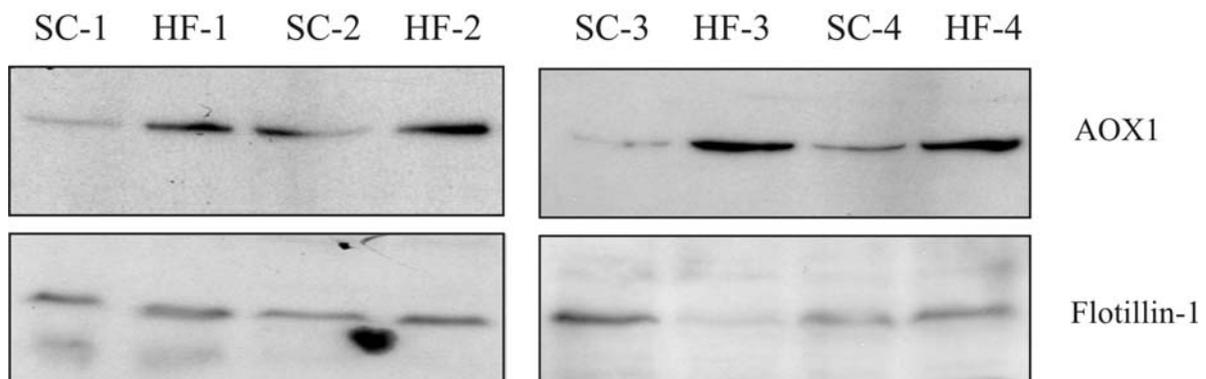


Abbildung 14: Western Blot zur Analyse der AOX1 in Leberextrakten von Ratten auf Standarddiät (SC-1 bis SC-4) oder auf Hochfettdiät (HF-1 bis HF-4). Flotillin-1 diente als Ladungskontrolle.

3.1.2.6 Einfluss von Palmitinsäure und Leptin auf die Regulation der AOX1

Im Krankheitsbild der Fettleibigkeit findet man häufig eine Erhöhung der zirkulierenden freien Fettsäuren und einen erhöhten Plasmaleptinspiegel. Um zu untersuchen ob freie Fettsäuren einen Einfluss auf die AOX1 haben, wurden primäre humane Hepatozyten mit 100 und 250 μM Palmitinsäure in einem Komplex aus BSA und Ethanol, oder mit BSA und Ethanol als Kontrolle für 24 h inkubiert. Wie aus Abbildung 15 A hervorgeht hat Palmitinsäure keinen Einfluss auf die AOX1 Proteinmenge.

In einem weiteren Ansatz wurden HepG2 Zellen mit 100 ng/ml rekombinanten Leptin für 24 h stimuliert und anschließend über Western Blot analysiert. Auch hier zeigte sich, dass Leptin keinen Einfluss auf die AOX1 hat (Abbildung 15 B).

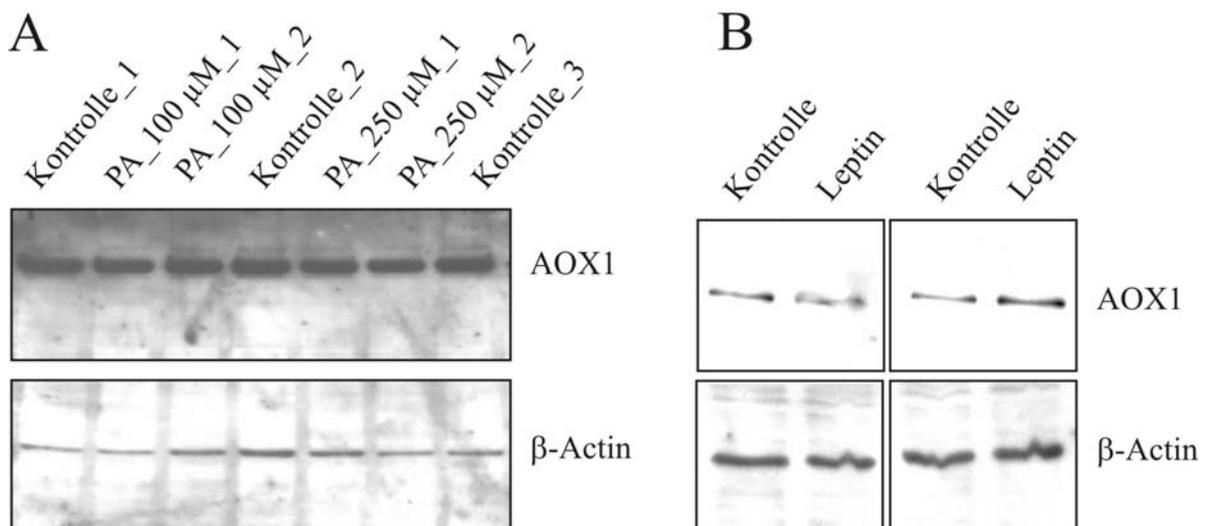


Abbildung 15: (A) AOX1 wurde in Zelllysaten von primären humanen Hepatozyten, die mit Kontrolle oder mit Palmitinsäure (100 und 250 μM) stimuliert wurden, mit Western Blot analysiert. (B) Western Blot gegen AOX1 in Zelllysaten von HepG2 Zellen, die mit Kontrolle oder 100 ng/ml Leptin für 24 h stimuliert wurden. β -Actin diente bei beiden Blots als Ladungskontrolle.

3.1.3 Regulation der ApoA-I, ApoB und ApoE Freisetzung in Hepatozyten durch Adiponectin

3.1.3.1 Einfluss von HMW-Apm auf die Expression und Aktivität von ABCA1 in humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten von drei verschiedenen Spendern wurden mit 10 µg/ml HMW-Apm stimuliert und nach 24 h das Gesamtprotein extrahiert. Die Zellysate wurden mittels Western Blot auf die Menge an ABCA1 Protein und zweier ABCA1 assoziierter Proteine, Syntaxin 13 und Flotillin-1, hin analysiert. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit HMW-Apm keinen Einfluss auf die Expression von ABCA1 und den assoziierten Proteinen hat. Abbildung 16 A zeigt repräsentativ einen Versuch der drei unabhängigen Experimente. Die Menge an ABCA1 wurde auch in HepG2 Zellen überprüft, die ebenfalls mit PBS als Kontrolle oder 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert wurden (Abbildung 16 B). Es zeigte sich auch hier, wie bei den primären Hepatozyten, kein Einfluss auf die Expression des hepatischen ABCA1.

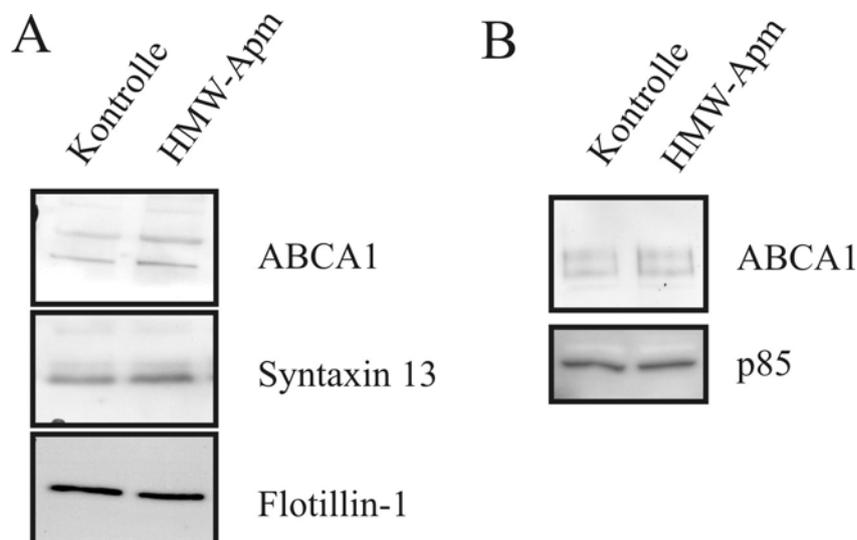


Abbildung 16: (A) Western Blot gegen ABCA1, Syntaxin 13 und Flotillin-1 mit Zellysaten primärer humaner Hepatozyten, stimuliert mit PBS als Kontrolle oder 10 µg/ml HMW-Apm. (B) Western Blot zur Analyse von ABCA1 in HepG2 Zellen, die mit PBS als Kontrolle oder 10 µg/ml HMW-Apm stimuliert wurden. Die PI3 Kinase p85 diente als Ladungskontrolle.

Die Aktivität von ABCA1 lässt sich über den Efflux von Cholesterin und Cholin-Phospholipid auf lipidarmes ApoA-I bestimmen. Dazu wurde in den Überständen von Cholesterin und Cholin-Phospholipid beladenen HepG2 Zellen der basale, durch BSA

vermittelte Efflux, oder der spezifische, ApoA-I vermittelte Cholesterin und Cholin-Phospholipid Efflux bestimmt. Die Zellen wurden zusätzlich mit PBS als Kontrolle oder mit 10 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm inkubiert. In drei unabhängigen Experimenten zeigte sich, dass 10 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm keinen Einfluss auf den ABCA1 vermittelten Lipidefflux und somit keinen Einfluss auf die Aktivität von ABCA1 haben (Abbildung 17)

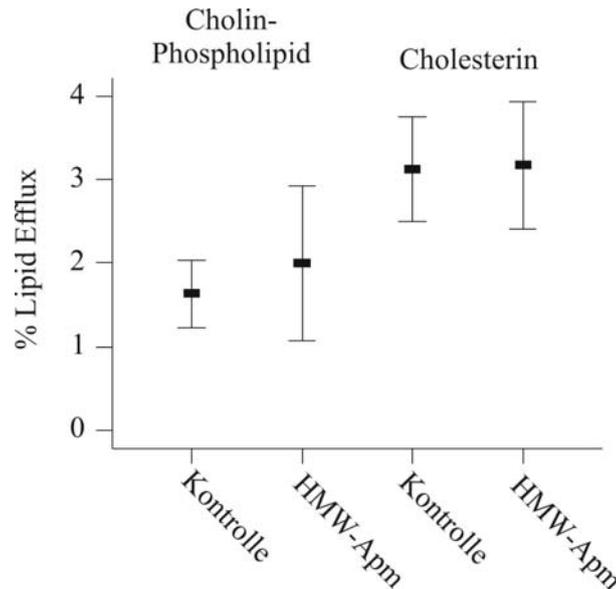


Abbildung 17: ApoA-I vermittelter Cholin-Phospholipid und Cholesterin Efflux von HepG2 Zellen, die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm oder PBS als Kontrolle stimuliert wurden. Der ApoA-I vermittelte Lipid Efflux ist relativ zum BSA vermittelten Efflux angegeben.

3.1.3.2 ApoA-I wird durch HMW-Apm in primären Hepatozyten nicht induziert

Primäre humane Hepatozyten von sechs unterschiedlichen Spendern wurden mit PBS als Kontrolle und mit 10 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h stimuliert. In den Überständen dieser Zellen wurde ApoA-I mittels ELISA gemessen. Die Menge an ApoA-I in den Kontrollen betrug 116 ± 52 mg/dl und 112 ± 58 mg/dl in den HMW-Apm stimulierten Hepatozyten (Abbildung 18).

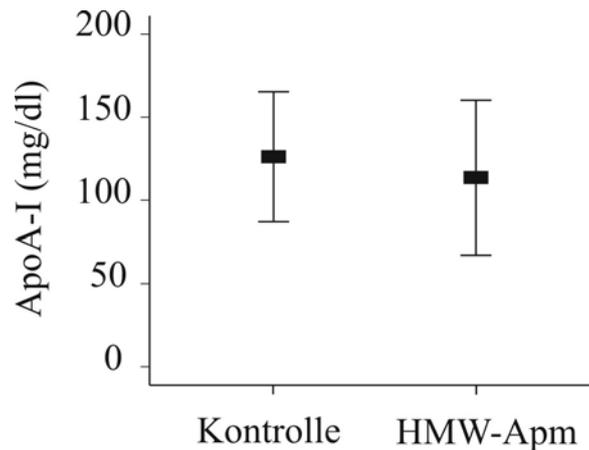


Abbildung 18: ApoA-I wurde mittels ELISA in den Überständen von primären humanen Hepatozyten, die mit PBS als Kontrolle oder 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert wurden, gemessen.

In einer weiteren Stimulationsreihe mit 5 µg/ml und 20 µg/ml HMW-Apm konnte ebenfalls keine Induktion von ApoA-I gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3.3 HMW-Apm reduziert die hepatische ApoB Sekretion

In den Überständen von primären Hepatozyten von vier unterschiedlichen Spendern, die mit 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h inkubiert wurden, wurde die ApoB Sekretion mittels ELISA bestimmt. In den Überständen der Kontrollen lag die Menge an ApoB bei $12,1 \pm 0,9$ mg/dl, während in den Überständen der HMW-Apm stimulierten Zellen mit $9,0 \pm 0,2$ mg/dl signifikant ($p = 0,0002$) weniger ApoB gemessen wurde (Abbildung 19 A).

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt von Apm Dosis-abhängig ist, wurden die primären humanen Hepatozyten von vier weiteren Spendern mit jeweils 1, 2,5, 5, 10 und 20 µg/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert. Es zeigte sich, dass die niedrigen Konzentrationen (1 und 2,5 µg/ml) keinen Einfluss auf die ApoB Sekretion haben. Bei einer Menge von 5 µg/ml HMW-Apm konnte eine auf $78,2 \pm 13,9$ %, verglichen zur Kontrolle (100 %) reduzierte ApoB Sekretion gemessen werden ($p = 0,0009$). Bei 10 µg/ml HMW-Apm sank die ApoB Sekretion auf $68,7 \pm 11,0$ % ($p = 0,002$) und bei 20 µg/ml HMW-Apm auf $52,6 \pm 12,6$ % ($p = 0,003$) gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19 B).

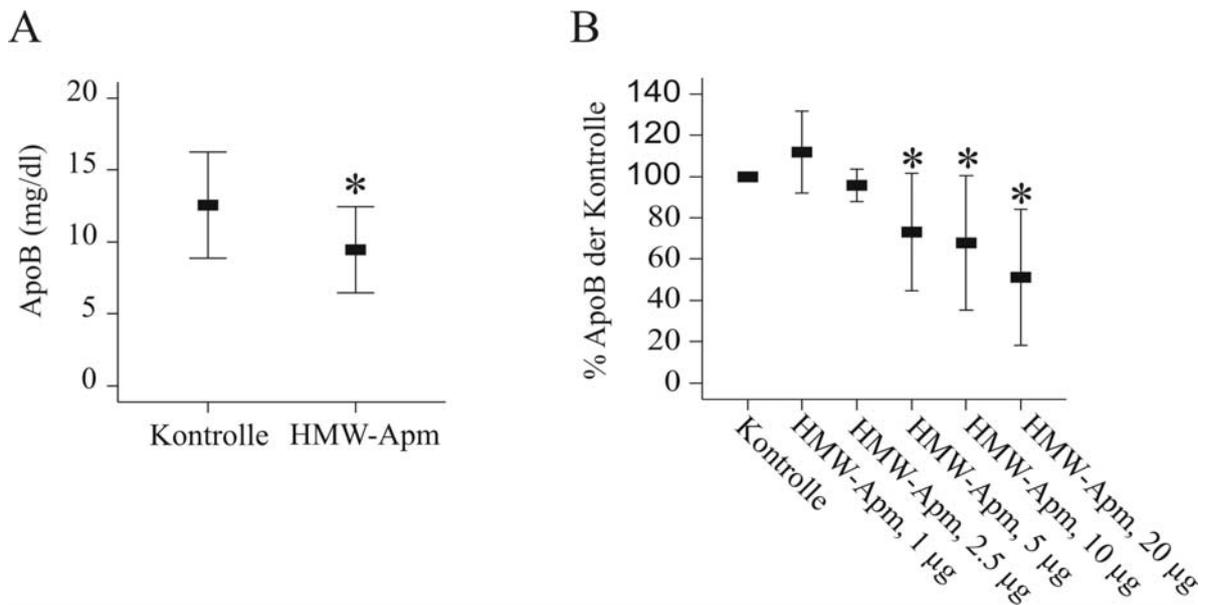


Abbildung 19: ApoB in den Überständen von Hepatozyten inkubiert mit HMW-Apm. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen. (A) ApoB wurde mit ELISA in den Überständen von primären Hepatozyten, die mit PBS als Kontrolle oder 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert wurden, gemessen. (B) ApoB wurde mittels ELISA in den Überständen von primären Hepatozyten gemessen, die entweder mit PBS als Kontrolle, oder mit 1, 2,5, 5, 10, oder 20 µg/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert wurden. Die Sekretion in % der ApoB Freisetzung der Kontroll-inkubierten Hepatozyten dargestellt.

3.1.3.4 HMW-Apm reduziert HNF4- α und HNF4- α regulierte Gene in primären Hepatozyten

Die Auswertung, der unter 3.1.1 beschriebenen GeneChip Hybridisierungen ergab weiterhin, dass die Expression des Transkriptionsfaktors HNF4- α durch HMW-Apm signifikant ($p = 0,02$) auf $70,8 \pm 19,0$ % gegenüber der Kontrolle (100 %) reduziert wurde. In Übereinstimmung mit einer verminderten Expression von HNF4- α zeigte sich, dass Gene wie ABCB4, Aldolase B, ApoB, ApoC-II, der Glukose Transporter 2 (GLUT2) und der Organische Kationen Transporter 1 (OCT1) [106], die alle durch HNF4- α reguliert werden, ebenfalls eine reduzierte mRNA Expression aufwiesen (Tabelle 1).

Gen	Expression (% der Kontrolle)	p-Wert	Regulation
Apolipoproteine			
ApoA-I	109,9 ± 10,7	0,05	NC
ApoA-II	99,0 ± 12,8	0,4	NC
ApoB	73,2 ± 10,8	0,002	D
ApoC-I	78,3 ± 12,2	0,004	D
ApoE	103,6 ± 13,2	0,3	NC
Transkriptionsfaktoren			
HNF4- α	70,8 ± 19,0	0,02	D
HNF1	92,2 ± 23,8	0,3	NC
PPAR- α	100,8 ± 35,0	0,5	NC
LXR α	98,3 ± 21,0	0,4	NC
RXR α	102,0 ± 21,0	0,4	NC
Lipid/Glukose Metabolismus			
ABCB4	49,8 ± 15,5	0,015	D
Aldolase B	41,8 ± 22,5	0,02	D
GLUT2	24,2 ± 19,2	0,01	D
OCT1	63,3 ± 16,4	0,03	D
SR-BI	117,1 ± 60,8	0,1	NC

Tabelle 1: Auswertung der GeneChip Daten für HNF4- α , HNF4- α regulierte Gene und weiterer Gene mit einer Rolle im Lipidstoffwechsel (ApoA-I, ApoA-II, ApoE, ApoB, SRBI, LXR, RXR und PPAR- α). Die Expression der Gene in den HMW-Apm stimulierten Hepatozyten ist relativ zu den Kontrollen (100%) gegeben. Die Regulation ist mit NC (*No Change*) oder D (*Decrease*) relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

Für die HNF4- α regulierten Gene ABCB4, ApoB, GLUT2, OCT1 und HNF4- α selbst wurden Real-Time PCR Assays entworfen um die erzielten GeneChip Daten zu verifizieren (Abbildung 20 A und Tabelle 2). Die erhaltenen Werte wurden mit β -Actin als *Housekeeper* normalisiert. Wie auch schon die GeneChip Daten zeigten war die mRNA Expression von ApoA-II nicht durch HMW-Apm beeinflusst. Weiterhin wurde mit Zelllysaten von Kontroll und HMW-Apm stimulierten primären Hepatozyten die Expression von HNF4- α auf Proteinebene untersucht. Als Ergebnis zeigte sich, dass HNF4- α auch auf Proteinebene durch HMW-Apm reprimiert wird (Abbildung 20 B).

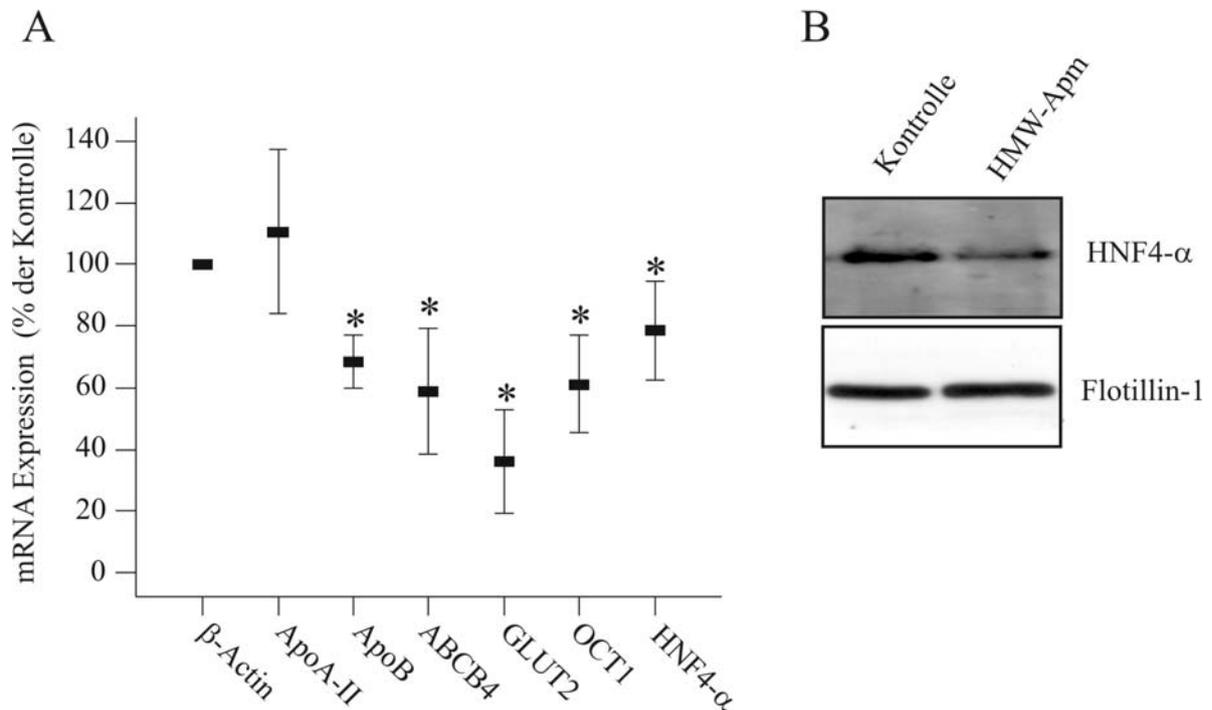


Abbildung 20: mRNA und Protein Expression von HNF4- α und mRNA Expression von HNF4- α regulierten Genen in primären Hepatozyten, die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h stimuliert wurden. **(A)** Die prozentuale Expression von β -Actin, ApoA-II, ApoB, GLUT2, OCT1 und HNF4- α in HMW-Apm stimulierten Hepatozyten von vier unterschiedlichen Spendern, relativ zu den Kontroll stimulierten Zellen ist gezeigt. **(B)** Western Blot gegen HNF4- α mit Zelllysaten von primären humanen Hepatozyten, inkubiert mit PBS als Kontrolle oder 10 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h. Dargestellt ist ein Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

Gen	Expression (% der Kontrolle)	p-Wert
Kontrolle	100	
ABCB4	60 \pm 11	0,007
ApoB	68 \pm 10	0,03
GLUT2	37 \pm 15	0,0001
OCT1	61 \pm 13	0,01
HNF4- α	78 \pm 14	0,008

Tabelle 2: mRNA Expression in % von ABCB4, ApoB, GLUT2, OCT1 und HNF4- α nach Stimulation mit HMW-Apm für 24 h, relativ zur jeweiligen PBS stimulierten Kontrolle (auf 100 % gesetzt).

3.1.3.5 HMW-Apm reduziert die ApoE Freisetzung von primären Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten von vier unterschiedlichen Spendern wurden mit PBS als Kontrolle oder 10 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h stimuliert. In der isolierten mRNA wurde mittels Real-Time RT-PCR die Expression von ApoE untersucht. Nach der Normalisierung

der Daten gegen β -Actin zeigte sich, dass die Kontrollen einen Wert von $0,62 \pm 0,1$ und die HMW-Apm stimulierten Zellen einen Wert von $0,56 \pm 0,1$ hatten und somit die Stimulation mit $10 \mu\text{g/ml}$ HMW-Apm keinen Einfluss auf die ApoE mRNA Expression hat. Die intrazelluläre Menge von ApoE Protein zeigte ebenfalls keine Regulation durch HMW-Apm. Abbildung 21 A zeigt ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen. In den entsprechenden Überständen von Hepatozyten fand sich in den HMW-Apm stimulierten Hepatozytenüberständen jedoch eine deutlich reduzierte Menge an ApoE (Abbildung 21 B).

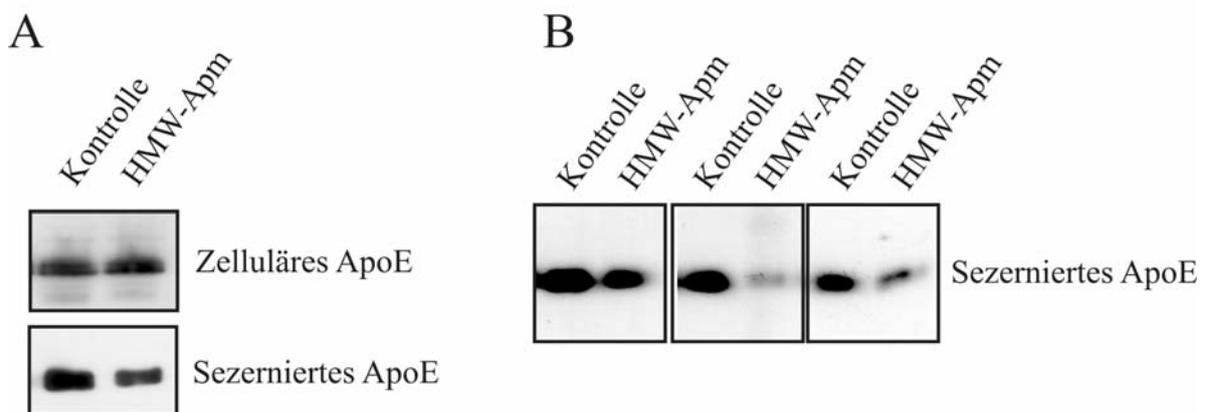


Abbildung 21: (A) Western Blot gegen ApoE in den Zellen und Überständen von primären Hepatozyten, stimuliert mit PBS als Kontrolle oder $10 \mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h. Ein repräsentatives Ergebnis aus vier Experimenten ist gezeigt. (B) Western Blot gegen ApoE in den Überständen von Hepatozyten dreier verschiedener Spender, stimuliert mit PBS oder $10 \mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h.

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt Dosis-abhängig ist, wurden primäre humane Hepatozyten mit unterschiedlichen Mengen an HMW-Apm (1 , 5 , und $10 \mu\text{g/ml}$) für 24 h inkubiert. Die Analyse des sezernierten ApoE im Überstand mit Western Blot zeigte, dass dieser Effekt erst ab einer Dosis von $10 \mu\text{g/ml}$ HMW-Apm zu sehen ist (Abbildung 22).

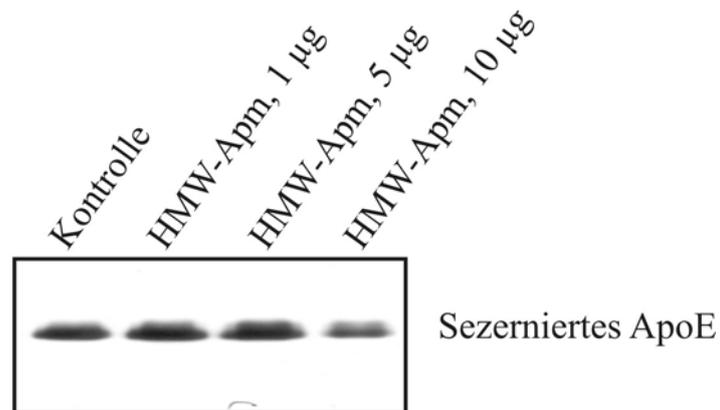


Abbildung 22: Western Blot gegen ApoE in den Überständen von primären humanen Hepatozyten die mit PBS als Kontrolle, oder mit 1, 5, oder 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h inkubiert wurden.

Neben ApoB und ApoE wird die Freisetzung von Apolipoproteinen noch durch den Gehalt an Triglyzeriden und Cholesterin beeinflusst. Deshalb wurden in den mit HMW-Apm stimulierten primären Hepatozyten der intrazelluläre Triglyzerid- und Cholesteringehalt bestimmt. Es zeigte sich, dass HMW-Apm weder die Triglyzeride noch das Cholesterin in diesen Hepatozyten verändert (Daten nicht gezeigt).

3.2 Expression und Regulation der Adiponectin Rezeptoren in Hepatozyten, der Fettleber und der zirrhotischen Leber

3.2.1 Identifizierung des AdipoR2 als 43 kDa Protein

Die initiale Publikation von Yamauchi et al. [64], in der AdipoR1 und AdipoR2 beschrieben wurden, gab für AdipoR1 ein Molekulargewicht von 42,0 kDa und für AdipoR2 ein Molekulargewicht von 35,4 kDa an. Sucht man die humane Referenzsequenz in der Datenbank (NM_024551.2) auf offene Leserahmen (ORF) ab, so findet sich ein ORF mit einer Länge von 1160 bp, der für ein Protein mit einer Größe von ca. 43 kDa kodiert. Nimmt man die homologen Sequenzen für den AdipoR2 aus Maus (NM_197985.3) und Ratte (NM_001037979.1) so liefern auch diese Sequenzen einen ORF mit 1160 bp.

Mit geeigneten Oligonukleotiden wurde die cDNA des AdipoR2 aus der RNA humaner Hepatozyten amplifiziert. Die Sequenzierung ergab ebenfalls einen 1160 bp langen ORF. Dieses cDNA Fragment wurde in den pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA Expressionsvektor kloniert und das Konstrukt für eine anschließende in vitro Translation verwendet. Das resultierende Fusionsprotein wurde im Western Blot mit einem Antikörper gegen das fusionierte V5 Epitop analysiert und lieferte ein Signal mit einer Größe von ca. 43 kDa (Abbildung 23). Die Transfektion des Expressionsvektors in HepG2 Zellen resultierte in der rekombinanten Expression eines 43 kDa Proteins (Daten nicht gezeigt).

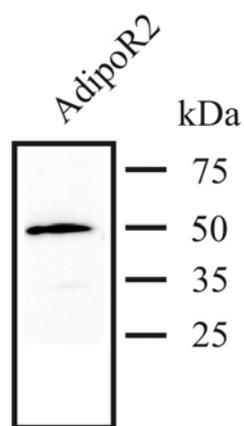


Abbildung 23: Western Blot mit Anti-V5 Antikörper gegen in vitro translatiertes AdipoR2 Protein.

3.2.2 Expression und Regulation des AdipoR1 in humanen Hepatozyten

3.2.2.1 Generierung und Verwendung polyklonaler Anti-Adiponectin Rezeptor Antikörper

Um polyklonale Peptid-Antikörper gegen AdipoR1 und AdipoR2 zu erhalten wurden von der Firma Pineda Kaninchen mit synthetischen Peptiden immunisiert. Für die Immunisierung gegen AdipoR2 wurden einmal die Peptidsequenzen des C-Terminus NH₂-KEFRFMIGGGCSEEDAL-COOH und ein weiteres Mal eine Peptidsequenz aus dem N-terminalen Bereich NH₂-FLLHGHRRPPMPSFRAC-CONH₂ verwendet. Mit der Peptidsequenz NH₂-KRVIANPPKAEEEQTC-CONH₂ aus dem N-terminalen Bereich wurden die Kaninchen gegen AdipoR1 immunisiert. Die Spezifität der erhaltenen Antiseren, bzw. der affinitätsgereinigten IgG-Fractionen wurde mit in vitro translatiertem Protein überprüft. Dazu wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben die cDNAs von AdipoR1 und AdipoR2 mit geeigneten Oligonukleotiden amplifiziert und nach Sequenzierung in den pcDNA3.1/V5-His[©] TOPO[®] TA Expressionsvektor kloniert. Das in vitro translatierte Protein wurde über Western Blot gegen das fusionierte V5 Epitop oder gegen das spezifische AdipoR1 bzw. AdipoR2 Antigen hin untersucht. Es zeigte sich, dass der polyklonale Anti-AdipoR1 Antikörper spezifisch das in vitro translatierte Protein erkannte (Abbildung 24).

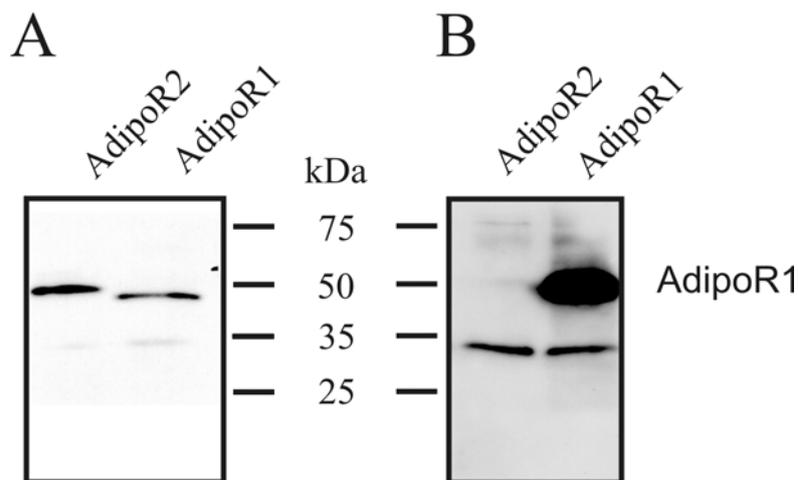


Abbildung 24: Western Blot zur Analyse von in vitro translatiertem AdipoR1 und AdipoR2 Protein mit dem Anti-V5 Antikörper (A) und dem Anti-AdipoR1 Antikörper (B).

Der Test der beiden AdipoR2 spezifischen Antiseren ergab, dass diese für die Anwendung im Western Blot nicht geeignet waren. Sie lieferten kein spezifisches Bandenmuster.

Gleichzeitig zu den von der Firm Pineda erhaltenen Antiseren wurden noch kommerziell erhältliche Antikörper gegen AdipoR2 der Firmen Phoenix Pharmaceuticals, Alpha Diagnostics und Everest Biotech auf ihre Spezifität hin überprüft. Alle getesteten AdipoR2 Antikörper lieferten im Western Blot keine spezifische Bande und waren somit für diese Anwendung ungeeignet.

3.2.2.2 Expression von AdipoR1 in hepatozytären Zelllinien und primären Hepatozyten

Aus den hepatozytären Zelllinien HepG2, PLC/PRF/5 und primären humanen Hepatozyten fünf verschiedener Spender wurde die mRNA isoliert und damit die Expression von AdipoR1 auf mRNA Ebene überprüft. Es zeigte sich, dass AdipoR1 in den HepG2 und PLC/PRF/5 Zellen ungefähr gleich stark vorhanden ist, während in den primären Hepatozyten signifikant weniger AdipoR1 mRNA zu finden war ($p < 0,005$) (Abbildung 25 A). In Übereinstimmung mit den mRNA Daten findet sich dieser Unterschied in der Expression von AdipoR1 zwischen den primären Zellen und den Zelllinien auch auf Proteinebene wieder (Abbildung 25 B).

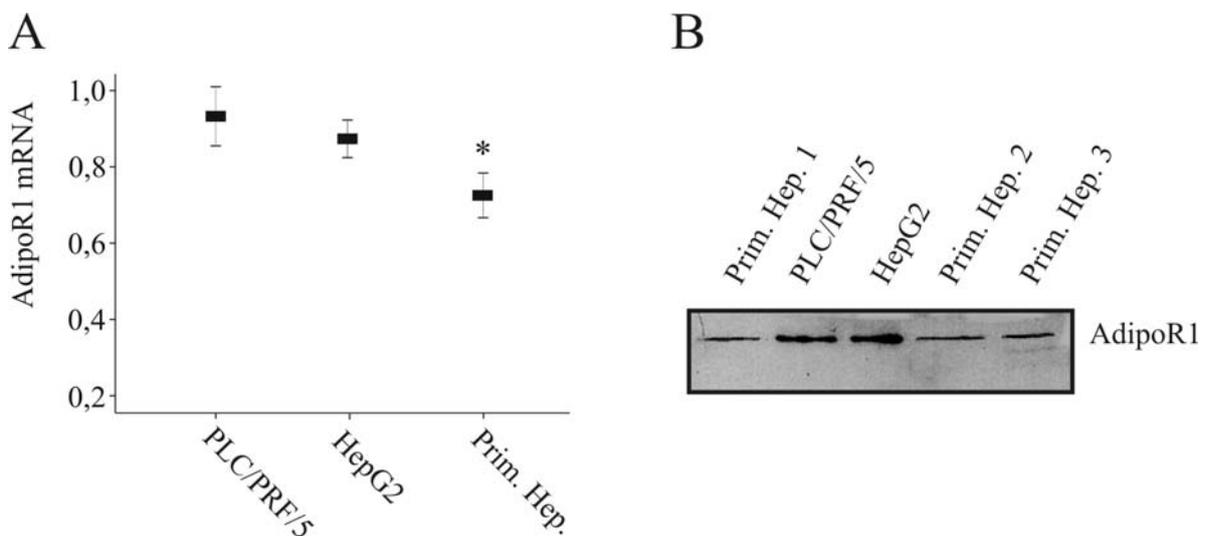


Abbildung 25: Analyse von AdipoR1 in hepatozytären Zelllinien und primären humanen Hepatozyten. (A) Die Real-Time RT-PCR zur Analyse der AdipoR1 mRNA Expression wurde mit RNA Proben isoliert aus HepG2, PLC/PRF/5 Zellen und primären humanen Hepatozyten (prim. Hep.) durchgeführt. Die Daten wurden gegen β -Actin normalisiert (* $p < 0,005$). (B) Western Blot gegen AdipoR1 in Zelllysaten von HepG2, PLC/PRF/5 Zellen und primären humanen Hepatozyten (prim. Hep.).

3.2.2.3 Expression von AdipoR1 in verschiedenen Zelllinien und humanen Geweben

Die Expression des AdipoR1 in verschiedenen Zelllinien wurde mittels Western Blot überprüft. Dieser zeigte, dass die humane Epithelkarzinom Zelllinie HeLa und die humane Kolonkarzinom Zelllinie Caco-2 AdipoR1 exprimieren. In der chinesischen Hamster Ovar Zelllinie CHO war hingegen nur eine sehr geringe Menge an AdipoR1 zu detektieren. Die PLC/PRF/5 Zelllinie diente als Positivkontrolle (Abbildung 26 A).

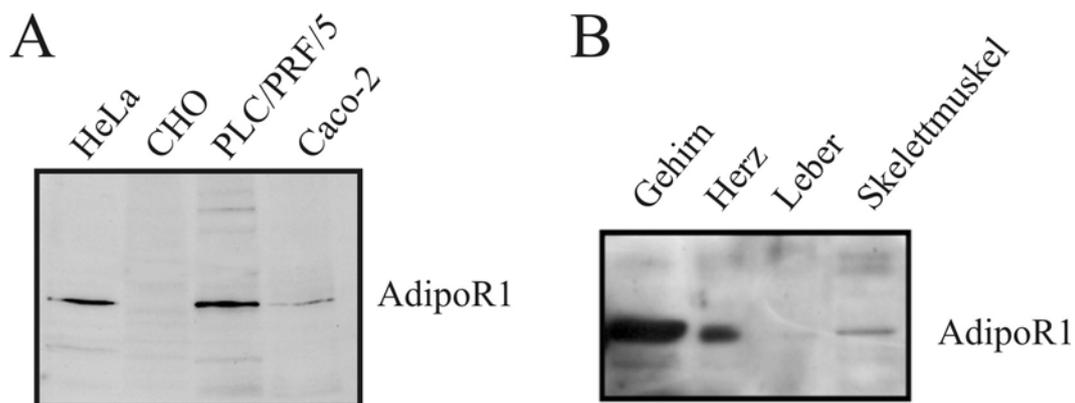


Abbildung 26: (A) Western Blot gegen AdipoR1 in den Zelllysaten von HeLa, CHO PLC/PRF/5 und Caco-2 Zellen. (B) Die Expression von AdipoR1 wurde in verschiedenen humanen Geweben mit dem Anti-AdipoR1 Antikörper untersucht.

Weiterhin wurde die Expression von AdipoR1 in verschiedenen humanen Geweben untersucht. Der Western Blot zeigte, dass AdipoR1 in den Gesamtlysaten von Gehirn und Herz stark exprimiert war, während in Skelettmuskel und in der Leber eine niedrigere Expression auf Proteinebene zu sehen war (Abbildung 26 B).

3.2.3 Regulation von AdipoR1 in humanen Hepatozyten

3.2.3.1 Regulation von AdipoR1 in HepG2 Zellen durch Glitazone

Troglitazon und Pioglitazon sind synthetische Liganden für PPAR- γ . Während Pioglitazon für die Therapie des Typ 2 Diabetes Mellitus verwendet wird [107], schädigt Troglitazon die Leber und wurde deswegen vom Markt genommen. Um zu untersuchen ob die Glitazone Einfluss auf die Expression von AdipoR1 haben, wurden HepG2 Zellen für 18 h mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder 10 μ M Troglitazon (TG) oder 10 μ M Pioglitazon (PG) stimuliert. Aus diesen Zellen wurde entweder RNA isoliert oder

Gesamtzelllysate gewonnen. Die AdipoR1 mRNA Expression wurde weder durch TG noch durch PG reguliert (Daten nicht gezeigt). Die Analyse des Gesamtzelllysats mittels Western Blot lieferte bei der Stimulation mit 10 μ M PG keine Regulation des AdipoR1, während im Gegensatz dazu die Menge an AdipoR1 Protein durch die Stimulation mit 10 μ M TG induziert wurde (Abbildung 27). Da die mRNA von AdipoR1 nicht reguliert ist und nur TG AdipoR1 auf Proteinebene induziert scheint dies ein TG spezifischer, PPAR- γ unabhängiger Effekt zu sein.

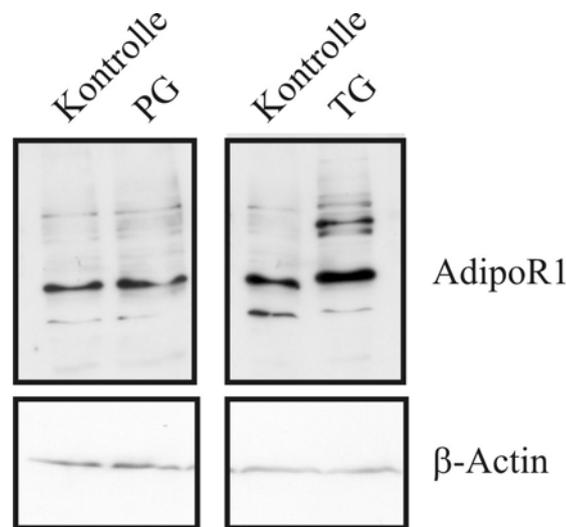


Abbildung 27: Western Blot gegen AdipoR1 mit Zelllysaten von HepG2 Zellen, die mit DMSO als Kontrolle oder mit 10 μ M PG oder mit 10 μ M TG für 18 h stimuliert wurden. Die Expression von β -Actin diente als Ladungskontrolle.

3.2.3.2 Regulation von AdipoR1 in Hepatozyten durch 9-cis-Retinsäure und 25-Hydroxycholesterin

9-cis-Retinsäure (9-cRA) stellt einen natürlichen Liganden des nukleären Rezeptors *Retinoid X Receptor* (RXR) dar, während 25-Hydroxycholesterin (25-OH) ein Ligand des nukleären *Liver X Receptor* (LXR) ist. RXR kontrolliert eine Reihe von Genen, die für den Glukose- und Fettstoffwechsel von Bedeutung sind, und könnte so auch einen Einfluss auf die Expression von AdipoR1 haben. Um dies zu untersuchen wurden HepG2 Zellen mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle bzw. 10 μ M 9-cRA oder 10 μ g/ml 25-OH alleine bzw. in Kombination für 18 h stimuliert. Aus diesen Zellen wurde die mRNA isoliert und mittels Real-Time PCR die Expression von AdipoR1 untersucht. Während 9-cRA keinen Einfluss auf die AdipoR1 mRNA hatte, zeigte sich bei der Inkubation mit 25-OH eine Reduktion der AdipoR1 mRNA auf $59,0 \pm 6,7$ % gegenüber der unstimulierten Kontrolle (100 %). Die

Kombination von 9-cRA und 25-OH bewirkte eine Reduktion auf $62,5 \pm 5,0 \%$ ($p < 0,005$) (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse auf Proteinebene zeigte sich jedoch, dass weder 9-cRA, 25-OH noch die Kombination beider Substanzen einen Einfluss auf die Menge an AdipoR1 Protein in primären Hepatozyten haben (Abbildung 28 A). Das gleiche Resultat lieferte die Analyse der HepG2 Zellen. Die Funktionalität der Inkubation mit 9-cRA und 25-OH in diesen Zellen wurde mit der Expression von ABCA1 in HepG2 überprüft. Dieser Rezeptor wird durch die Kombination 9-cRA/25-OH auf Proteinebene induziert (Abbildung 28 B) [107].

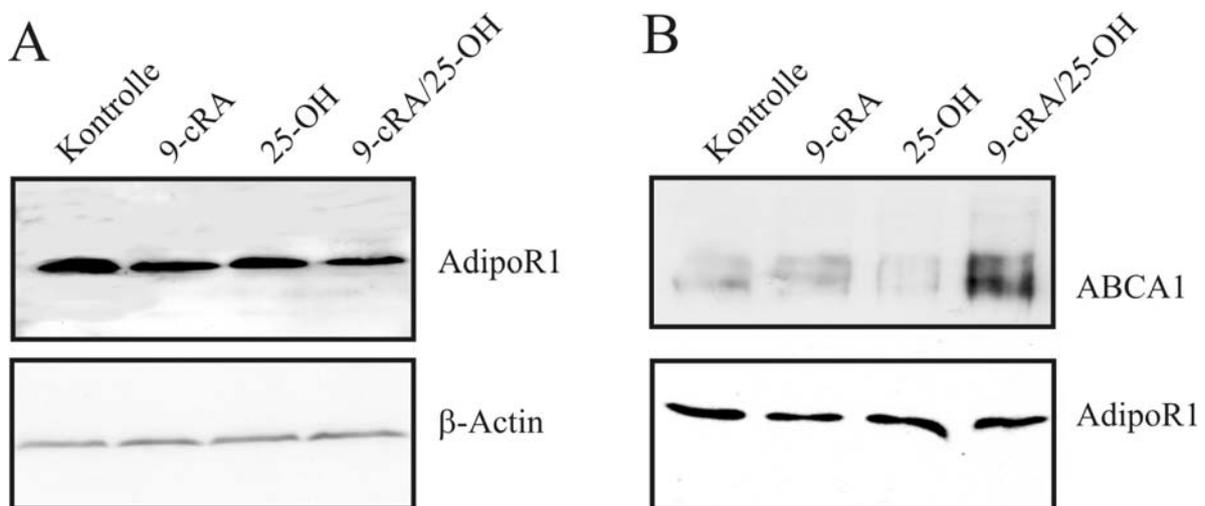


Abbildung 28: Regulation von AdipoR1 durch LXR/RXR Agonisten. (A) Western Blot Analyse der AdipoR1 Expression in primären humanen Hepatozyten, stimuliert mit DMSO als Kontrolle oder mit $10 \mu\text{M}$ 9-cRA, $10 \mu\text{g/ml}$ 25-OH bzw. der Kombination beider Substanzen. AdipoR1 und β -Actin wurden mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. (C) Western Blot Analysen von HepG2 Zellen, die mit 9-cRA, 25-OH, oder beiden Agonisten stimuliert wurden. ABCA1 und AdipoR1 wurden untersucht.

3.2.3.3 Regulation von AdipoR1 in Hepatozyten durch Fenofibrat und HMW-Apm

Fenofibrat ist, wie bereits unter 3.1.2.2 beschrieben, ein potenter Agonist von PPAR- α . Um den Einfluss von Fenofibrat auf die Expression von AdipoR1 zu untersuchen, wurden HepG2 Zellen mit $500 \mu\text{M}$ Fenofibrat für 24 h stimuliert. Bei der Analyse auf mRNA Ebene zeigte Fenofibrat keinen Einfluss auf die Expression von AdipoR1. Auf Proteinebene war jedoch eine Reduktion von AdipoR1 durch Fenofibrat zu beobachten (Abbildung 29 A). Von Adiponectin ist ebenfalls bekannt, dass es seine Wirkung über PPAR- α vermittelt, weshalb sowohl HepG2 Zellen mit 1 oder $5 \mu\text{g/ml}$ HMW-Apm als auch primäre Hepatozyten mit $10 \mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h inkubiert wurden. Bei der Analyse zeigte sich, dass HMW-Apm weder in HepG2 Zellen noch in primären Hepatozyten die

Expression von AdipoR1 auf mRNA oder Proteinebene reguliert. Abbildung 29 B zeigt repräsentativ die Auswertung der mRNA Daten der primären Hepatozyten von fünf unabhängigen Spendern.

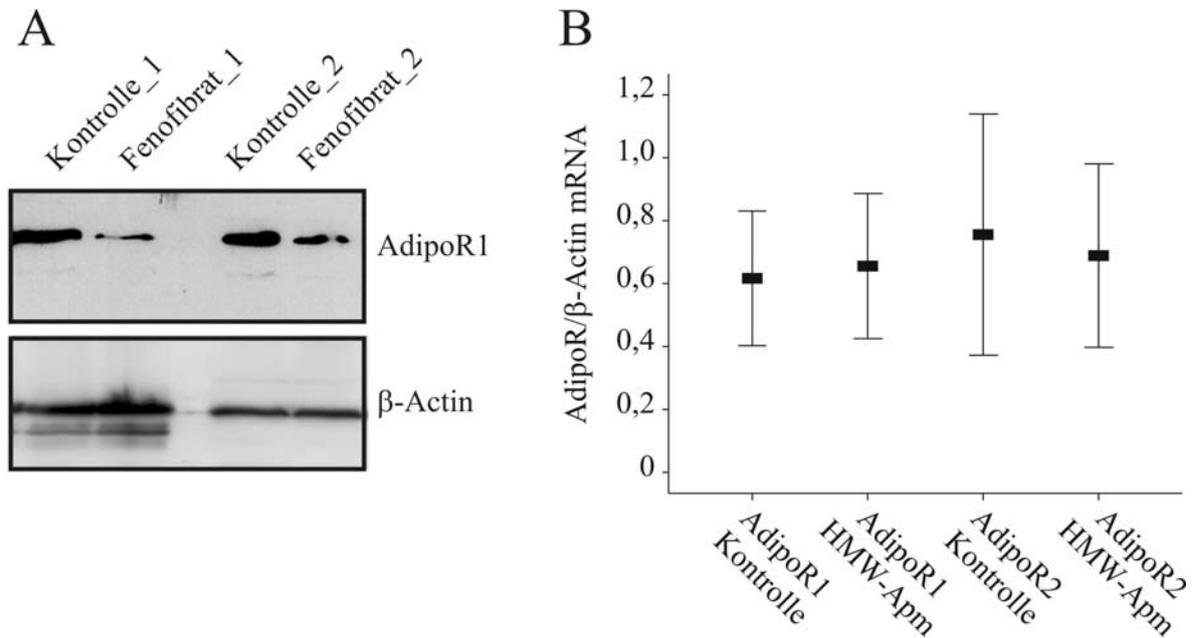


Abbildung 29: (A) HepG2 Zellen wurden mit EtOH als Kontrolle oder mit 500 μ M Fenofibrat für 24 h stimuliert und das isolierte Protein für Western Blot Analysen gegen AdipoR1 und β -Actin als Ladungskontrolle verwendet. (B) Primäre humane Hepatozyten von fünf unabhängigen Spendern wurden mit 10 μ g/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert und die mRNA Expression von AdipoR1 und AdipoR2 mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen β -Actin.

3.2.4 Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell der Fettleber und der Leberzirrhose

3.2.4.1 Regulation von AdipoR1 und AdipoR2 durch Insulin und Leptin

Im Krankheitsbild der Adipositas ist neben Leptin auch Insulin erhöht. Um zu untersuchen ob Insulin bzw. Leptin einen Einfluss auf die Expression von AdipoR1 oder AdipoR2 haben, wurden HepG2 Zellen mit 1 μ M und 10 μ M Insulin für 4 bzw. 6 h oder mit 100 ng/ml Leptin für 24 h stimuliert. Bei der mRNA Expression von AdipoR1 und AdipoR2 zeigten weder Insulin noch Leptin einen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch auf Proteinebene für AdipoR1 wieder. Die Western Blot Analysen zeigten keine Regulation von AdipoR1 durch Insulin oder Leptin (Abbildung 30).

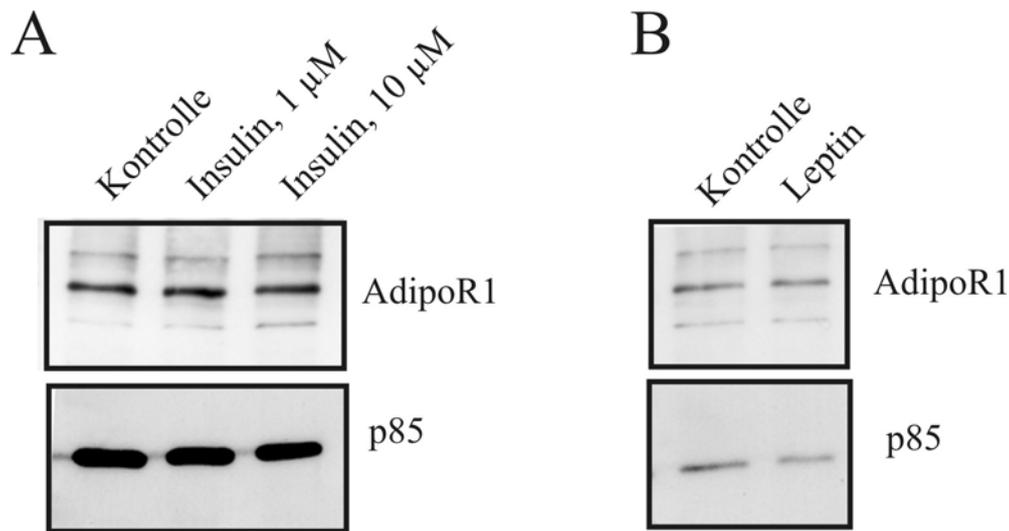


Abbildung 30: (A) Western Blot Analyse der Expression von AdipoR1 in Zelllysaten von HepG2 Zellen die mit 1 und 10 μM Insulin für 4 h stimuliert wurden. (B) Western Blot gegen AdipoR1 in HepG2 Zelllysaten die für 24 h mit 100 ng/ml rekombinantem Leptin stimuliert wurden. Als Ladungskontrolle diente jeweils die p85 Untereinheit der PI3-Kinase.

3.2.4.2 Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell für Fettleber

Von je sechs Wistar Ratten, die auf Hochfett- oder Standarddiät gehalten wurden (siehe 3.1.2.4) (HF-1 bis HF-6 und SC-1 bis SC-6) wurde die Leber entnommen, daraus entweder Gesamt RNA isoliert oder Gesamtprotein gewonnen und zur Analyse der Expression der beiden Adiponectin Rezeptoren verwendet. In der Western Blot Analyse dieser Lebern zeigte sich, dass die Menge an AdipoR1 durch die Hochfettdiät nicht reguliert wird (Abbildung 31 A). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch auf mRNA Ebene wieder, wo keine Regulation der AdipoR1 Expression durch die Hochfettdiät zu beobachten war. Jedoch konnte für AdipoR2 eine Regulation auf mRNA Ebene gezeigt werden. Die Hochfettdiät induziert die AdipoR2 mRNA von $1,0 \pm 0,2$ in der SC Gruppe auf $1,3 \pm 0,2$ in der HF Gruppe ($p = 0,004$) (Abbildung 31 B). Die Real-Time PCR Daten wurden gegen die Expression der GAPDH normalisiert. Wegen der unter 3.2.2.1 dargestellten Spezifität der erhältlichen AdipoR2 Antikörper stehen keine AdipoR2 Western Blot Daten zur Verfügung.

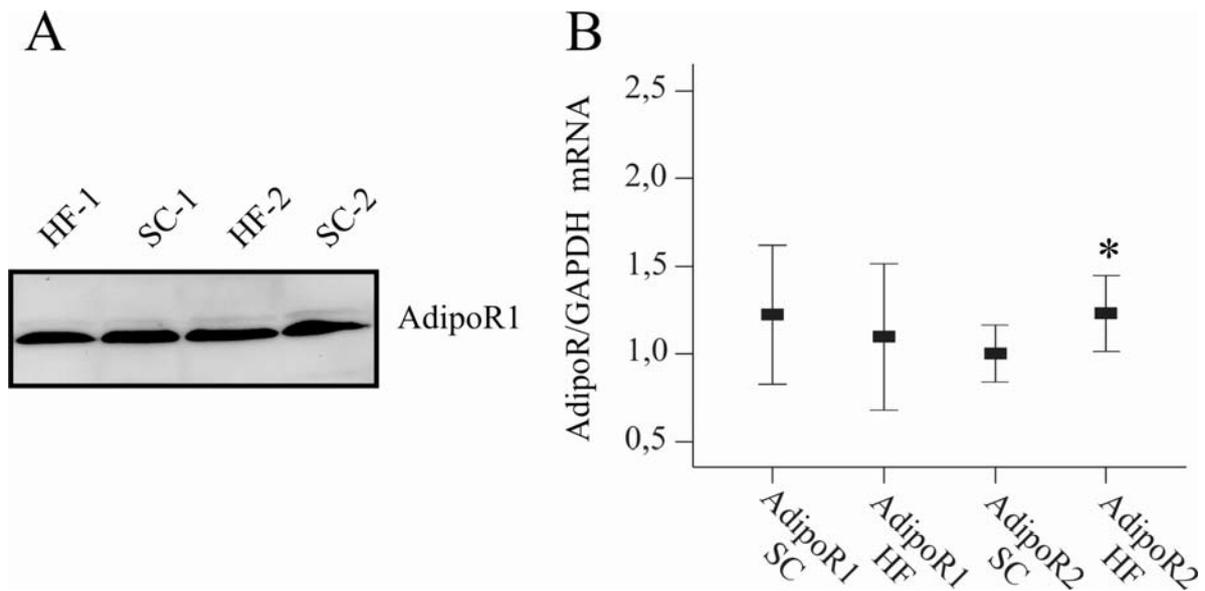


Abbildung 31: (A) Western Blot mit Leberlysaten von männlichen Wistar Ratten, die für 12 Wochen mit Standarddiät (SC) oder Hochfettdiät (HF) gefüttert wurden, zur Analyse der AdipoR1 Menge. Es sind je zwei von insgesamt je sechs Leberlysaten dargestellt. (B) Real-Time RT-PCR Analyse der Adiponectin Rezeptor Expression in RNA Proben aus Lebergewebe der SC und HF Tiere (* $p = 0,004$). Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH.

In den Leberlysaten der beiden Gruppen wurde das Adiponectin mittels ELISA bestimmt und mit dem systemischen Adiponectin dieser Tiere verglichen. Bei der Bestimmung des systemischen Adiponectin lag in den HF-Tieren der Wert bei $4,9 \pm 1,1 \mu\text{g/ml}$ Adiponectin, verglichen mit $6,2 \pm 8,0 \mu\text{g/ml}$ Adiponectin in den SC-Tieren und war somit in den HF-Tieren signifikant erniedrigt ($p = 0,02$) (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei der Bestimmung des Adiponectin in den Leberlysaten. Die HF-Tiere hatten mit $8,5 \pm 2,4 \text{ ng Adiponectin}/\mu\text{g Lebergewebe}$ gegen $11,9 \pm 1,9 \text{ ng Adiponectin}/\mu\text{g Lebergewebe}$ in den SC-Tieren einen signifikant ($p = 0,01$) erniedrigten Adiponectingehalt (Abbildung 32 A).

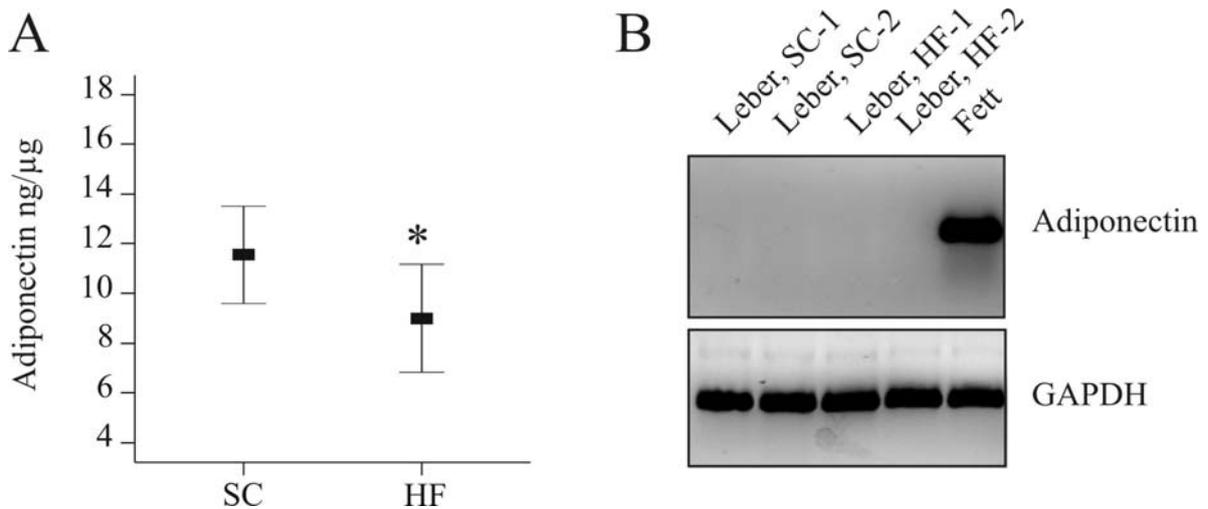


Abbildung 32: (A) In den Leberlysaten der SC und HF Tiere wurde das intrahepatische Adiponectin mittels ELISA bestimmt (* $p = 0,01$). Adiponectin ist in ng pro μg Zelllysate angegeben. (B) RT-PCR der Adiponectin mRNA mit der Gesamt RNA aus Lebergewebe der SC und HF Tiere. Die RNA aus Fettgewebe diente als Positivkontrolle.

Das Adiponectin in der Leber könnte systemischen Ursprungs sein, oder direkt in der Leber synthetisiert werden. Um dies zu klären wurden die isolierten Gesamt RNAs aus den Lebern der HF und SC Tiere mittels RT-PCR auf Adiponectin mRNA hin untersucht, wobei RNA aus Fettgewebe von Ratten als Positivkontrolle verwendet wurde. In der RNA aus dem Lebergewebe konnte, im Gegensatz zur RNA aus dem Fettgewebe keine Adiponectin mRNA amplifiziert werden (Abbildung 32 B). Weiterhin konnte in der RNA isoliert aus humaner Leber, aus isolierten primären humanen Hepatozyten und aus HepG2 Zellen keine Adiponectin mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen ob die Hepatozyten das Adiponectin aus der Zirkulation aufnehmen könnten, wurden primäre humane Hepatozyten mit PBS als Kontrolle oder mit 5, 10, und 20 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm für 24 h inkubiert. Aus diesen Zellen wurde das Gesamtprotein isoliert und die Menge an aufgenommenen Adiponectin über ELISA bestimmt. In den Zelllysaten der Kontroll-inkubierten Hepatozyten konnte kein Adiponectin detektiert werden. Hingegen wurde Adiponectin in den Zelllysaten der Hepatozyten, die mit steigender HMW-Apm Konzentration stimuliert wurden, nachgewiesen. Es lag für die Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ HMW-Apm bei 111 ± 3 ng Apm/ml Zelllysate, mit 10 $\mu\text{g/ml}$ bei 200 ± 18 ng Apm/ml Zelllysate und mit 20 $\mu\text{g/ml}$ bei 360 ± 43 ng Apm/ml Zelllysate (Abbildung 33).

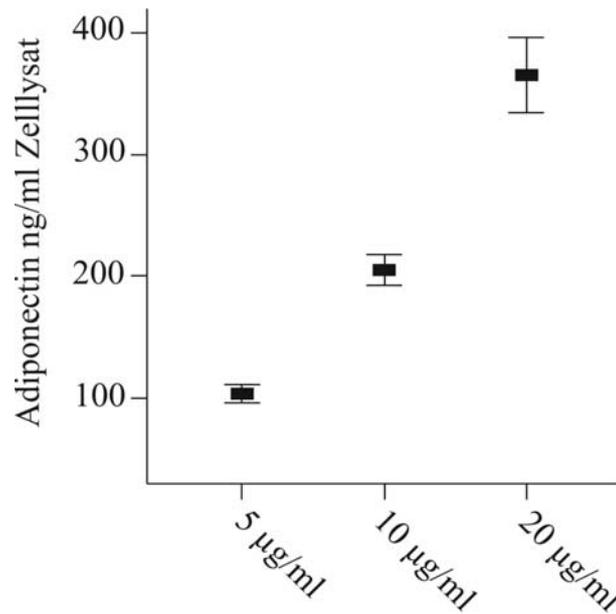


Abbildung 33: Analyse der Adiponectin Aufnahme mittels ELISA in Zelllysaten primärer humaner Hepatozyten, die mit 5, 10 und 20 µg/ml HMW-Apm für 24 h inkubiert wurden.

Somit nehmen die Hepatozyten ca. 0,02 % des extrazellulären Adiponectins auf, wobei die Aufnahme von Adiponectin in die Zellen mit der Konzentration im Überstand korreliert.

3.2.4.3 Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell für Leberzirrhose

Bei Patienten mit einer Leberzirrhose findet man erhöhte Adiponectinspiegel im Serum, weshalb vermutet wurde, dass Adiponectin über die Galle ausgeschieden wird und bei einer gestörten Leberfunktion diese Exkretion nicht effektiv funktioniert [54].

Um dies zu untersuchen wurde ein Tiermodell gewählt bei dem in Mäusen durch Gallengangsligatur (BDL) eine Leberzirrhose induziert wurde. Die entsprechende Kontrollgruppe wurde operiert, jedoch keine Gallengangsligatur durchgeführt. Von je sechs Tieren aus beiden Gruppen wurde nach erfolgreicher Induktion einer Leberzirrhose Serum gewonnen und die Leber entnommen um daraus RNA und Gesamtprotein zu isolieren. Im Serum der Kontroll und BDL Tiere wurde mittels ELISA das systemische Adiponectin bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Tiere mit einer BDL einen signifikant erhöhten Adiponectinspiegel mit $11,1 \pm 2,0$ µg/ml gegenüber den kontrolloperierten Tieren mit $9,0 \pm 0,6$ µg/ml ($p = 0,03$) hatten (Abbildung 34 A). Bei der Bestimmung der hepatischen Adiponectin Konzentration fand sich mit $5,8 \pm 1,0$ ng Apm/µg Lebergewicht für die

Kontrollgruppe und $6,4 \pm 1,5$ ng Apm/ μ g Lebergewicht für die BDL Tiere kein signifikanter ($p = 0,4$) Unterschied (Abbildung 34 B).

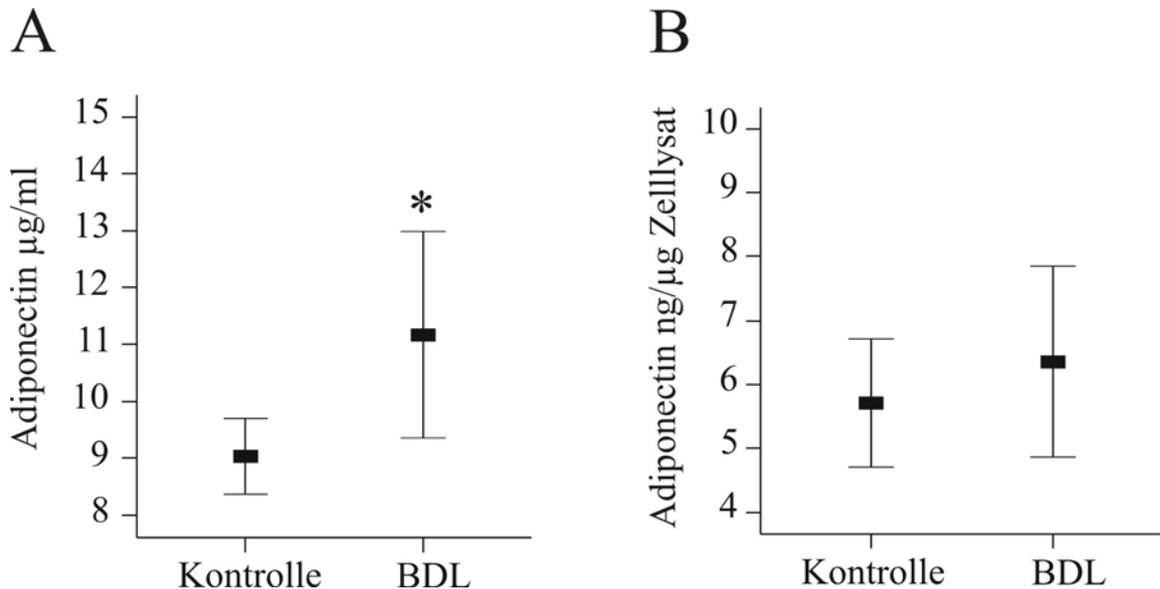


Abbildung 34: (A) Im Serum von Kontrolltieren und BDL Tieren wurde das systemische Adiponectin mit ELISA bestimmt (* $p = 0,0004$). (B) In den Leberlysaten der Kontroll- und BDL Tieren wurde das intrahepatische Adiponectin mittels ELISA bestimmt. Die Konzentration ist ng Apm/ μ g Zelllysate angegeben.

Weiterhin wurde in diesen Tieren die Expression der Adiponectin Rezeptoren untersucht. Bei der Analyse auf Proteinebene wies der AdipoR1 in allen Tieren der BDL Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe eine verminderte Expression auf (Abbildung 35 A). Diese Regulation auf Proteinebene findet sich auch auf mRNA Ebene wieder. Die Real-Time PCR Analysen ergaben für AdipoR1 eine signifikant reduzierte mRNA Expression in den BDL Tieren von $0,2 \pm 0,1$ gegenüber den Kontrolltieren mit $0,8 \pm 0,3$ ($p = 0,0004$). Die Auswertung der mRNA Daten für den AdipoR2 zeigte ein ähnliches Ergebnis. Auch hier fand sich in den BDL Tieren mit $1,2 \pm 0,3$ eine signifikant reduzierte mRNA Expression gegenüber den Kontrollen mit $5,2 \pm 2,6$ ($p = 0,007$) (Abbildung 35 B).

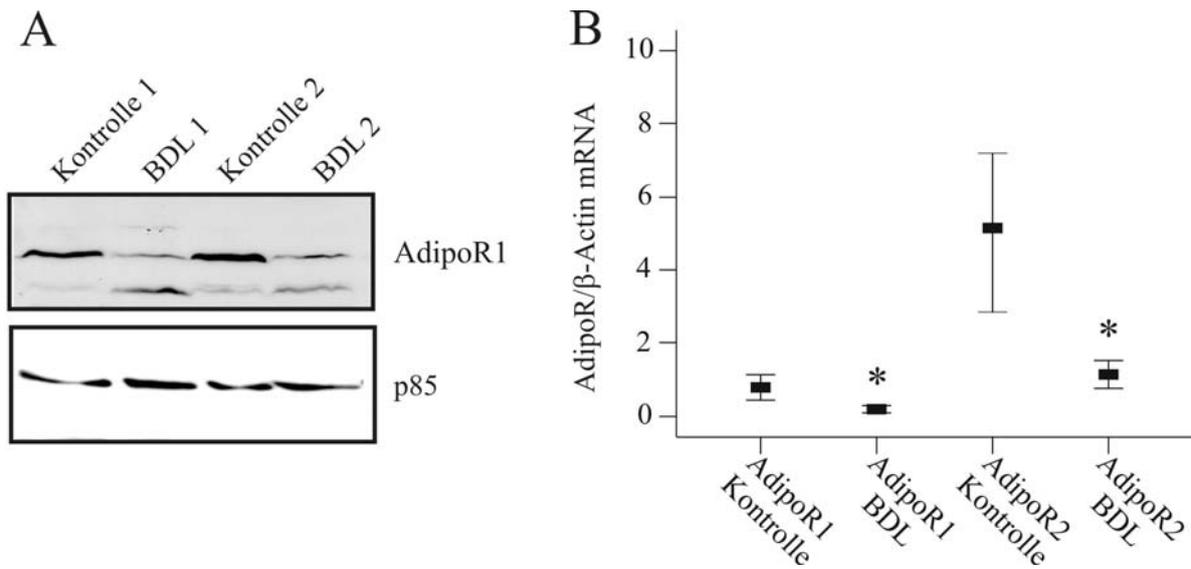


Abbildung 35: AdipoR1 in der Leberzirrhose. **(A)** Western Blot mit Zelllysaten von Kontroll und BDL Tieren zur Analyse der AdipoR1 Menge. Es sind je zwei von insgesamt je sechs Leberlysaten dargestellt. Als Ladungskontrolle diente die p85 Untereinheit der PI3-Kinase. **(B)** Analyse der mRNA Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in der RNA, isoliert aus Lebergewebe von Kontroll und BDL Tieren (* $p < 0,007$). Die Normalisierung erfolgte gegen β -Actin.

Um Mediatoren, die für die reduzierte Expression von AdipoR1 in der Leberzirrhose verantwortlich sind, zu identifizieren, wurden HepG2 Zellen und primäre humane Hepatozyten mit lebertoxischen Substanzen inkubiert. Dabei zeigten weder LPS (1 und 10 $\mu\text{g/ml}$), TNF- α (10 $\mu\text{g/ml}$), die Überstände von aktivierten hepatischen Sternzellen, CCL₄ (1 und 3 mM) noch Actinomycin D (10 $\mu\text{g/ml}$) einen Effekt auf die Expression von AdipoR1 (Daten nicht gezeigt).

3.3 Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Adiponectin Rezeptoren

3.3.1 Auswahl geeigneter Bereiche für ein Hefe Two Hybrid Screening

Das Hefe Two Hybrid Systems eignet sich zum Auffinden von interagierenden Proteinen. Aus diesem Grund wurde dieses System verwendet, um Proteine zu identifizieren, die an die beiden Adiponectin Rezeptoren binden. Geeignete Regionen der Adiponectin Rezeptoren für die Herstellung von Expressionskonstrukten, die im Hefe Two Hybrid Screening zur Anwendung kamen, wurden durch computergestützte Hydrophobizitätsanalysen bestimmt (<http://expasy.org/tools/protscale.html>). N-terminale Bereiche mit einer Länge von 138 Aminosäuren für den AdipoR1 und 150 Aminosäuren für den AdipoR2 und kurze C-terminale Bereiche mit 21 Aminosäuren der beiden Adiponectin Rezeptoren wurden in den Vektor pGBKT7 kloniert. Bei der Auswahl der Bereiche wurde darauf geachtet, dass diese keine Transmembrandomänen enthielten. Nach der Transformation in Hefen induzierte das Konstrukt für den C-Terminus des AdipoR1 artifiziell die Transkription der Reportergene, weshalb dieses Konstrukt auf die letzten 12 Aminosäuren des AdipoR1 reduziert wurde. Der C-Terminus des AdipoR2 zeigte in der Hefe keine unspezifische Aktivierung.

3.3.2 Identifizierung Adiponectin Rezeptor interagierender Proteine und deren Verifizierung

Mit den oben beschriebenen, C- und N-terminalen Konstrukten von AdipoR1 und Adipo2, wurde eine humane Leber cDNA Expressionsbank gescreent. Dazu wurden die beiden Konstrukte in den Hefestamm AH109 transformiert und mit der Leberlibrary im Stamm Y187 gekreuzt. Die verpaarten Hefen wurden auf SD/-Leu/-Trp/-His Agarplatten ausplattiert. Die Kolonien, die nach 3 – 8 Tagen Kultivierung bei 30°C ein Wachstum zeigten, wurden auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Hochselektionsplatten ausgestrichen. Weiterhin wurde aus diesen Hefeklonen mittels Kolonie-PCR die DNA der putativen Interaktionspartner des AdipoR1 bzw. AdipoR2 amplifiziert und durch anschließende Sequenzierung identifiziert.

Durch diese Vorgehensweise wurde β 2-Syntrophin als Interaktionspartner sowohl von AdipoR1 als auch von AdipoR2 und *Gaip C-Terminus-Interacting Protein 1* (GIPC) als Interaktionspartner von AdipoR1 identifiziert.

Für die N-terminalen Bereiche wurde Apolipoprotein A-II als Bindungspartner für AdipoR1 und AdipoR2 gefunden. Dieses Ergebnis wurde jedoch bislang nicht verifiziert.

3.3.2.1 C-terminale Interaktion von AdipoR1 und AdipoR2 mit β 2 Syntrophin

Für β 2-Syntrophin (SNTB2) ist bekannt, dass es an der Insulinfreisetzung in der pankreatischen β -Zelle beteiligt ist, weshalb die Interaktion mit den Adiponectin Rezeptoren genauer untersucht wurde. Zur Proteinfamilie der Syntrophine gehören neben β 2-Syntrophin weiterhin α -Syntrophin (SNTA), β 1-Syntrophin (SNTB1), γ 1- und γ 2-Syntrophin. Die Syntrophine besitzen in ihrer Struktur zwei *Pleckstrin Homology* Domänen (PH), eine *PSD-95/Disc-large/Zonula Occludens-1* Domäne (PDZ), die in der Mitte der ersten PH Domäne liegt und eine *Syntrophin Unique* Domäne (SU) (Abbildung. 36)



Abbildung 36: Struktureller Aufbau der Syntrophine. Die *PSD95/Disc-large/Zonula Occludens-1* (PDZ) Domäne teilt die erste der zwei *Pleckstrin Homology* (PH) Domänen. C-terminal liegt die *Syntrophin Unique* (SU) Domäne.

Von PDZ Domänen ist bekannt, dass sie an die C-terminalen Aminosäuren, vor allem von Rezeptoren, binden, die ihrerseits ein PDZ-Bindemotiv aufweisen. Diese Bindemotive gliedert man wieder in drei Klassen auf. Die beiden Adiponectin Rezeptoren besitzen an ihren C-terminalen Enden jeweils die Sequenz für ein PDZ-Bindemotiv. Die drei C-terminalen Aminosäuren von AdipoR1 (-TTL) entsprechen dem Konsensusmotiv von Klasse I PDZ interagierender Proteinen (-S/T-X- Φ (Φ , hydrophob)), wohingegen die drei C-terminalen Aminosäuren des AdipoR2 (-DAL) der Konsensussequenz -DXL entsprechen, die die Bindung von nNOS an PDZ Proteine vermittelt [108, 109].

3.3.2.2 Verifikation der Interaktionen durch Kotransformationsexperimente

Um die im Two Hybrid Ansatz gefundene Interaktion zwischen GIPC, SNTB2 und den Adiponectin Rezeptoren zu bestätigen wurden Kotransformationsexperimente in Hefen durchgeführt. Weiterhin wurde mit diesem Versuchsansatz überprüft, ob α -Syntrophin (SNTA), von dem eine verringerte Expression im Muskel eines diabetischen Rattenmodells beschrieben war [110], ebenfalls mit den Adiponectin Rezeptoren interagiert. Dazu wurden

die Sequenzen der PDZ Domänen von SNTA, SNTB2 und GIPC mittels RT-PCR aus Hepatozyten cDNA amplifiziert, sequenziert und in den *prey* Vektor pGADT7 kloniert. Diese Konstrukte wurden in Kombination mit den Konstrukten für die C-Termini der beiden Adiponectin Rezeptoren in den Hefestamm AH109 kotransformiert und anschließend auf SD/-Leu/-Trp Agarplatten ausplattiert. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob die Hefen auch beide Vektoren aufgenommen hatten. In Tabelle 3 ist das Schema der Kotransformation und der verwendeten Plasmide dargestellt.

Kombination	<i>bait</i> Vektor (pGBKT7)	<i>prey</i> Vektor (pGADT7)
R1 : SNTA	AdipoR1_C-Term	PDZ_SNTA
R1 : SNTB2	AdipoR1_C-Term	PDZ_SNTB2
R1 : GIPC	AdipoR1_C-Term	PDZ_GIPC
R2 : SNTA	AdipoR2_C-Term	PDZ_SNTA
R2 : SNTB2	AdipoR2_C-Term	PDZ_SNTB2
R2 : GIPC	AdipoR2_C-Term	PDZ_GIPC

Tabelle 3: Kombination der Plasmide die zur Kotransformation in Hefe verwendet wurden.

Von diesen Platten wurden nach 3 – 8 Tagen Kultivierung bei 30°C Einzelkolonien gepickt, die parallel auf SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His und SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatten ausgestrichen wurden, wobei darauf geachtet wurde, dass etwa die gleiche Menge der Hefekolonie je Platte vorhanden war. So konnte auf Grund der zunehmenden Stringenz der Selektion die im Hefe Two Hybrid gefundene Interaktion bestätigt und zusätzlich eine Abschätzung der Stärke der Interaktion getroffen werden. Dieser Versuch zeigte für SNTB2 eine Interaktion mit den C-Termini beider Adiponectin Rezeptoren. Weiterhin wurde für SNTA ebenfalls eine Interaktion mit beiden Rezeptoren beobachtet, während GIPC nur mit dem C-Terminus von AdipoR1 interagiert (Abbildung 37).

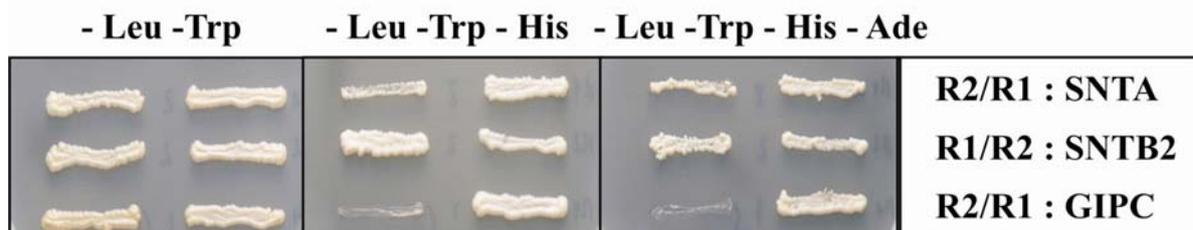


Abbildung 37: Interaktion von AdipoR1 und AdipoR2 mit SNTA und SNTB2. Die Hefen wurden mit den C-Termini der Adiponectin Rezeptoren und den PDZ Domänen von SNTA, SNTB2 und GIPC kotransformiert. Die Interaktion zwischen den PDZ Domänen und den C-Termini der Adiponectin Rezeptoren erlaubt den Hefen ein Wachstum auf Platten den entweder Histidin oder Histidin und Adenin fehlt.

3.3.2.3 Verifizierung der Interaktion durch Hybridisierung des TransSignal PDZ Domänen Arrays

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Kotransformationsversuchen in Hefe wurde der TransSignal PDZ Domänen Array IV hybridisiert. Der Array besteht aus einer PVDF Membran, auf der die PDZ Domänen von unterschiedlichen PDZ Proteinen, unter anderem die PDZ Domänen von SNTA und β 1-Syntrophin (SNTB1) doppelt aufgebracht sind. Dieser Array wurde mit den C-terminalen Peptiden von AdipoR1 und AdipoR2, die in ihrer Größe den Fragmenten entsprachen, die für das Hefe Two Hybrid Screening verwendet wurden hybridisiert. Die Peptide trugen N-terminal einen Histidin-Tag, der nach der Hybridisierung die Signaldetektion mittels Anti-His-Tag Antikörper erlaubte (Abbildung 38).

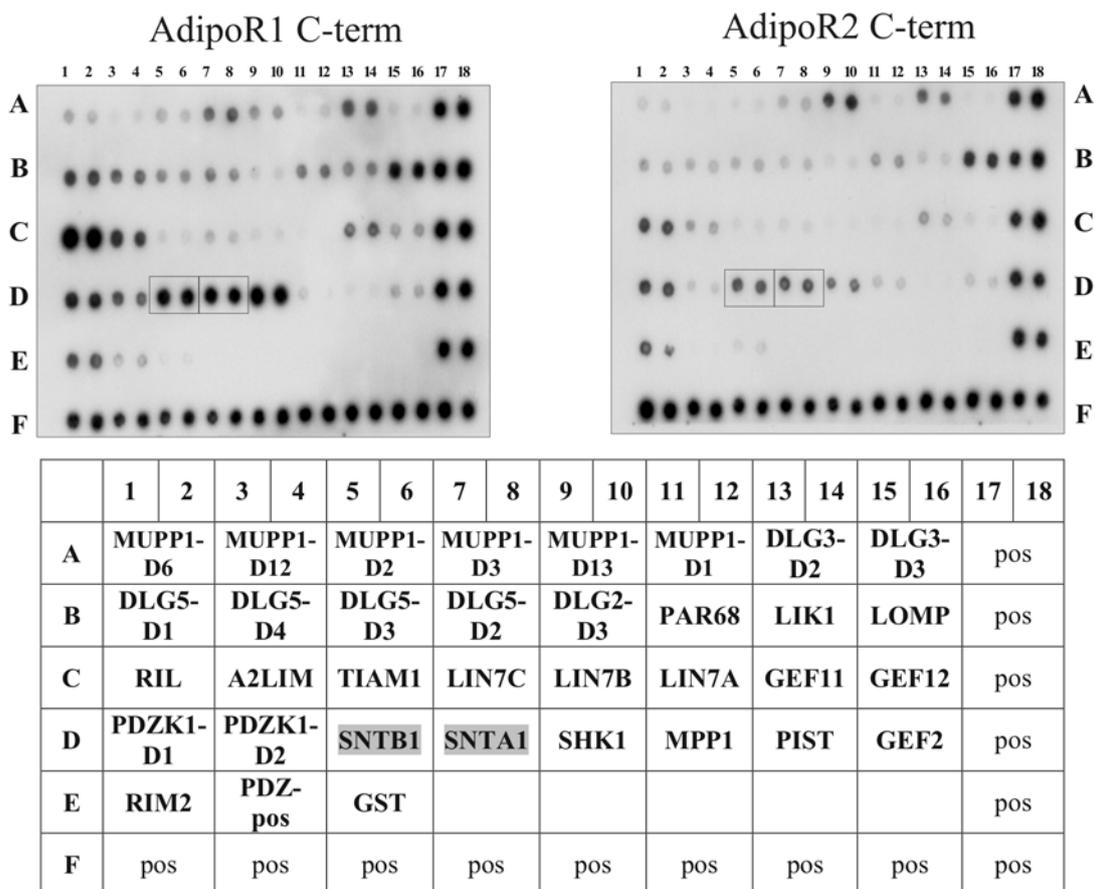


Abbildung 38: Der TransSignal PDZ Domain Array wurde mit den C-terminalen His-getagten Peptiden von AdipoR1 und AdipoR2 hybridisiert. Die Detektion erfolgte über Anti-His Antikörper. Jede PDZ Domäne ist doppelt aufgebracht. Die Tabelle gibt die aufgetragenen PDZ Domänen wieder. Die in Reihe F und Spalte 17/18 aufgetragenen Proteine sind Positionsmarker (pos) zur Orientierung.

Die Auswertung der Hybridisierung mit der Software OptiQuant zeigte, dass die C-terminalen Peptide von AdipoR1 und AdipoR2 an SNTA und SNTB1 binden. Es konnte auch eine Bindung an weitere PDZ Domänen gezeigt werden, jedoch mit einer unterschiedlichen Affinität zwischen den C-Termini der Rezeptoren, wobei einige Interaktionen nur mit dem AdipoR1 C-Terminus zu beobachten waren (Tabelle 4).

PDZ Domäne		AdipoR1	AdipoR2
RIL	Lim Protein RIL	167	47
SHK1	Somastatin Receptor-interacting Protein	122	21
SNTB1	β1-Syntrophin	103	29
LOMP	LIM Domain Only 7 Isoform a	102	59
SNTA	α-Syntrophin	100	40
PDZK1-D1	PDZ Domain Containing 1, Domain 1	89	48
A2LIM	Alpha-Actinin-2-associated LIM Protein	79	0
DLG3-D2	Disc Large Homolog 3, Domain 2	74	38
DLG5-D1	Disc Large Homolog 5, Domain 1	71	0
RIM2	Rab 3 Interacting Protein	57	29
PDZK1-D2	PDZ Domain Containing 1, Domain 2	53	0
MUPP1-D3	Multiple PDZ Domain Protein, Domain 3	51	0
MUPP1-D13	Multiple PDZ Domain Protein, Domain 13	0	61
GEF11	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 11	49	0
LIK1	Lim Domain Kinase 1, Isoform 1	49	0
DLG5-D4	Disc Large Homolog 5, Domain 4	46	0
PAR68	Partitioning Defective-6 Homolog Beta	41	0

Tabelle 4: Der PDZ Domain Array IV wurde mit OptiQuant densitometrisch ausgewertet. Die Signale sind in % relativ zur Signalstärke von AdipoR1 und SNTA, das als 100 % gesetzt wurde, aufgelistet.

3.3.2.4 Verifikation der Interaktion durch Koimmunpräzipitation

Um die Interaktion zwischen den Adiponectin Rezeptoren und SNTA, bzw. SNTB2 weiter zu bestätigen, wurden Koimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Dazu wurde das Gesamtzelllysate aus Lebern von Mäusen entweder mit dem Anti-AdipoR1-Antikörper, oder dem Anti-AdipoR2-Antikörper inkubiert. Zur Immunpräzipitation von AdipoR1 wurde der bereits in 3.2.2.1 beschriebene Antikörper verwendet. Der AdipoR2 Antikörper der Firma IBL (seit 2007 kommerziell erhältlich) erkannte im Western Blot in vitro translatiertes AdipoR2 Protein und wurde für diese Versuche verwendet. Da beide Antikörper in Kaninchen hergestellt wurden, konnte zur Detektion des kopräzipitierten Proteins nur der monoklonale Anti-Pan-Syntrophin Antikörper, der alle Mitglieder der Syntrophin Proteinfamilie erkennt, verwendet. Die SNTA und SNTB2 Antikörper sind ebenfalls in Kaninchen hergestellt und waren für diese Versuche ungeeignet. Der Western Blot zeigte,

dass in den Präzipitaten von AdipoR1 Syntrophin enthalten waren (Abbildung 39 A). Für das Präzipitat von AdipoR2 konnte ebenfalls ein Komplex im Western Blot nachgewiesen werden, im dem jedoch weniger Syntrophin im Vergleich zum Gesamtlysat enthalten war (Abbildung 39 B). Als Kontrolle wurden Immunpräzipitationen (IP) mit zwei anderen Kaninchen Antikörpern, mit dem AdipoR1 bzw. AdipoR2 Antikörper ohne Zusatz von Lysat und mit Lysat ohne Zugabe von AdipoR1 oder AdipoR2 Antikörper durchgeführt. Syntrophin wurde jedoch in keinem dieser Ansätze präzipitiert.

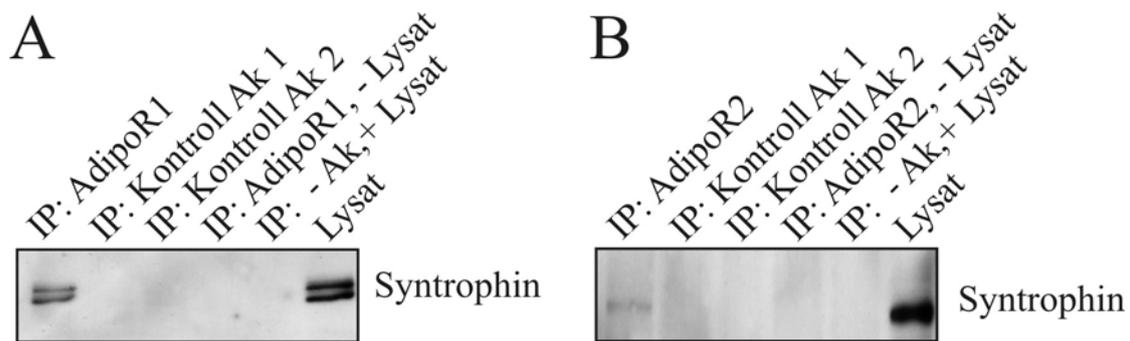


Abbildung 39: Immunpräzipitation von AdipoR1 und AdipoR2 im Lysat von Mausleber. Western Blot mit den Präzipitaten von AdipoR1 (IP: AdipoR1 (A)) und AdipoR2 (IP: AdipoR2 (B)). In der letzten Spur ist die Menge an Zelllysat aufgetragen, die in der IP eingesetzt wurde. Die Detektion erfolgte mit dem Syntrophin Antikörper. IP; Immunopräzipitation; Kontroll AK 1, Kontroll AK 2; polyklonale Kaninchen Antikörper;

3.3.2.5 Orientierung der Adiponectin Rezeptoren in der Plasmamembran

Von Yamauchi et al. [64] wurde die Orientierung der Adiponectin Rezeptoren in der Plasmamembran untersucht, und gezeigt, dass sich der N-Terminus intrazellulär und der C-Terminus extrazellulär befindet. Dies wirft die Frage auf, wie der extrazelluläre C-Terminus mit den intrazellulären Syntrophinen interagieren kann. Eine computergestützte Strukturanalyse (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) ergab, dass die entgegengesetzte Orientierung in der Plasmamembran für beide Rezeptoren theoretisch ebenso wahrscheinlich ist. Um diese Frage zu klären wurde die cDNA von AdipoR1 und AdipoR2 in den pExchange-2 Vektor kloniert. Die Konstrukte für AdipoR1 und AdipoR2 mit einem jeweils C- bzw. N-terminalem FLAG-Tag wurden über Sequenzierung verifiziert. HuH-7 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den AdipoR1 und AdipoR2 Konstrukten bzw. einem Kontrollvektor transfiziert. Die Zellen wurden für 48 h mit und anschließend für 24 h ohne Serum kultiviert. Nach der Fixierung wurde ein Teil der Zellen permeabilisiert, während die andere Hälfte der Zellen nicht permeabilisiert wurde.

Der Flag-Tag wurde mit Hilfe eines FITC markierten Antikörpers, SNTB2 mit dem SNTB2 spezifischen Antikörper und einem Alexa Fluor 546 konjugierten sekundären Antikörper nachgewiesen (gefärbt). Der DNA Farbstoff DRAQ5 wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet. Die gefärbten Zellen wurden mit konfokalem Zeiss LSM510-Meta Lasermikroskop analysiert. Die Auswertung der Bilder zeigte, dass beide Adiponectin Rezeptoren (grüne Fluoreszenz) in der Plasmamembran lokalisiert sind, während SNTB2 (rote Fluoreszenz) überwiegend nahe der Plasmamembran detektiert wurde. Exprimierten die HuH-7 Zellen ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen FLAG-Tag, konnte die Fluoreszenz-Färbung der beiden Adiponectin Rezeptoren sowohl in nicht-permeabilisierten als auch permeabilisierten Zellen detektiert werden, während ein C-terminales FLAG Fusionsprotein der Rezeptoren nur in permeabilisierten Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 40).

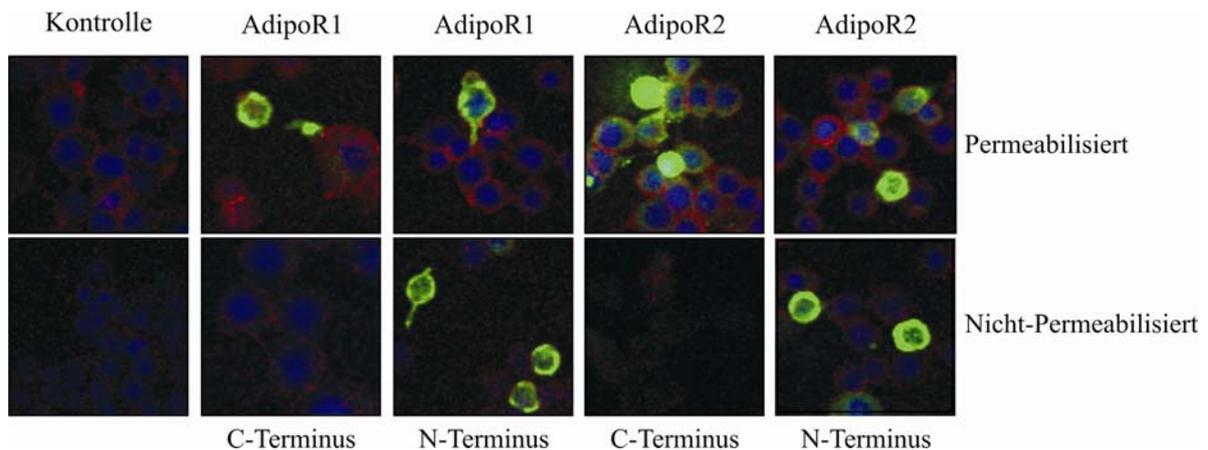


Abbildung 40: Bestimmung der Lokalisation von AdipoR1 und AdipoR2 mit einem C-terminalen oder N-terminalen FLAG-Tag (grün) und von SNTB2 (rot) in permeabilisierten und nicht-permeabilisierten HuH-7 Zellen über Fluoreszenz-Mikroskopie. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) gefärbt.

3.3.2.6 Kolokalisation der Adiponectin Rezeptoren mit den Syntrophinen

Mit der Methode der Immunfluoreszenz lässt sich als weiterer Beweis für die Interaktion der Adiponectin Rezeptoren mit den Syntrophinen eine mögliche Kolokalisation dieser Proteine untersuchen. Die Überlagerung der Einzelbilder liefert bei Kolokalisation eine gelb-orange Färbung. Dazu wurden, wie oben beschrieben, HuH-7 Zellen mit den Plasmiden für die C- oder N-terminale Fusion von AdipoR1 und AdipoR2 transfiziert. Anschließend folgte die Fixierung, Permeabilisierung und Färbung mit DRAQ5 und den Antikörper gegen SNTB2 und FLAG. Die Fluoreszenzbilder zeigten jedoch für die Zellen,

die AdipoR1 oder AdipoR2 mit einem N-terminalen FLAG-Tag überexprimierten, keine Kolokalisation mit SNTB2 (Daten nicht gezeigt). Wurden die Zellen vor der Fixierung mit 10 µg/ml HMW-Apm für 1 min stimuliert war eine deutliche gelb-orange Färbung und somit eine Kolokalisation zu sehen (Abbildung 41). In den HuH-7 Zellen, die AdipoR1 oder AdipoR2 mit einem C-terminalen FLAG-Tag überexprimierten, war keine Kolokalisation mit SNTB2 zu detektieren, auch nicht nach der Stimulation mit 10 µg/ml HMW-Apm. Die Fluoreszenzfärbung mit SNTA Antikörper führte aufgrund einer unspezifischen Kernfärbung dieses Antikörpers zu keinem eindeutigen Ergebnis.

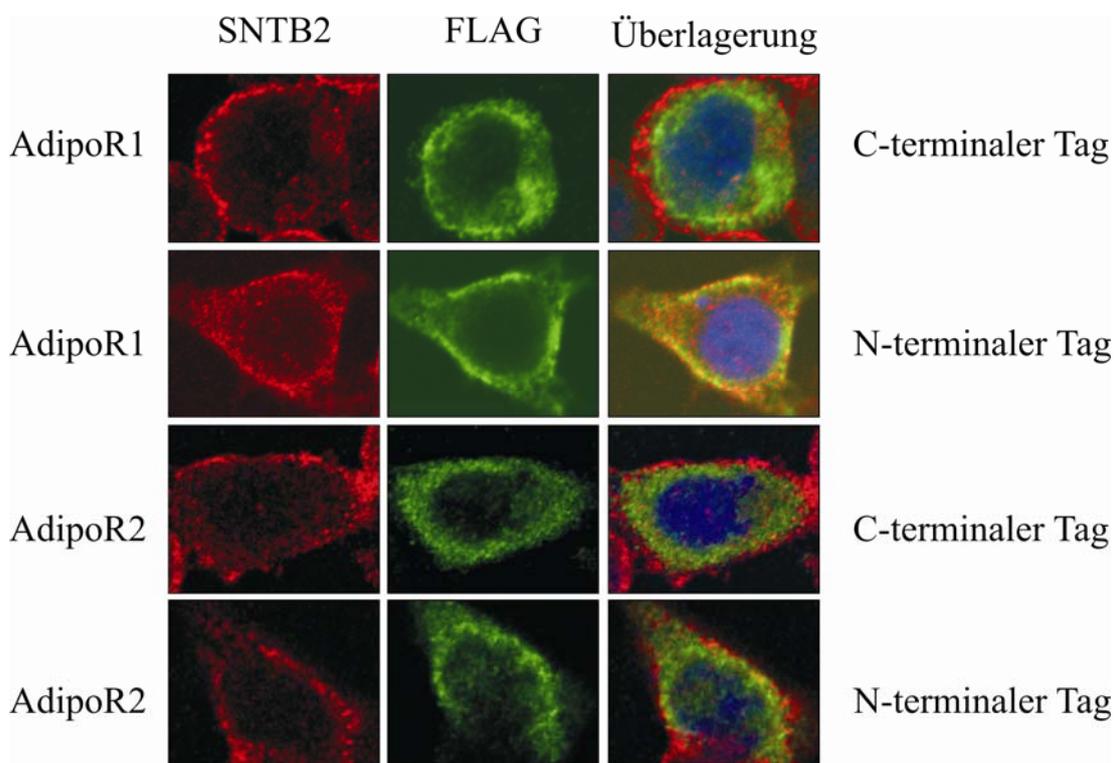


Abbildung 41: Analyse der Kolokalisation mittels Fluoreszenz-Mikroskopie von AdipoR1 und AdipoR2 mit einem C-terminalen oder N-terminalen FLAG-Tag (grün) und von SNTB2 (rot) in permeabilisierten HuH-7 Zellen, die für 1 min mit 10 µg/ml HMW-Apm stimuliert wurden. Die Signale der SNTB2 und der FLAG Einzelfärbung wurden in der letzten Spalte überlagert. Die gelb-orange Färbung zeigt eine Kolokalisation an.

3.3.3 Einfluss von HMW-Apm auf die Expression von SNTA und SNTB2 in Hepatozyten

Um den Einfluss von HMW-Apm auf die Expression von SNTA und SNTB2 zu untersuchen, wurden primäre humane Hepatozyten von fünf unabhängigen Spendern mit 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h inkubiert und anschließend die Gesamt RNA isoliert. Die Real-Time PCR Analyse ergab, dass SNTA durch HMW-Apm auf $80,0 \pm 14,4$ % gegen die Kontrolle (100 %) reduziert wurde ($p = 0,01$), während SNTB2 durch HMW-Apm signifikant ($p = 0,03$) auf $112,12 \pm 11,3$ % gegenüber der Kontrolle (100 %) induziert wurde (Abbildung 42 A).

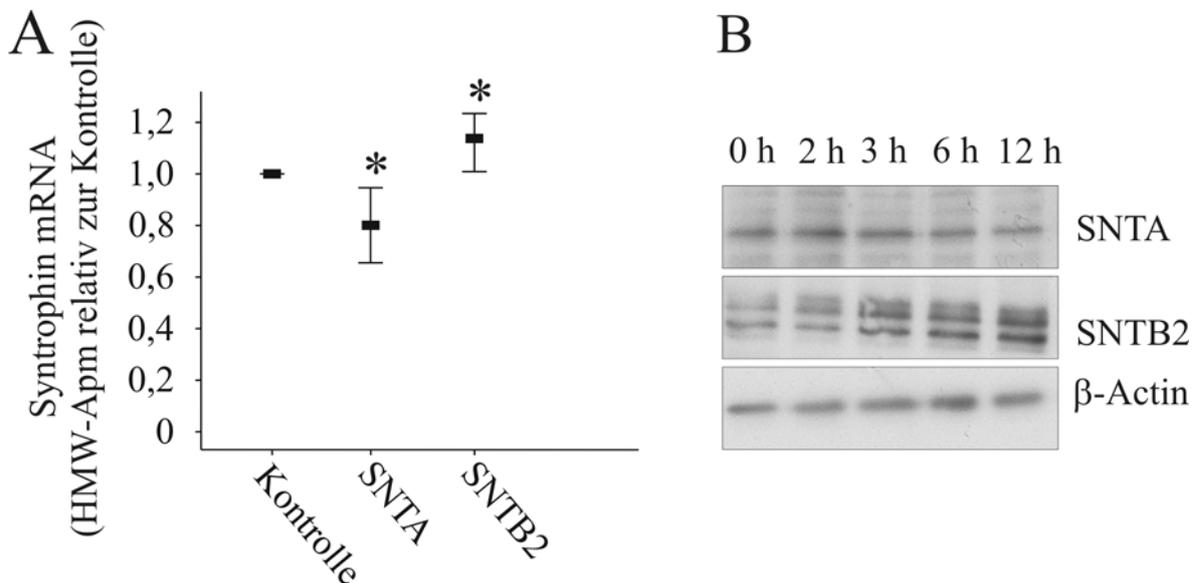


Abbildung 42: (A) mRNA Expression von SNTA und SNTB2 in primären Hepatozyten, die mit PBS als Kontrolle oder mit 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h stimuliert wurden, relativ zu den Kontroll-stimulierten Zellen (100 %) (* $p < 0,03$). Die Normalisierung erfolgte gegen β-Actin. (B) Western Blot mit den Zelllysaten von primären Hepatozyten, die für 2, 3, 6 und 12 h mit 10 µg/ml HMW-Apm stimuliert wurden gegen SNTA und SNTB2. β-Actin diente als Ladungskontrolle.

In einem weiteren Ansatz wurden primäre Hepatozyten mit 10 µg/ml HMW-Apm für 2, 3, 6 und 12 h stimuliert. Im Zelllysate wurde die Menge an SNTA und SNTB2 Protein analysiert. Die Auswertung des Western Blot ergab, dass das SNTA Protein über die Zeit hinweg abnahm, während entsprechend zu den mRNA Daten die Menge an SNTB2 Protein zunahm (Abbildung 42 B).

3.3.4 In vitro Untersuchungen zur Rolle von SNTA und SNTB2 in der Adiponectin Signaltransduktion

3.3.4.1 In vitro Untersuchungen zur Adiponectin Signaltransduktion in SNTA und SNTB2 siRNA behandelten Hepatozyten

Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen den Adiponectin Rezeptoren und den Syntrophinen zu untersuchen wurden siRNA Experimente durchgeführt. Dazu wurden HepG2 Zellen mit siRNA gegen SNTA und SNTB2 oder mit einer Kontroll-siRNA für 72 h behandelt, bevor aus diesen Zellen Gesamt RNA und Gesamt Protein isoliert wurde. Die Analyse auf Protein Ebene mit Western Blot mit den Anti-SNTA und Anti-SNTB2 Antikörpern zeigte eine entsprechende Verminderung von SNTA bzw. SNTB2 in den siRNA behandelten Zellen.

Weiterhin konnte ein entgegengesetzter Effekt der beiden siRNAs auf die Menge an AdipoR1 Protein beobachtet werden. Der Knock-down von SNTB2 führte in den HepG2 Zellen zu einer Reduzierung von AdipoR1, während der Knock-down von SNTA mit einer erhöhten AdipoR1 Proteinmenge einherging. Die Menge an AdipoR2 Protein wurde von keiner der eingesetzten siRNAs verändert (Abbildung 43)

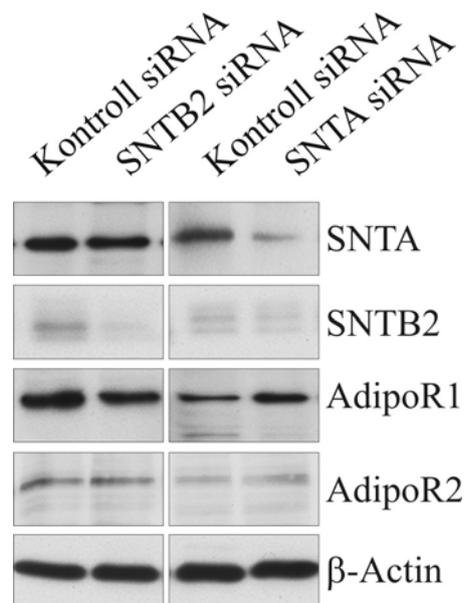


Abbildung 43: Western Blot Analyse der Zelllysate von Kontroll-siRNA und SNTA bzw. SNTB2 siRNA behandelten Zellen. Es wurde mit spezifischen Antikörpern die Menge an SNTA, SNTB2, AdipoR1 und AdipoR2 Protein überprüft. β -Actin diente als Ladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen nach 48 h siRNA Behandlung mit 10 µg/ml HMW-Apm für weitere 24 h stimuliert. Aus diesen Zellen wurde die Gesamt RNA isoliert um die mRNA Expression der Adiponectin regulierten Gene AOX1, ApoB, HNF4-α PEPCCK und den Einfluss der siRNA Behandlung auf die Regulation dieser Gene zu untersuchen. Dazu wurde die mRNA Expression dieser Gene in den HMW-Apm stimulierten Hepatozyten relativ zu den ohne HMW-Apm inkubierten Zellen, die jedoch mit der gleichen siRNA behandelt wurden, berechnet. Die Auswertung der Real-Time PCR ergab, dass AOX1 sowohl in den Kontroll-siRNA als auch in den SNTA und SNTB2 siRNA behandelten Zellen durch HMW-Apm reprimiert wurde (Abbildung 44 A). Für die mRNA Expression von HNF4-α und dessen Zielgen ApoB zeigte sich die erwartete Repression nur in den Kontroll- und SNTA siRNA behandelten Zellen, während die Reduktion in den SNTB2 siRNA inkubierten Zellen nicht zu beobachten war (Abbildung 44 B, C). In den SNTA siRNA behandelten Zellen scheint der Effekt von HMW-Apm auf die Repression von HNF4-α und ApoB verstärkt zu sein, dies war aber gegenüber den Kontroll-siRNA inkubierten Zellen nicht signifikant.

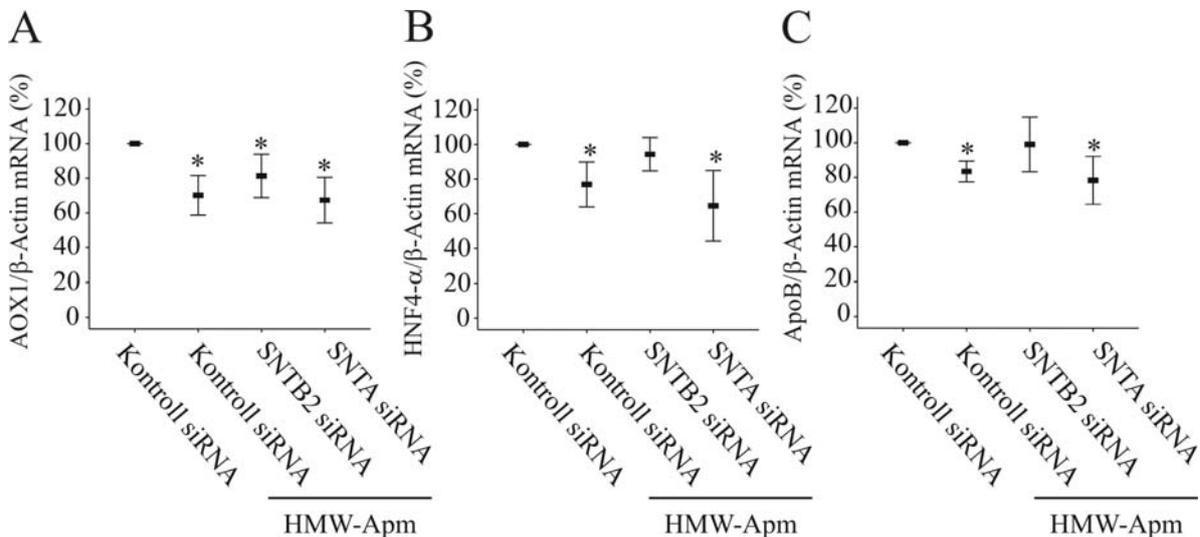


Abbildung 44: Analyse der relativen mRNA Expression von AOX1 (A), HNF4-α (B) und ApoB (C) in RNA von HepG2 Zellen die mit Kontroll-siRNA oder SNTA oder SNTB2 siRNA für 72 h behandelt wurden und zusätzlich für 24 h mit 10 µg/ml HMW-Apm stimuliert wurden. Die Normalisierung erfolgte gegen β-Actin.

Die HepG2 Zellen wurden wie oben beschrieben, mit siRNA behandelt und zusätzlich für 1 min mit 10 µg/ml HMW-Apm stimuliert. Aus diesen Zellen wurde Protein isoliert um den Effekt der siRNA Behandlung auf die Phosphorylierung der *AMP-Activated Protein Kinase* (AMPK) und der *Acetyl-CoA Carboxylase* (ACC) zu untersuchen. Die Analyse der Western

Blots ergab, dass in den HepG2 Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, die Phosphorylierung der ACC durch HMW-Apm induziert wurde. Bei den Zellen mit dem SNTB2 Knock-down war die Induktion der ACC-Phosphorylierung durch HMW-Apm gegenüber der Kontroll-siRNA behandelten Zellen deutlich reduziert, während bei den SNTA behandelten HepG2 Zellen keine HMW-Apm induzierte Phosphorylierung der ACC zu beobachten war. Die SNTA siRNA inkubierten Zellen hatten auch eine deutlich reduzierte Menge an ACC Protein (Abbildung 45 A).

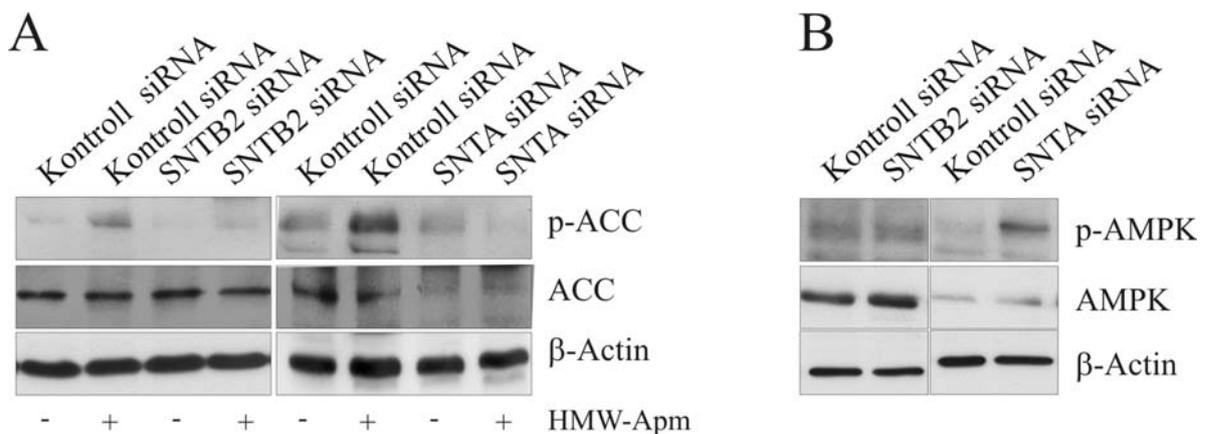


Abbildung 45: Western Blot Analyse der Zelllysate von Kontroll-siRNA und SNTA bzw. SNTB2 siRNA behandelten Zellen nach 72 h Inkubation mit siRNA und einer zusätzlichen Stimulation mit 10 µg/ml HMW-Apm für 1 min. **(A)** Einfluss der SNTA und SNTB2 siRNA auf die Menge an ACC und die HMW-Apm induzierte Phosphorylierung der ACC (p-ACC). **(B)** Einfluss der SNTA und SNTB2 siRNA Behandlung auf die basale Menge an AMPK und p-AMPK. β-Actin diente jeweils als Ladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen.

Die reduzierte Menge an phosphoryliertem ACC (p-ACC) und Gesamt ACC Protein könnte durch eine erhöhte Menge an phosphorylierter AMPK (p-AMPK), eine der ACC vorgeschaltete Kinase erklärt werden. In den SNTB2 siRNA behandelten HepG2 Zellen zeigte sich kein Unterschied von basaler AMPK und p-AMPK zu den Kontroll-siRNA behandelten Zellen, während in den SNTA siRNA inkubierten Hepatozyten basal vermehrt p-AMPK detektiert werden konnte (Abbildung 45 B).

3.3.5 Expression der Adiponectin Rezeptoren und Adiponectin regulierter Gene in der Leber von Syntrophin Knock-out Mäusen

3.3.5.1 Expression der Adiponectin Rezeptoren in den SNTA, SNTB2 und SNTA/B2 Knock-out Tieren

Um zu klären ob die Interaktion der Adiponectin Rezeptoren mit SNTA und SNTB2 auch in vivo von Bedeutung ist wurde eine Kooperation mit Prof. Marvin Adams initiiert. Serum und Lebergewebe der SNTA, der SNTB2 und der SNTA/B2 Knockout Mäuse (SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-}) [102] und der entsprechenden Wildtyp (WT) Mäuse wurden von Prof. Adams zur Verfügung gestellt. Aus je vier Tieren der vier Gruppen wurde die Leber entnommen und daraus Gesamt RNA oder Gesamt Protein isoliert. Mit den Lysaten aus dem Lebergewebe wurde über Western Blot das Fehlen von SNTA und SNTB2 bestätigt (Abbildung 46 A). Die Deletion von SNTB2 führte dazu, dass SNTB1 leicht reduziert war und ein niedermolekulares Spaltprodukt detektiert wurde.

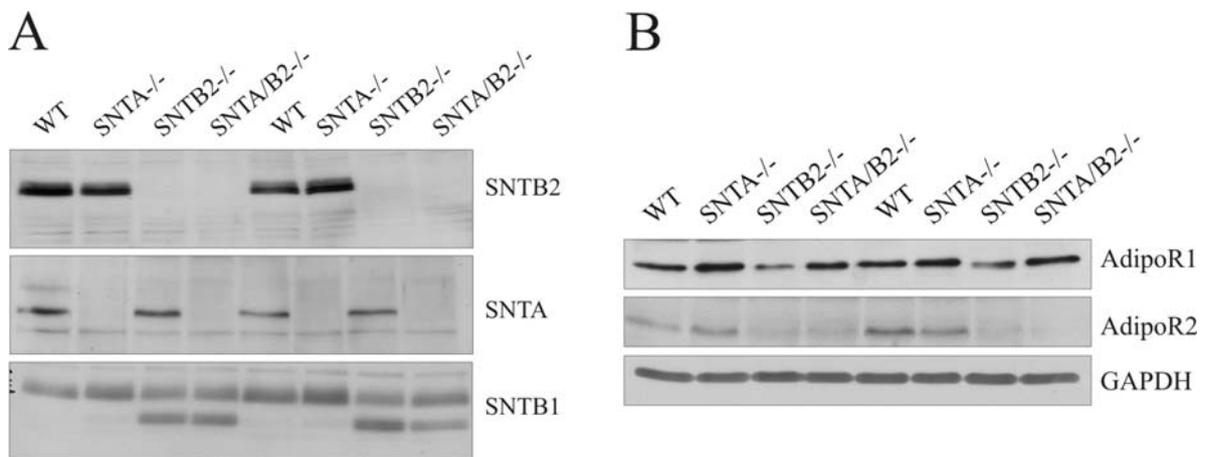


Abbildung 46: Western Blot Analyse der Syntrophine (A) und der Adiponectin Rezeptoren (B) im Lysat von Lebergewebe von WT und SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Mäusen mit spezifischen Antikörpern gegen SNTA, SNTB2 und SNTB1. Repräsentativ sind jeweils zwei Tiere aus jeder Gruppe dargestellt.

Die Analyse der Menge an AdipoR1 in den Leberlysaten ergab, dass AdipoR1 in der SNTA^{-/-} Maus erhöht war. Im Vergleich dazu zeigte die SNTB2^{-/-} Maus eine reduzierte Menge an AdipoR1 Protein, während AdipoR1 in der SNTA/B2^{-/-} Maus in etwa der WT Maus entsprach. Die AdipoR1 mRNA war auch in den Lebern der SNTA/B2^{-/-} Tiere erhöht, die Induktion war jedoch weniger stark ausgeprägt als in den SNTB2^{-/-} Tieren (Abbildung 47 A). AdipoR2 war in der Leber der SNTA^{-/-} Maus in etwa gleicher Menge

vorhanden wie in den WT Tieren, hingegen zeigten sowohl die *SNTB2*^{-/-} Maus als auch die *SNTA/B2*^{-/-} Maus eine deutlich reduzierte Menge AdipoR2 (Abbildung 46 B).

Diese Regulation findet sich auch auf mRNA Ebene wieder. Die AdipoR2 mRNA war in den Lebern der *SNTB2*^{-/-} und der *SNTA/B2*^{-/-} Tiere reduziert. Die *SNTA*^{-/-} Tieren zeigten eine starke Induktion der hepatischen AdipoR2 mRNA (Abbildung 47 B).

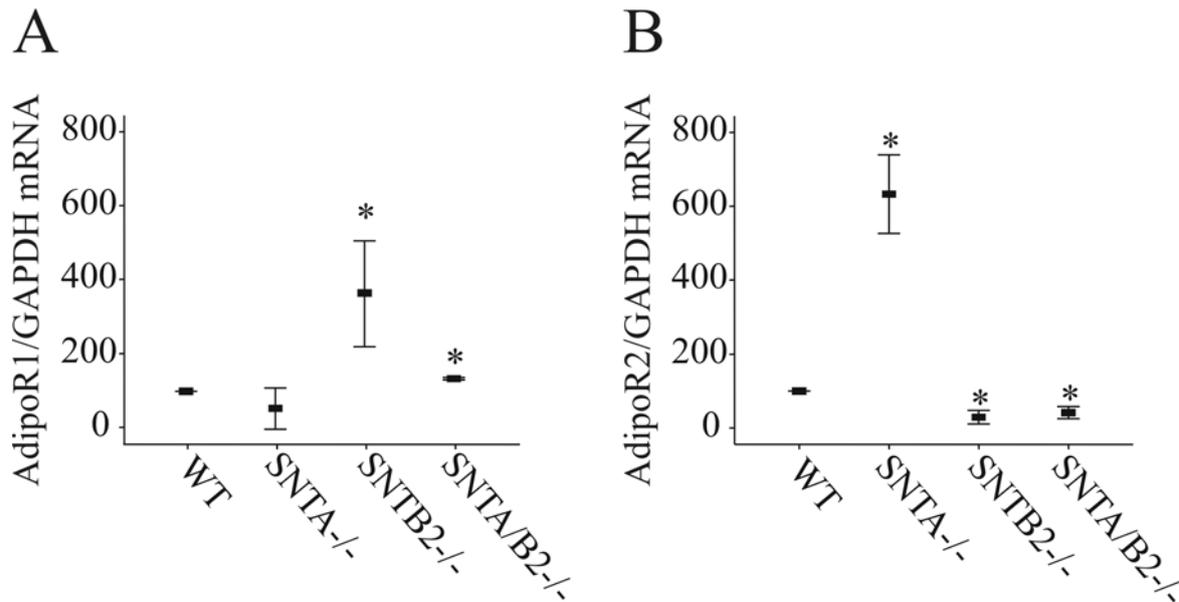


Abbildung 47: Analyse der mRNA Expression von AdipoR1 (A) und AdipoR2 (B) in Lebergewebe von WT und *SNTA*^{-/-}, *SNTB2*^{-/-} und *SNTA/B2*^{-/-} Mäusen. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH.

3.3.5.2 Expression von Adiponectin regulierten Genen in der Leber der Syntrophin Knock-out Tiere

In den Leberproben der Wildtyp und Knock-out Tiere wurde die mRNA Expression von PPAR- α , Catalase und Acyl-CoA Oxidase (ACOX) untersucht und die Regulation von HNF4- α und ACOX auf Proteinebene analysiert. Die Auswertung der Real-Time PCR ergab für PPAR- α , Catalase und ACOX die gleiche Regulation. Diese drei Gene waren in den RNA Proben der *SNTA*^{-/-} Maus gegenüber den WT Tieren stark induziert und im Vergleich dazu in den RNAs der *SNTB2*^{-/-} Maus und *SNTA/B2*^{-/-} Maus vermindert exprimiert (Abbildung 48 A, B, C). ACOX war, entsprechend den mRNA Daten, auch auf Protein Ebene in den Leberlysaten der *SNTA*^{-/-} Tiere induziert und in den Lysaten der *SNTB2*^{-/-} und *SNTA/B2*^{-/-} Tiere reduziert. HNF4- α zeigte lediglich in der *SNTB2*^{-/-} Maus eine Induktion auf Protein Ebene (Abbildung 48 D).

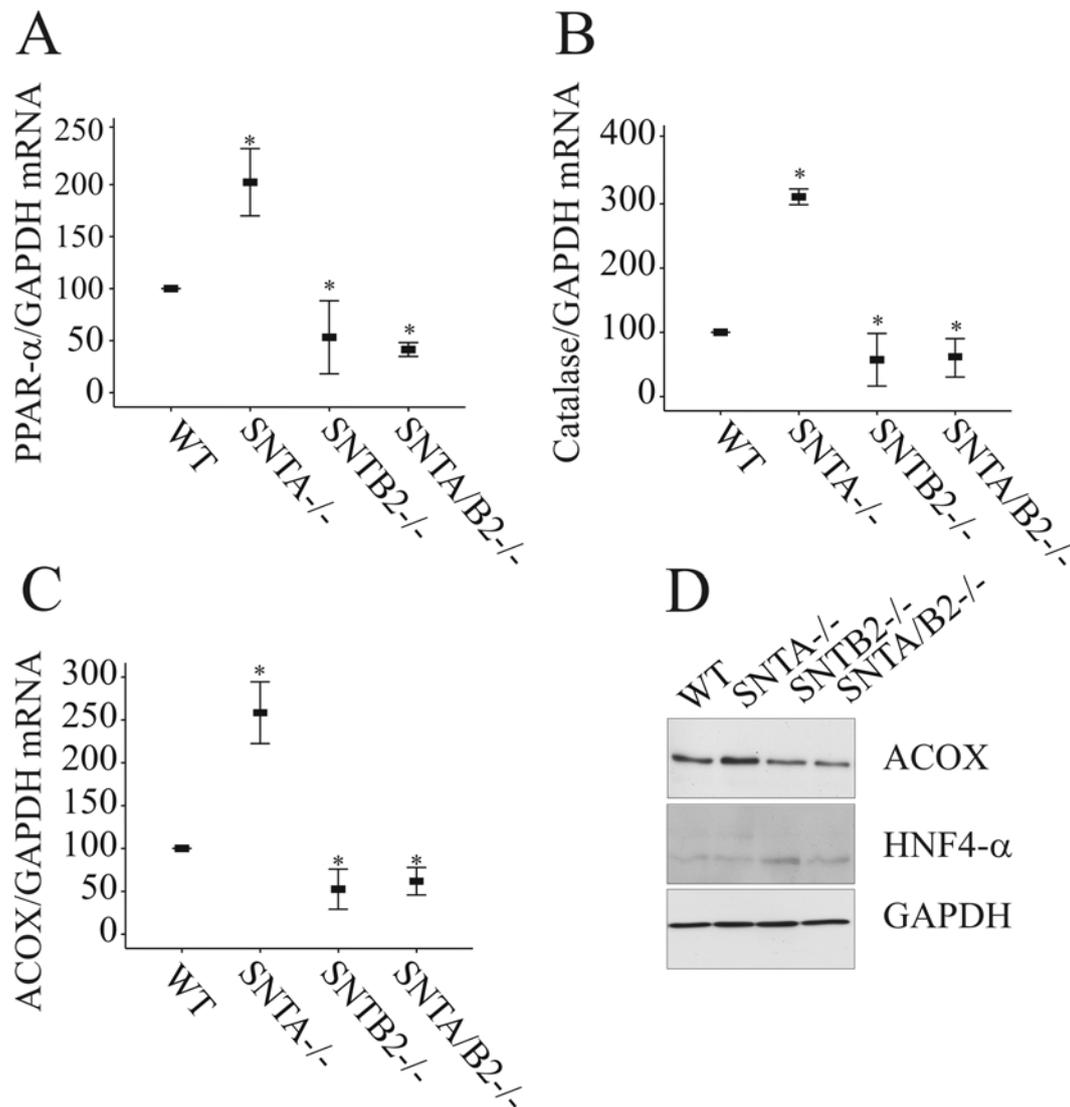


Abbildung 48: Analyse der mRNA Expression von PPAR- α (A) Catalase (B) und ACOX (C) in RNA aus Lebergewebe von WT und SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Mäusen. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. (D) Western Blot Analyse von ACOX und HNF4- α im Lysat von Lebergewebe von WT und SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Mäusen. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

3.3.6 Metabolische Charakterisierung der Syntrophin Knock-out Tiere

Um zu untersuchen, ob die Deletion von SNTA oder SNTB2 einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel der Tiere hat, wurden diese einem intraperitonealem Glukose Toleranz Test (IPGTT) und einem intraperitonealem Insulinsensitivitätstest unterzogen. Im IPGTT zeigten die SNTA^{-/-} Tiere und die SNTB2^{-/-} Tiere eine gestörte Glukosetoleranz, wohingegen die SNTA/B2^{-/-} Tiere eine normale Glukosetoleranz aufwiesen (Abbildung 49 A). Bei der Analyse der Insulinsensitivität zeigten lediglich die SNTB2^{-/-} Mäuse eine reduzierte Insulinsensitivität. Die SNTA^{-/-} Mäuse hatten sogar eine leicht verbesserte

Insulinsensitivität, es zeigte sich aber beim Vergleich der einzelnen Messwerte kein signifikanter Unterschied. Die SNTA/B2^{-/-} Mäuse verhielten sich wie die WT Mäuse (Abbildung 49 B).

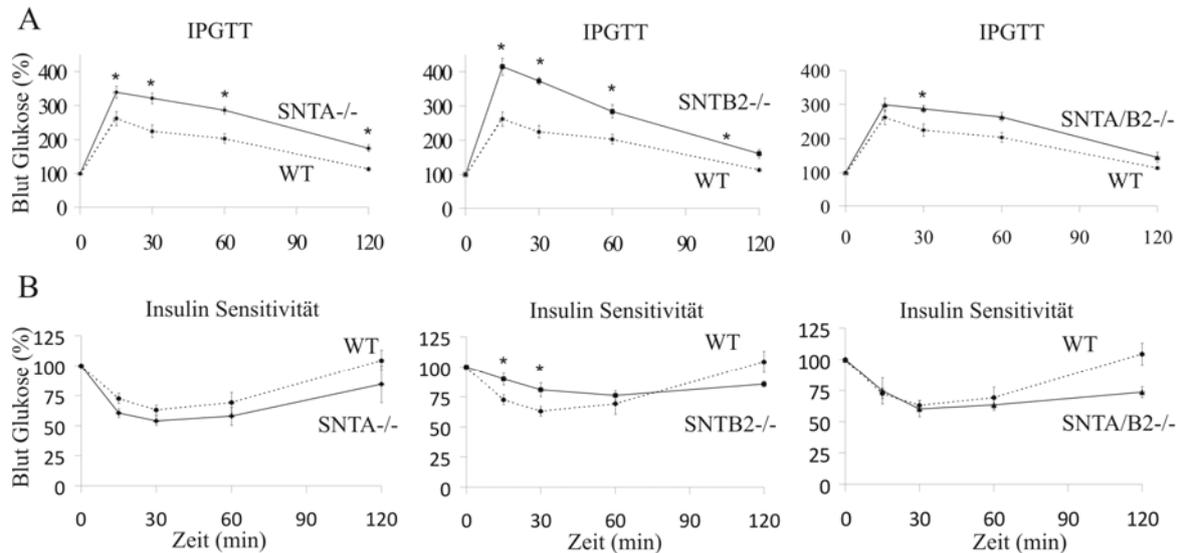


Abbildung 49: Glukosetoleranz und Insulinsensitivität in den Syntrophin defizienten Mäusen. Die Blutglukose während des IPGTT (A) und während des Insulinsensitivitätstests (B) in den SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Tieren ist jeweils verglichen zu den WT Tieren dargestellt. Die Versuche wurden mit fünf männlichen WT Mäusen, je männlichen fünf SNTA^{-/-} und SNTB2^{-/-} Mäusen und je drei weiblichen und männlichen SNTA/B2^{-/-} Mäusen durchgeführt.

In Abbildung 50 ist die Fläche unter der Kurve (AUC) aus den Diagrammen in Abbildung 49 vom Startpunkt der Messung bis zum 90 min Wert berechnet. Da die SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Tiere im Insulinsensitivitätstest bei 120 min eine Abnahme der Blutglukose zeigten, die unabhängig von der Insulinsensitivität ist und eventuell auf eine gestörte Glukosetoleranz hinweist, wurde die AUC nur von 0 bis 90 min berechnet.

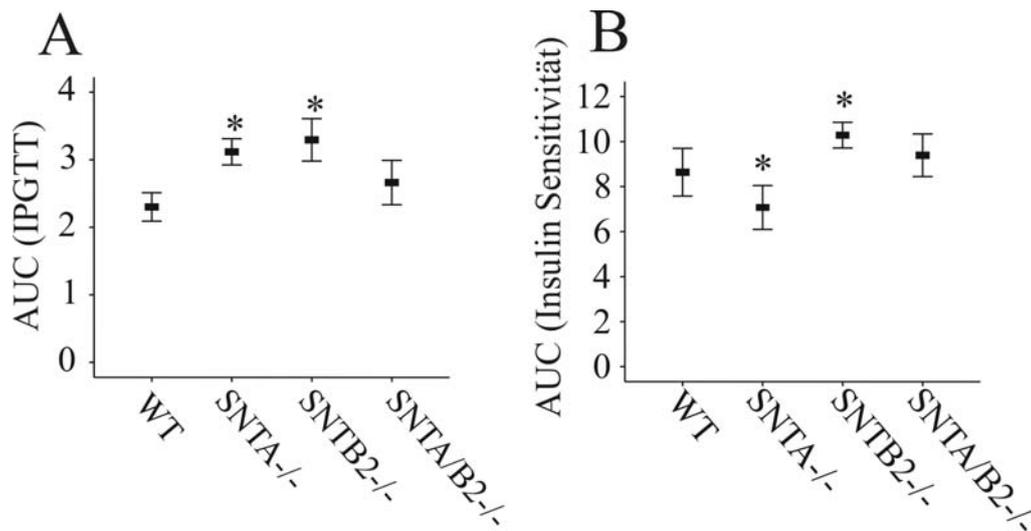


Abbildung 50: Berechnung der AUC aus den Diagrammen in Abbildung 49 vom Zeitpunkt 0 bis zum 90 min Wert. **(A)** AUC aus den Diagrammen des IPGTT und aus denen des Insulinsensitivitätstest **(B)**.

Die gestörte Glukosetoleranz der SNTA^{-/-} Tiere bei verbesserter Insulinsensitivität könnte durch eine verminderte Freisetzung von endogenem Insulin nach der Glukosegabe erklärt werden. Um dies zu klären wurde das Insulin im Serum nach 16 h Fasten und 30 min nach der Glukoseinjektion bestimmt. Die Auswertung der Daten ergab, dass das Fasten-Insulin in den SNTA^{-/-} Tieren fast doppelt so hoch war wie in den WT Tieren. Das Nüchterninsulin war auch in den SNTB2^{-/-} und den SNTA/B2^{-/-} Tieren erhöht (Abbildung 51 A), während 30 min nach der Glukoseinjektion kein Unterschied zu den Insulinwerten der WT Tiere festzustellen war (Abbildung 51 B).

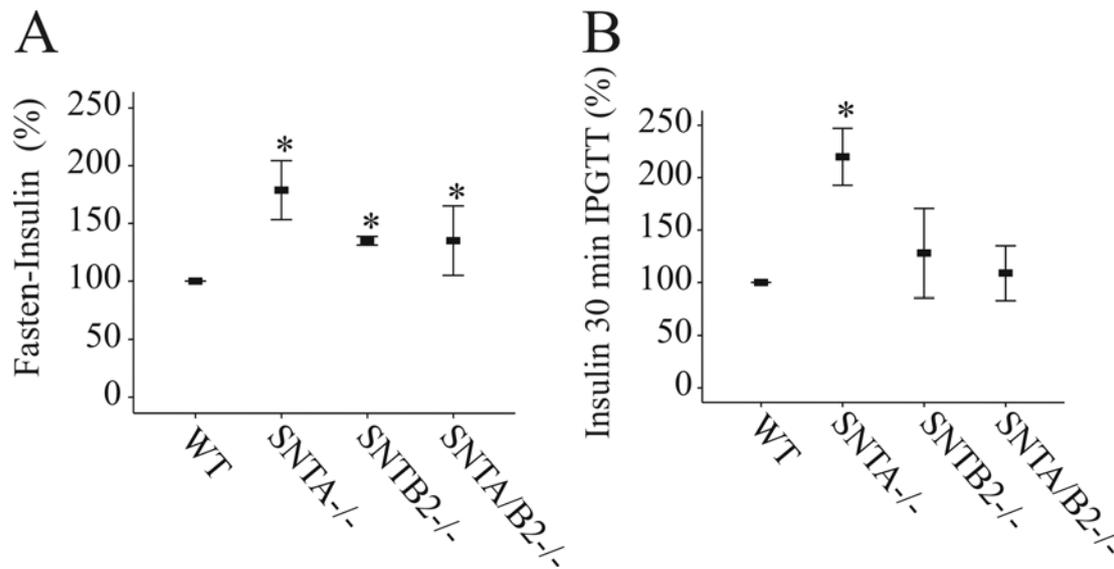


Abbildung 51: Die Bestimmung des Nüchtern-Insulins (A) und des Insulinspiegels 30 min nach der Glukoseinjektion während des IPGTT (B) im Serum der WT der SNTA-/-, SNTB2-/- und SNTA/B2-/- Mäuse.

Als weiterer metabolischer Parameter wurde der Nüchtern-Glukose Spiegel im Serum der Knock-out und der WT Tieren bestimmt. Es zeigte sich, dass die SNTB2-/- Mäuse eine Hypoglykämie entwickelten, während die Nüchtern-Glukosespiegel der SNTA-/- und SNTA/B2-/- Mäuse dem WT entsprach (Abbildung 52 A). Die systemische Glukose wird während des Fastens durch die Aktivität der PEPCK bestimmt. Die Analyse der mRNA Expression der PEPCK in der RNA der Knock-out Tiere ergab, dass die SNTA-/- Tiere eine erhöhte PEPCK mRNA Expression aufwiesen, während in den SNTB2-/- Tieren die PEPCK Expression deutlich reduziert war (Abbildung 52 B).

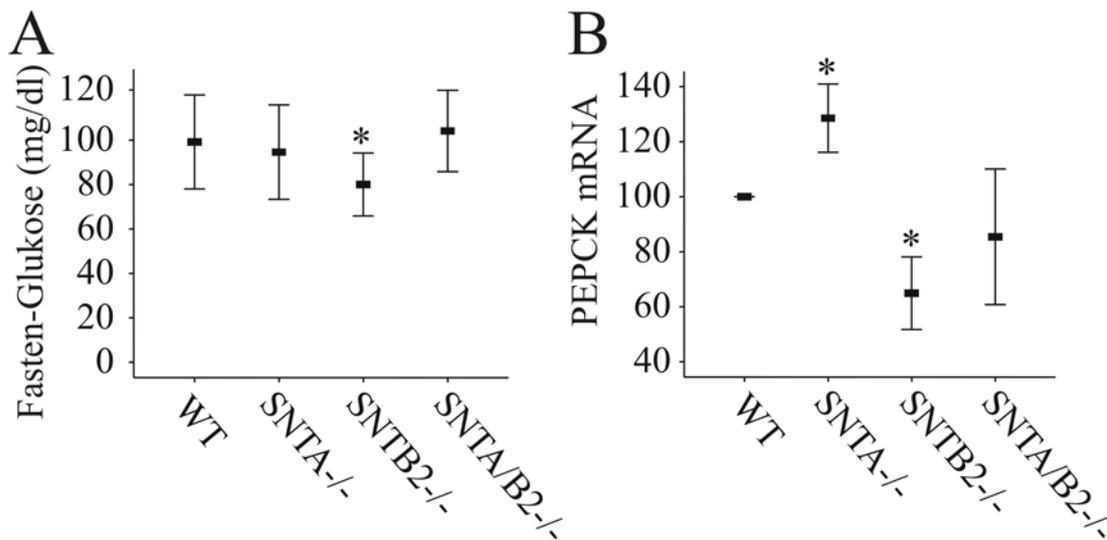


Abbildung 52: Die Bestimmung der Nüchtern-Glukose (A) im Serum der WT, der SNTA^{-/-}, der SNTB2^{-/-} und der SNTA/B2^{-/-} Mäuse. (B) Die mRNA Expression der PEPCK in Lebergewebe von WT, SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Mäusen. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH.

Weiterhin ergab die Messung des systemischen Adiponectins, dass die SNTA^{-/-} Mäuse gegenüber den WT Mäusen einen signifikant erhöhten Plasmaadiponectinspiegel hatten. Die SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Mäuse hatten keine veränderten Plasmaadiponectinspiegel (Abbildung 53). Um zu untersuchen, ob sich der erhöhte Plasmaadiponectinspiegel in der SNTA^{-/-} Maus durch eine reduzierte Aufnahme von Adiponectin in die Leber erklären lässt, wurde das intrahepatische Adiponectin ebenfalls bestimmt. Die SNTA^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Tiere zeigten zwar erhöhtes intrahepatisches Adiponectin, aber der Quotient aus Plasmaadiponectin zu Leberadiponectin war bei allen Tieren gleich (Daten nicht gezeigt), was einer verminderten Aufnahme von Adiponectin in die Leber als Erklärung für erhöhte systemische Spiegel ausschließt.

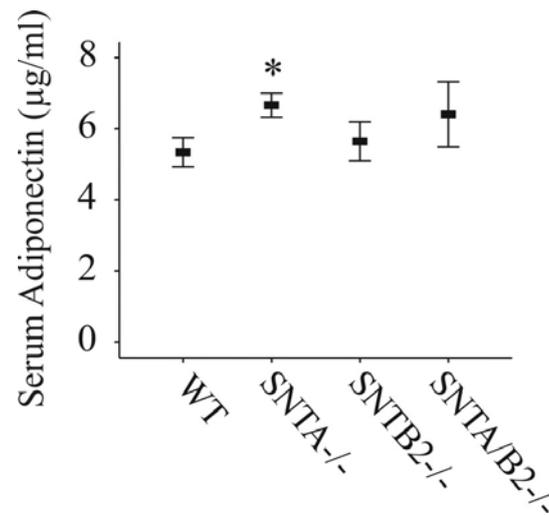


Abbildung 53: Die Bestimmung von systemischen Adiponectin in Serum von WT, SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Mäusen.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von HMW-Apm auf Hepatozyten

4.1.1 HMW-Apm und Fenofibrat vermindern die hepatische Aldehydoxidase 1 (AOX1)

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass HMW-Apm in primären humanen Hepatozyten sowohl die AOX1 mRNA Expression, als auch die Menge an AOX1 Protein reduziert. Weiterhin aktiviert Adiponectin PPAR- α in Hepatozyten [64] und könnte so seinen Effekt auf die Expression der AOX1 vermitteln. Die Blockierung der PPAR- α Aktivierung durch den PPAR- α Inhibitor RU486 verhinderte die HMW-Apm vermittelte Suppression von AOX1 und zeigte so, dass die Aktivierung von PPAR- α durch HMW-Apm sekundär zu einer reduzierten Expression der AOX1 führte. Fenofibrat, ein PPAR- α Agonist, reduzierte in humanen Hepatozyten ebenfalls die Menge an AOX1 Protein, während die AMPK Aktivatoren AICAR und Metformin keinen Einfluss auf die AOX1 Proteinmenge zeigten. Von Fenofibrat ist bekannt, dass es die Aktivität der AOX1 in humanen Leberlysaten um ca. 35 % reduziert, während Metformin keinen Einfluss auf die Aktivität der AOX1 hat [111]. Daher lässt sich folgern, dass die durch Fenofibrat vermittelte verminderte AOX1 Aktivität in den Leberlysaten zumindest teilweise auf eine Reduktion der AOX1 Proteinmenge zurückzuführen ist.

4.1.1.1 Physiologische und pathophysiologische Funktionen der AOX1

AOX1 ist ein Mitglied der Molybdän-Hydroxylase Familie, das am höchsten in der Leber exprimiert wird. Hier ist dieses Enzym an der Verstoffwechslung verschiedenster Medikamente beteiligt [112]. Weiterhin stellt die AOX1 eine Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar, die entscheidend zur hepatotoxischen Wirkung von Lipiden oder Alkohol beitragen könnten [113].

Gegenüber der gut untersuchten pharmakologischen Rolle der AOX1 ist dessen physiologische Funktion wenig untersucht. Es ist bekannt, dass AOX1 an der Synthese von Retinsäure [114], die die Leber vor Fibrose und Tumorentstehung schützt [115, 116], beteiligt ist. Vor allem zur Regulation der AOX1 auf mRNA und Protein Ebene sind wenig Daten veröffentlicht.

4.1.1.2 Rolle der AOX1 in der Fettleber

Die Adipositas ist bei weitem der wichtigste Faktor für die Entstehung einer Fettleber. Eine erhöhte Fettmasse ist assoziiert mit Insulinresistenz, hohen systemischen Triglyzerid- und niedrigen Adiponectinspiegeln, welche die Entstehung der Fettleber begünstigen. Neben bisher nicht bekannten Faktoren fördern erhöhtes Leptin und reduziertes Adiponectin das Fortschreiten der Erkrankung über die Stufe einer NASH zur Fibrose, was letztlich in einer Leberzirrhose bzw. in einem hepatozellulären Karzinom endet [21].

Ratten werden unter einer Hochfettdiät, basierend auf Schweineschmalz, adipös, insulinresistent und entwickeln eine Fettleber [105]. Die Menge an zirkulierendem Adiponectin ist in diesen Ratten, verglichen zu den Kontrolltieren auf Standarddiät, um etwa 20 % reduziert. In den Lebern der adipösen Ratten wurde die Aktivität von PPAR- α nicht untersucht, die mRNA Expression von PPAR- α Zielgenen wie *Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*, Acyl-CoA Oxidase und Apolipoprotein C-III war jedoch nicht verändert [105], woraus sich ableiten lässt, dass die PPAR- α Aktivität in diesem Rattenmodell durch die reduzierte Menge an systemischem Adiponectin nicht entscheidend beeinflusst wurde. Dennoch war in den Lebern der Tiere auf Hochfettdiät, verglichen mit den Tieren unter Standarddiät, eine deutlich erhöhte Menge an AOX1 Protein vorhanden. Weder Leptin noch die freie Fettsäure Palmitinsäure induzierten in vitro die Expression von AOX1, weshalb der ursächliche Faktor für die Induktion der AOX1 in der Fettleber weiter unklar ist. Die erhöhte Menge an AOX1 trägt zu einer vermehrten Generierung von ROS bei, was die Fibrosierung der Leber induzieren bzw. verstärken könnte (Abbildung 54). Durch die vermehrte Synthese von Retinsäure wären auch protektive Effekte der AOX1 denkbar. Diese Frage kann im Tiermodell letztendlich nur durch einen Leber-spezifischen Knock-out der AOX1 geklärt werden.

Weiterhin könnte durch die Erhöhung der AOX1 der Stoffwechsel von Medikamenten oder die Aktivierung von Medikamentenvorstufen [117] in der Fettleber verändert sein. Es gibt einzelne Studien die eine veränderte Pharmakokinetik von Enzymen des Phase I Stoffwechsels in übergewichtigen Probanden demonstrieren konnten. So ist die Aktivität des Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) [118, 119], das am oxidativen Stoffwechsel einer Vielzahl von Medikamenten beteiligt ist, vermindert, während die Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) Aktivität, die für den Metabolismus von Nitrosaminen wichtig ist, in der Leber von adipösen Patienten erhöht ist [120, 121]. Für AOX1 verstoffwechselte Medikamente liegen keine derartigen Untersuchungen vor. Ein Problem für solche Studien könnte jedoch die hohe interindividuelle Variabilität der AOX1 Aktivität in der humanen Leber darstellen.

Da Fenofibrat ebenfalls die AOX1 Proteinmenge und dessen Aktivität [111] vermindert, wären diesbezüglich weitere Experimente im Hinblick auf die Interaktion von Fenofibrat mit den Medikamenten, die wesentlich durch die AOX1 verstoffwechselt werden, interessant.

4.1.2 Regulation der ApoB und ApoE Freisetzung in Hepatozyten durch HMW-Apm

4.1.2.1 Einfluss von HMW-Apm auf die ApoB Sekretion

Niedriges systemisches Adiponectin ist mit einer Dyslipidämie assoziiert [122, 123], wobei nach dem aktuellen Stand der Literatur die Menge an zirkulierendem HMW-Apm einen besseren Parameter für die metabolische Wirksamkeit dieses Adipokins darstellt, als das zirkulierende Gesamt Adiponectin [124, 125]. Die Dyslipidämie bei Patienten mit einem metabolischen Syndrom erklärt sich zum Teil aus der erhöhten Freisetzung triglyzeridreicher und ApoB enthaltender VLDL Partikel durch die Leber [21]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass HMW-Apm die ApoB mRNA und sezernierte ApoB in primären humanen Hepatozyten reduzierte. Die mRNA Expression von ApoB ist durch den Transkriptionsfaktor HNF4- α reguliert, wie Experimente mit HNF4- α Knock-out Mäusen [126], bei denen dieser Transkriptionsfaktor spezifisch in der Leber deletiert ist, zeigten. Weitere HNF4- α regulierte Gene wie ABCB4 [127], GLUT2 [128] und OCT1 [128] wiesen in den Lebern dieser Tiere ebenfalls eine reduzierte Expression auf. Die HMW-APM inkubierten primären humanen Hepatozyten zeigten neben einer reduzierten mRNA und Protein Expression von HNF4- α auch eine Verminderung der HNF4- α regulierten Gene ABCB4, GLUT2 und OCT1. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass HMW-Apm die Expression und Aktivität von HNF4- α verringert, wodurch die Transkription von ApoB reduziert wird (Abbildung 54). Dies könnte letztendlich zu einer verringerten Freisetzung von VLDL führen. Zusätzliche Versuche mit HMW-Apm inkubierten HNF4- α defizienten Hepatozyten bzw. mit HNF4- α siRNA behandelten Hepatozyten wären nötig um dies zu bestätigen.

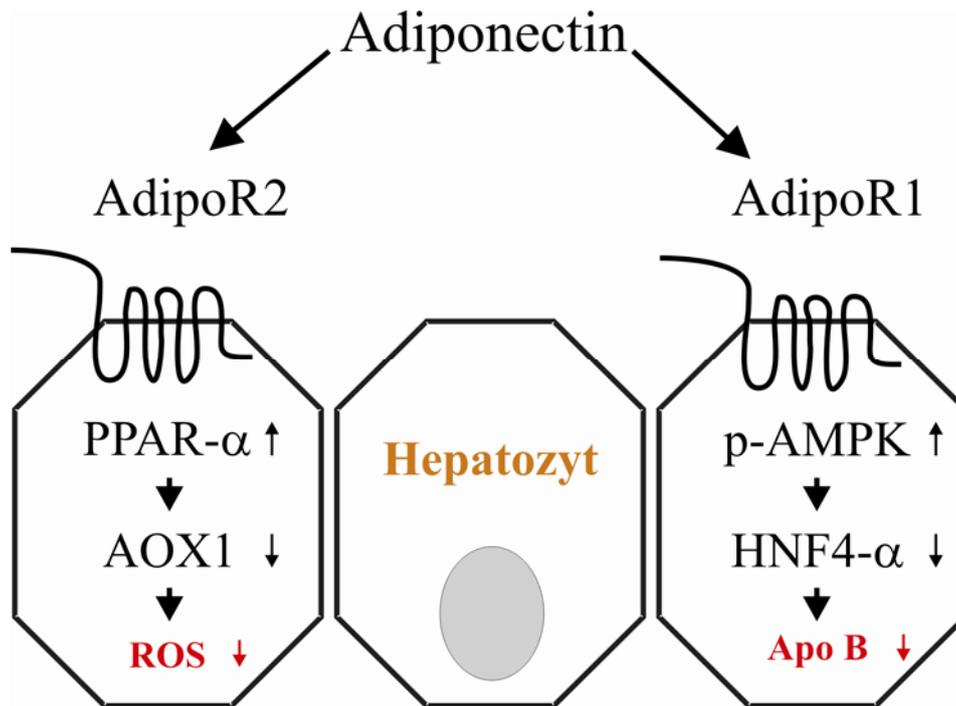


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Effekte von Adiponectin auf Hepatozyten, vermittelt durch AdipoR1 und AdipoR2.

4.1.2.2 Regulation der ApoE Freisetzung und der zellulären Triglyzeride durch HMW-Apm

Neben ApoB reduzierte HMW-Apm in primären humanen Hepatozyten die Sekretion von ApoE. ApoE ist bei der Aufnahme von triglyzeridreichen und ApoB haltigen Lipoproteinen beteiligt, und fördert in der Leber die Freisetzung von VLDL [129]. In Makrophagen führt der Knock-down von ABCA1 zu einer verminderten Freisetzung von ApoE, was dafür spricht, dass die Sekretion von ApoE zumindest teilweise über ABCA1 vermittelt wird [130]. HMW-Apm hatte auf die Expression und Funktion von ABCA1 keinen Einfluss, weshalb sich die verminderte Sekretion von ApoE durch HMW-Apm nicht durch eine veränderte ABCA1 Aktivität erklären lässt. Die Regulation der ApoE Freisetzung ist sehr komplex, weshalb zusätzlich Experimente benötigt werden um zu klären, ob eine verstärkte Degradation oder ein reduziertes Recycling von ApoE [131] ursächlich für dessen reduzierte Sekretion in HMW-Apm stimulierten Hepatozyten ist. Eine reduzierte Menge an hepatischem ApoE ist mit einer erniedrigten Menge an zirkulierendem VLDL assoziiert [132, 133]. Dies könnte dazu beitragen, dass in Probanden mit einem hohen HMW-Apm Spiegel das systemische ApoE und VLDL reduziert ist.

Effekte von Adiponectin sind unter anderem eine Erhöhung der β -Oxidation und eine Reduktion der Synthese von freien Fettsäuren [134], was zu einer verringerten Menge an Triglyzeriden führt. Die Stimulation von primären humanen Hepatozyten mit HMW-Apm bewirkte innerhalb von 24 h keine Reduktion der Triglyzeride, was darauf hinweist, dass die verminderte Freisetzung von ApoB und ApoE kein sekundärer Effekt einer verringerten Konzentration an intrahepatischen Triglyzeriden ist.

4.1.2.3 Effekt von Adiponectin auf die Funktion des hepatischen ABCA1

Der Serumspiegel von HDL-Cholesterin wird hauptsächlich durch die Aktivität des hepatischen ABCA1 bestimmt [135]. HMW-Apm führte in Hepatozyten zu keiner Veränderung der ABCA1 Expression. Die Aktivität von ABCA1, die durch den Efflux von Cholin-Phospholipid und Cholesterin auf lipidarmes ApoA-I bestimmt wird, wurde durch HMW-Apm nicht verändert. HMW-Apm zeigte auch keinen Einfluss auf die Menge an ApoA-I, einem Akzeptor für das von ABCA1 transportierte Cholesterin [101].

HMW-Apm vermindert die Freisetzung von ApoB in Hepatozyten über eine verringerte Expression von HNF4- α . Weiterhin wird über einen bisher nicht geklärten Mechanismus die Freisetzung von ApoE vermindert. Die reduzierten Mengen an hepatischem ApoB und ApoE könnten zu einer geringeren Freisetzung von triglyzeridreichen Lipoproteinen aus der Leber führen, was sekundär einen Anstieg des HDL Spiegels bewirken kann. Dies könnte zum Teil die positive Korrelation von Adiponectin zu HDL [50] bzw. die negative Korrelation zu LDL, ApoB und ApoE erklären [51].

4.2 Expression und Regulation der Adiponectin Rezeptoren in Hepatozyten, der Fettleber und der zirrhotischen Leber

4.2.1 Identifizierung des AdipoR2 als 43 kDa Protein

In der Publikation von Yamauchi et al. [64] wird AdipoR2 als 35,4 kDa Protein beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass AdipoR2 mit ca. 43 kDa ein ähnliches Molekulargewicht aufweist wie AdipoR1. Ein ähnliches Molekulargewicht von AdipoR2 wurde in einer weiteren Arbeit nachgewiesen [136]. AdipoR2 besitzt im Vergleich zur Publikation von Yamauchi et al., N-terminal 75 zusätzliche Aminosäuren. Diese Aminosäuren, die im Gegensatz zum restlichen Teil des Rezeptors keine Homologie zu AdipoR1 zeigen, könnten für die spezifischen Effekte von AdipoR2 verantwortlich sein.

4.2.2 Expression und Regulation von AdipoR1 in humanen Hepatozyten

Da in den initialen Publikationen zur hepatozytären Expression der Adiponectin Rezeptoren postuliert wurde, dass lediglich AdipoR2 in der Leber von Bedeutung ist [70, 137], wurde untersucht, inwieweit AdipoR1 ebenfalls in Hepatozyten exprimiert ist. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass AdipoR1 auf mRNA und Protein Ebene sowohl in verschiedenen hepatozytären Zelllinien als auch in primären humanen Hepatozyten exprimiert war.

4.2.2.1 Regulation von AdipoR1 durch Glitazone

Die Glitazone, wie die Vertreter Troglitazon und Pioglitazon, sind antidiabetische Medikamente und stellen molekular synthetische Liganden für PPAR- γ dar [17]. Die Wirkung der Glitazone auf das Fettgewebe ist gut untersucht. Die Aktivierung von PPAR- γ induziert die Adipozytenreifung. Dadurch wird auch die Expression und Sekretion von Adiponectin erhöht, was letztendlich den Adiponectinspiegel im Serum erhöht. Der positive Effekt der Glitazone auf die hepatische und periphere Insulinresistenz in Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus könnte somit auf der Erhöhung des systemischen Adiponectins beruhen [16]. Über die physiologische Rolle von PPAR- γ in der Leber ist wenig bekannt. Der Einfluss von Glitazone auf die AdipoR1 Expression wurde in verschiedenen Zellen untersucht. So zeigte sich in Makrophagen [67], dem Fettgewebe [138] und dem Muskel [138] kein Effekt, während Rosiglitazon in Kardiomyozyten AdipoR1 induzierte [139].

In HepG2 Zellen hatte Pioglitazon, ähnlich zu den Untersuchungen in anderen Zellen, keinen Einfluss auf die mRNA Expression und die Protein Menge von AdipoR1. Hingegen induzierte Troglitazon in HepG2 Zellen die Menge an AdipoR1 Protein ohne die mRNA Expression zu induzieren. Diese Daten zeigen, dass AdipoR1 nicht direkt durch PPAR- γ Agonisten reguliert wird. Die Induktion von AdipoR1 auf Proteinebene durch Troglitazon könnte auf dessen lebertoxische Eigenschaften zurückzuführen sein [140].

4.2.2.2 Regulation von AdipoR1 durch RXR/LXR Liganden

RXR, dessen natürlicher Ligand 9-cis-Retinsäure (9-cRA) ist, bildet mit anderen nukleären Rezeptoren wie LXR, PPAR- α und PPAR- γ Heterodimere und besitzt somit eine zentrale Stellung für die Funktion dieser nukleären Rezeptoren [141]. LXR, dessen physiologischer Ligand 25-Hydroxycholesterin (25-OH) ist, reguliert nicht nur Gene des reversen Cholesterin Transports sondern fördert in der Leber die Fettsäure- und Triglyzeridsynthese [142]. In HepG2 Zellen reduzierte 25-OH alleine und in Kombination mit 9-cRA die Expression von AdipoR1 auf mRNA Ebene, während AdipoR1 auf Proteinebene durch diese Liganden nicht reguliert wurde. Mögliche Erklärungen hierfür wären eine hohe Stabilität des Rezeptors oder eine zu geringe Reduktion der mRNA Menge um innerhalb von 24 h eine verringerte Proteinexpression beobachten zu können.

4.2.2.3 Regulation von AdipoR1 durch Fenofibrat und HMW-Apm

Fenofibrat und HMW-Apm stellen Aktivatoren von PPAR- α dar. Beide Substanzen induzieren die β -Oxidation und reduzieren die Synthese von freien Fettsäuren in der Leber. Die Inkubation von Hepatozyten mit LMW-Apm oder HMW-Apm führte zu keiner veränderten Expression von AdipoR1 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene. Fenofibrat führt in HepG2 Zellen zu einer Reduktion der AdipoR1 Proteinmenge ohne dessen mRNA Expression zu verändern. Dies legt nahe, dass dieser Effekt nicht auf die Aktivierung von PPAR- α zurückzuführen ist. Daher sollten die molekularen Mechanismen der Reduktion von AdipoR1 durch Fenofibrat in weiteren Experimenten untersucht werden, um vor allem die in vivo Relevanz dieser in vitro Beobachtung klären zu können.

4.2.3 Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell der Fettleber und der Leberzirrhose

4.2.3.1 Die Adiponectin Rezeptoren im Tiermodell der Fettleber

Die Fütterung von Ratten mit einer auf Schweineschmalz basierenden Hochfettdiät führt zur Entstehung einer Insulinresistenz und zur Ausbildung einer Fettleber. Im Serum dieser Tiere lässt sich ein erhöhter Insulin und Leptin Spiegel und ein erniedrigter Adiponectin Spiegel feststellen [143]. Daher wurde untersucht ob neben einem verringerten systemischen Adiponectin auch eine Reduktion der Adiponectinrezeptorexpression mit der Insulinresistenz bzw. der vermehrten Ablagerung von Triglyzeriden in der Leber assoziiert ist.

Für AdipoR1 konnte weder auf mRNA noch auf Proteinebene ein Unterschied zwischen den Tieren auf Hochfettdiät und Standarddiät nachgewiesen werden. Weder Insulin noch Leptin hatten in vitro einen Einfluss auf die AdipoR1 mRNA Expression und auf die Menge an AdipoR1 Protein in HepG2 Zellen. Im Modell der Leptin defizienten *ob/ob* Maus, die extrem adipös wird und eine Insulinresistenz entwickelt, wurde ebenfalls kein Unterschied in der Expression an hepatischem AdipoR1 im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet [69]. Dies zeigt, dass eine reduzierte Insulinsensitivität nicht mit einer reduzierten Expression von AdipoR1 in der Leber assoziiert ist.

In der *ob/ob* Maus ist die mRNA Expression von AdipoR2 im Vergleich zu Kontrolltieren nicht verändert [69], während in den hier untersuchten Ratten eine um 25 % induzierte AdipoR2 mRNA in den Lebern der Tiere unter Hochfettdiät gegenüber den Tieren auf Standarddiät nachgewiesen wurde. Die Untersuchung der AdipoR2 mRNA Expression in humanen Leberbiopsien zeigen eine Erhöhung der AdipoR2 mRNA [144, 145] bzw. keinen Unterschied der AdipoR2 mRNA in der Fettleber [146] im Vergleich zu normalen Leberproben.

Da in den ersten Jahren nach der Entdeckung der Adiponectin Rezeptoren keine Antikörper zur Verfügung standen, unsere eigenen Immunisierungen zur Generierung eines AdipoR2 Antiserums fehlschlagen und die ersten kommerziellen Antikörper in unseren Versuchen keine spezifische Reaktion mit AdipoR2 zeigten, wurde AdipoR2 nicht auf Proteinebene untersucht. In der Literatur gibt es dazu ebenfalls keine Daten. Eine Arbeit konnte reduzierte AdipoR2 mRNA und Protein in Leberbiopsien von Patienten mit NASH im Gegensatz zu Patienten mit hepatischer Steatose zeigen [147]. Um zu klären ob eine verminderte hepatische AdipoR1 und /oder AdipoR2 Proteinmenge mit der hepatischen

Steatose bzw. der NASH assoziiert ist, müssen weitere Studien, am besten mit humanen Lysaten, erfolgen. Es bleibt jedoch auch zu klären, ob eventuell die Signaltransduktion der Rezeptoren, unabhängig vom Ausmaß der Proteinmenge, in der Insulinresistenz gestört ist.

4.2.3.2 Adiponectin im Tiermodell für Fettleber

Die negative Korrelation von zirkulierendem Adiponectin zum BMI im humanen System [148] findet sich im Tiermodell der fetten Ratte. In Übereinstimmung mit dem reduzierten systemischen Adiponectin Spiegel zeigen die Hochfetttiere einen verminderten Gehalt an hepatischem Adiponectin. In der Leber der Ratten konnte keine Adiponectin mRNA detektiert werden, was dafür spricht, dass das hepatische Adiponectin aus der Zirkulation stammt und von den Hepatozyten aufgenommen wird. In primären humanen Hepatozyten, die für drei Tage *in vitro* kultiviert wurden, konnte kein Adiponectin detektiert werden. Die Stimulation mit steigenden Dosen HMW-Apm erzeugt in diesen Hepatozyten einen intrazellulären Anstieg von Adiponectin der mit der zugesetzten Menge an HMW-Apm korreliert. Diese *in vitro* Daten weisen darauf hin, dass Adiponectin von Hepatozyten *in vivo* aus der Zirkulation oder direkt aus der Portalvene aufgenommen wird. Eine Aufnahme von Adiponectin wurde auch in Epithelzellen beschrieben [149]. Ob und welche Funktion die Internalisierung von Adiponectin hat ist bisher unklar. Die Aufnahme in die Hepatozyten könnte für die Exkretion von Adiponectin über die Galle von Bedeutung sein [54]. Es gibt jedoch Hinweise, dass Adiponectin zu einem Teil renal eliminiert wird [150].

4.2.3.3 Adiponectin und dessen Rezeptoren im Tiermodell für Leberzirrhose

Das Endstadium von allen chronischen Lebererkrankungen, wie Fettleber, NASH oder Virushepatitiden ist die Leberzirrhose [21]. Ein gut etabliertes Tiermodell für eine Zirrhose ist der Verschluss der extrahepatischen Galle durch eine Gallengangsligatur (BDL) in Mäusen [151]. In den Lebern der BDL Mäuse ist die mRNA- und Protein Expression von AdipoR1 und die AdipoR2 mRNA gegenüber Kontroll-operierten Tieren reduziert. Das systemische Adiponectin ist in den Tieren mit einer Leberzirrhose erhöht. Dieses Phänomen ist auch von Patienten mit einer Leberzirrhose beschrieben, die, entsprechend zu den Daten der zirrhotischen Mäuse, einen erhöhten Adiponectin Spiegel im Serum aufweisen [54]. Das erhöhte systemische Adiponectin resultiert, zumindest im Mausmodell, nicht aus der verringerten Aufnahme von Adiponectin in die Leber. Zwischen den BDL Tieren und den Kontroll-operierten Tieren war kein Unterschied im hepatischen Gehalt von Adiponectin zu

sehen. Eine verminderte Leberfunktion, verursacht durch die Zirrhose, könnte so auch die Exkretion von Adiponectin reduzieren, was in einem erhöhten Adiponectin Spiegel resultiert. Diese Hypothese würde einen reduzierten hepatischen Adiponectin Gehalt voraussetzen, was die Daten aus dem Modell der BDL Maus nicht unterstützen.

Obwohl Adiponectin in der Leber von Ratten, Mäusen und in humanen Hepatozyten detektiert wurde, konnte weder in der Leber von Ratten, in der humanen Leber noch in isolierten primären humanen Hepatozyten und hepatozytären Zelllinien Adiponectin mRNA nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Adiponectin nicht in Hepatozyten oder anderen Zellen der Leber synthetisiert wird. Diese Ergebnisse werden von einigen Studien bestätigt [144, 145], stehen aber im Widerspruch zu anderen Studien [54, 147] die eine Synthese von Adiponectin in der Leber finden. Für diese unterschiedlichen Ergebnisse gibt es im Moment keine Erklärung. Hepatozyten nehmen eine erhebliche Menge an Adiponectin auf was zumindest zum Teil erklärt, warum Adiponectin in der Leber detektiert wurde.

4.3 Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Adiponectin Rezeptoren

4.3.1 Identifizierung und Verifikation von SNTA und SNTB2 als Interaktionspartner der beiden Adiponectin Rezeptoren

Die beiden Adiponectin Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 wurden von Yamauchi et al. [64] in Größe und Orientierung in der Membran beschrieben. Die Autoren zeigen, dass der N-Terminus der beiden Rezeptoren intrazellulär und der C-Terminus extrazellulär orientiert ist. AMPK für AdipoR1 und PPAR- α für AdipoR2 wurden weiterhin als Zielmoleküle der beiden Rezeptoren identifiziert [71]. Über die Signaltransduktion von den Adiponectin Rezeptoren zu deren jeweiligen Zielmolekülen ist allerdings wenig bekannt. Bisher wurde lediglich die Bindung von APPL1 an den N-Terminus beider Rezeptoren ist gezeigt und die Beteiligung von APPL1 in der Signaltransduktion der beiden Rezeptoren nachgewiesen [75, 78]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mit α -Syntrophin (SNTA) und β 2-Syntrophin (SNTB2) zwei intrazelluläre Proteine [102], die mit den C-Termini der beiden Adiponectin Rezeptoren interagieren. AdipoR1 und AdipoR2 tragen am C-Terminus eine PDZ-Bindemotiv, die die Interaktion mit den beiden PDZ Proteinen SNTA und SNTB2 vermitteln könnte, worauf die Kotransformationsexperimente in den Hefen und die Hybridisierung des PDZ Domänen Arrays hinweisen. Die von Yamauchi et al. [64] beschriebene extrazelluläre Lokalisation der C-Termini spricht jedoch gegen eine Interaktion mit den intrazellulären Syntrophinen. Im Gegensatz zu diesen Daten, die in 293T Zellen erhoben wurden, zeigen die Untersuchungen mit rekombinant exprimierten Rezeptoren in Hepatozyten eine intrazelluläre Lokalisation der C-Termini. Welche Orientierung nun letztendlich stimmt kann momentan nicht geklärt werden. Eine computergestützte Strukturanalyse ergibt, dass beide Orientierungen der Adiponectin Rezeptoren in der Plasmamembran theoretisch gleich wahrscheinlich sind (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). Im Unterschied zur Publikation von Yamauchi et al. [64] wurde in diesen Experimenten ein um 75 Aminosäuren längeres Konstrukt für AdipoR2, die hepatozytäre Zelllinie HuH-7 und eine interne Kontrolle für die Permeabilisierung der Zellen verwendet. Weiterhin wurden im Hefe Two Hybrid Ansatz lediglich sezernierte Proteine als Ligand für den N-Terminus identifiziert. Dieser unterschiedliche Ansatz erklärt jedoch nicht die gegenteiligen Ergebnisse, weshalb weitere Versuche zur Bestimmung der Orientierung notwendig sind.

Die Immunfluoreszenz ergibt eine Kolokalisation zwischen dem N-Terminus von AdipoR1 und AdipoR2 und SNTB2, die durch die Stimulation mit HMW-Apm deutlich induziert wird. Die fehlende Kolokalisation zwischen dem C-Terminus der Adiponectin Rezeptoren und SNTB2 könnte dadurch erklärt werden, dass das Konstrukt zur Überexpression einen C-terminalen Tag trägt, der das PDZ-Bindemotiv maskiert und so keine Bindung an die PDZ Domäne mehr möglich ist [109].

4.3.2 In Vitro Untersuchungen zur Rolle von SNTA und SNTB2 in der Adiponectin Signaltransduktion

Der Knock-down von SNTB2 führt in Hepatozyten zu einer verringerten AdipoR1 Proteinmenge, während der Knock-down von SNTA die Menge an AdipoR1 Protein induziert. Diese Ergebnisse deuten auf einen gegenteiligen Effekt von SNTB2 und SNTA auf die Expression von AdipoR1 hin. Die Menge an AdipoR2 Protein wurde durch keine der beiden verwendeten siRNAs verändert.

Der Effekt von HMW-Apm auf die Expression der AOX1 erfolgt über die Aktivierung von PPAR- α , vermittelt über AdipoR2 [71, 152]. Der Knock-down von SNTB2 oder SNTA führte zu keiner verminderten Expression von AOX1, was zeigt, dass die Funktion von AdipoR2 durch den Knock-down von SNTB2 und SNTA nicht beeinflusst wird.

HMW-Apm aktiviert die AMPK über AdipoR1 [71], reprimiert so HNF4- α [126] und dessen Zielgen ApoB. Der Knock-down von SNTB2 hob den Effekt von HMW-Apm, die Reduktion von HNF4- α und ApoB, auf und scheint so für die Funktion von AdipoR1 essentiell zu sein. Die HMW-Apm induzierte Phosphorylierung der ACC wird ebenfalls über AdipoR1 vermittelt und durch den Knock-down von SNTB2 fast vollständig unterdrückt. Der Knock-down von SNTA scheint den Effekt von HMW-Apm auf die Reduktion von HNF4- α und ApoB in Hepatozyten zu verstärken, der Effekt war jedoch nicht signifikant. Dies könnte dafür sprechen, dass die Signaltransduktion von HMW-Apm über AdipoR1 durch den Knock-down von SNTA effizienter abläuft, während eine reduzierte Menge an SNTB2 die Signaltransduktion über AdipoR1 inhibiert (Abbildung 55). SNTB2 und SNTA scheinen zumindest in vitro einen gegenteiligen Effekt auf die Signaltransduktion von HMW-Apm über AdipoR1 auszuüben. Um die Bedeutung von SNTB2 und SNTA für die Expression der Adiponectin Rezeptoren bzw. die Signaltransduktion von Adiponectin in einem in vivo Modell zu analysieren, wurden weitere Versuche mit Syntrophin defizienten Mäusen durchgeführt.

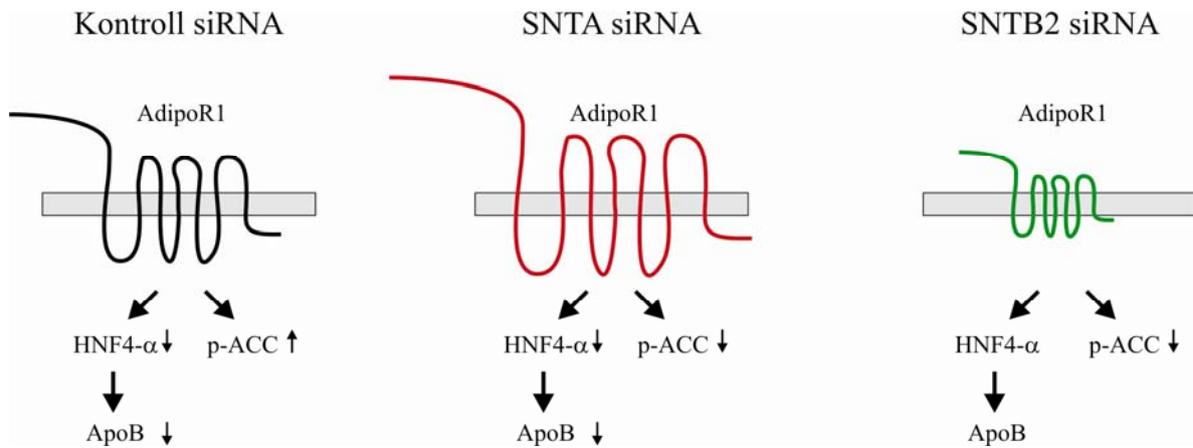


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Effekte der SNTA und SNTB2 siRNA Behandlung auf die AdipoR1 Signaltransduktion von HMW-Apm. Die rote Farbe steht für eine induzierte und die grüne Farbe für eine reduzierte AdipoR1 Proteinmenge, während die schwarze Färbung für die basale Proteinmenge steht.

4.3.3 Metabolische Untersuchungen in der Lebern von SNTA und SNTB2 Knock-out Mäusen

SNTA und SNTB2 sind als molekulare Adapter Proteine in der Innervation der Muskulatur gut untersucht. SNTA und SNTB2 sind mit dem Dystrophin-Glykoprotein Komplex assoziiert, der eine Verbindung zwischen dem extrazellulären Laminin und dem intrazellulären Aktin im Sarkolemma ausbildet. Hierbei interagiert SNTA mit Dystrophin und SNTB2 mit Utrophin. Die PDZ Domäne von SNTA bindet auch andere Proteine wie neuronale NO Synthase (nNOS), Aquaporin 4 und *Stress-Activated Protein Kinase 3*, während SNTB2 über die PDZ Domäne mit den Serin/Threonin Kinasen MAST und SAST interagiert [153, 154]. Die SNTB2 Knock-out Maus zeigt keinen ausgeprägten Phänotyp, während die Defizienz von SNTA im Muskel dazu führt, dass die α -adrenerge Vasokonstriktion während der Muskelkontraktion nicht abgemildert werden kann. Die SNTA/B2 defiziente Maus zeigt im Muskel die gleichen strukturellen und funktionellen Veränderungen wie die SNTA^{-/-} Maus, jedoch sind diese phänotypisch stärker ausgeprägt [102, 103].

Im Gegensatz dazu ist die Funktion von SNTA und SNTB2 in der Leber wenig untersucht, einzig die Bindung von SNTA und SNTB2 an den C-Terminus von ABCA1 ist gezeigt [89, 155]. In einer einzigen Arbeit bisher wird ein Zusammenhang zwischen dem SNTA und der peripheren Insulinsensitivität hergestellt. Im Muskel der *non-obese Goto-Kaizaki* Ratten,

einem Diabetesmodell, wurde gezeigt, dass die Expression von SNTA und nNOS reduziert ist [110]. Weiterhin ist SNTB2 an der pankreatischen Sekretion von Insulin beteiligt [156]. Die Daten dieser Arbeit zeigen eine Verbindung von SNTA und SNTB2 zur Signaltransduktion von Adiponectin. In der Leber der SNTA^{-/-} Maus ist die Menge an AdipoR1 induziert, während in der Leber der SNTB2^{-/-} Maus die AdipoR1 Proteinmenge reduziert ist. Die vermehrte Menge an HNF4- α Protein in der Leber der SNTB2^{-/-} Maus könnte auf eine reduzierte AdipoR1 Aktivität hindeuten, ähnlich wie dies bereits in den *in vitro* Versuchen mit siRNA beobachtet wurde.

AdipoR2 ist auf Protein und mRNA Ebene in den SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Mäusen gegenüber den WT Mäusen signifikant reduziert. Die reduzierte AdipoR2 Menge hat auch Einfluss auf die AdipoR2 Zielgene PPAR- α , Catalase und ACOX wie die mRNA Daten und, für ACOX, die Proteindaten zeigen. So könnte die Adiponectin Signaltransduktion über die Aktivierung von PPAR- α durch AdipoR2 in den SNTB2 und SNTA/B2^{-/-} Tieren reduziert sein.

Die SNTA^{-/-} und SNTB2^{-/-} Mäuse zeigen im IPGTT eine gestörte Glukosetoleranz gegenüber den WT und SNTA/B2^{-/-} Mäusen. Die SNTB2^{-/-} Mäuse zeigten weiterhin eine verminderte Insulinsensitivität, während die SNTA^{-/-} Mäuse eine verbesserte Insulinsensitivität aufwiesen. Die gestörte Glukosetoleranz der SNTA^{-/-} Tiere könnte durch eine unangemessene endogene Insulinfreisetzung auf Grund der Glukoseinjektion erklärt werden. Der erhöhte Nüchtern-Insulinspiegel, das erhöhte Insulin 30 min nach der Glukoseinjektion und die unveränderte Nüchtern-glukose in den SNTA^{-/-} Tieren weisen auf eine gestörte Aktivität des endogenen Insulins durch einen bislang nicht bekannten Mechanismus hin. Die Nüchtern-Hypoglykämie der SNTB2^{-/-} Tiere lässt sich mit der reduzierten mRNA Expression der hepatischen PEPCK erklären. Die PEPCK liefert im nüchternen Zustand durch die endogene hepatische Glukoseproduktion die systemische Glukose [157].

Die SNTB2 Defizienz in den Mäusen resultiert in einem erhöhten Nüchtern-Insulinspiegel, einer gestörten Glukosetoleranz, einer geringeren Insulinsensitivität und einer reduzierten mRNA Expression von AdipoR2 Zielgenen. Dies deutet darauf hin, dass die geringere Aktivität von Adiponectin für die Insulinresistenz in der SNTB2 Maus verantwortlich ist, während die Nüchtern-Glykämie dieser Tiere unabhängig von der Wirkung von Adiponectin zu sein scheint. Die metabolischen Veränderungen in den SNTA^{-/-} Tieren sind komplexer. So weisen diese Tiere eine erhöhte Wirkung von Adiponectin und eine verbesserte Insulinsensitivität auf, obwohl die Tiere eine gestörte Glukosetoleranz und eine

Hyperinsulinämie haben, die durch eine reduzierte Wirkung des endogenen Insulins, durch einen bislang unbekanntem Mechanismus, erklärt werden könnte. In den SNTA/B2-/- Doppel-Knock-out Tieren ist die Menge an AdipoR1 Protein vergleichbar mit den WT Tieren, während die Menge an AdipoR2 Protein reduziert ist. Die Glukosetoleranz und die Insulinsensitivität der SNTA/B2-/- Tiere ist mit jener der WT Tiere vergleichbar. Diese Daten sprechen dafür, dass SNTA und SNTB2 antagonistische Effekte im Glukosestoffwechsel ausüben (Abbildung 56).

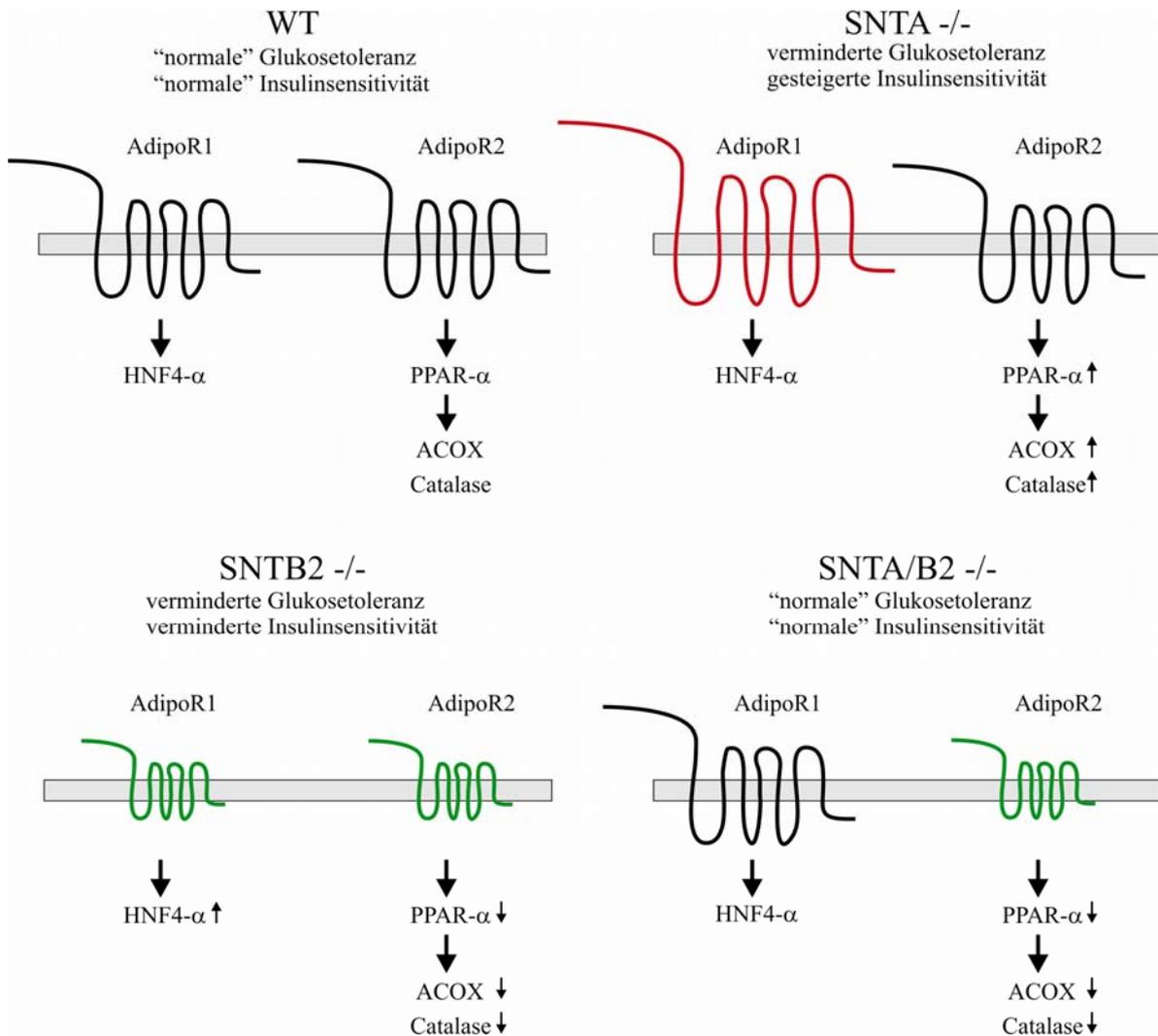


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Effekte des SNTA und SNTB2 Knock-out in Mäusen. Die rote Farbe steht für eine induzierte und die grüne Farbe für eine reduzierte AdipoR1 Proteinmenge, während die schwarze Färbung für die basale Proteinmenge steht

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Adiponectin Rezeptoren und Untersuchungen zur Adiponectin induzierten Genexpression in Hepatozyten.

Für fast alle Versuche wurden primäre humanen Hepatozyten verwendet, was für die Validität der Ergebnisse und deren in vivo Relevanz von entscheidender Bedeutung ist. Die Analyse der mRNA Expression von primären humanen Hepatozyten, die mit HMW-Apm stimuliert wurden, zeigte, dass ca. 300 Gene durch HMW-Apm auf mRNA Ebene reguliert werden.

Die AOX1 wurde bisher meist aus pharmakologischer Sicht untersucht, weshalb über die Regulation dieses Proteins wenig bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass AOX1 durch HMW-Apm und Fenofibrat über die Aktivierung von PPAR- α reprimiert wird. Da PPAR- α über die Bindung von Adiponectin an AdipoR2 reguliert wird, lässt sich sagen, dass AOX1 von HMW-Apm über AdipoR2 und PPAR- α reguliert wird. Die Daten zur erhöhten Expression der AOX1 in der Fettleber von Ratten müssen noch in entsprechenden humanen Proben untersucht werden. Wird dies bestätigt, eröffnen sich neue Fragen und Einblicke bezüglich des Einflusses von AOX1 auf den Stoffwechsel von Medikamenten und Xenobiotika in der verfetteten Leber. Die Generierung von Sauerstoffradikalen durch die AOX1 könnte in diesem Zusammenhang das Fortschreiten der Fettlebererkrankung zu einer Fibrosierung der Leber erklären.

Die Erkenntnisse zur Adiponectin vermittelten Signaltransduktion werden entscheidend durch die Identifizierung des Transkriptionsfaktors HNF4- α als ein durch HMW-Apm reprimiertes Protein ergänzt. So konnte gezeigt werden, dass HMW-Apm neben HNF4- α auch dessen Zielgene ApoB, ABCB4, GLUT2 und OCT1 reprimiert. Zusätzlich wurde eine verringerte Sekretion von ApoE gefunden, die wahrscheinlich durch die verminderte Freisetzung von ApoB bedingt ist. Eine reduzierte Sekretion von ApoB-haltigen hepatischen Lipoproteinen erklärt zum Teil die negative Assoziation von systemischen Adiponectin zu LDL. Vermindertes systemisches LDL führt sekundär zu einer Erhöhung von HDL, was sich in der positiven Korrelation von Adiponectin zu HDL ausdrückt.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit das erste Mal gezeigt werden, dass AdipoR1 sowohl in primären humanen Hepatozyten als auch in hepatozytären Zelllinien exprimiert ist. In Hepatozyten wird AdipoR1 auf Proteinebene durch Fenofibrat reprimiert, während LXR/RXR Agonisten und Pioglitazon keinen Einfluss auf AdipoR1 haben. Dies legt den

Schluss nahe, dass AdipoR1 in Hepatozyten kein direktes Zielgen dieser nukleären Rezeptoren ist.

Mit Hilfe von in vitro translatierten und rekombinant exprimierten AdipoR2 Protein konnte gezeigt werden, dass AdipoR2, anders als in der initialen Publikation mit 35,4 kDa beschrieben [64], ein 43 kDa Protein ist. Die zusätzlichen 75 Aminosäuren am N-Terminus von AdipoR2 zeigen keine Homologie zu AdipoR1, während die restlichen Aminosäuren eine hohe Ähnlichkeit dazu aufweisen.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von AdipoR1 in der Fettleber aus Ratten unter Hochfettdiät nicht verändert ist, während die AdipoR2 mRNA induziert ist. In Mäusen mit einer durch Gallengangsligatur bedingten Leberzirrhose ist die mRNA Expression von AdipoR1 und AdipoR2 und die Menge an AdipoR1 Protein reduziert.

Die Interaktion von SNTA und SNTB2 mit den C-terminalen Bereichen der beiden Adiponectin Rezeptoren stellt das interessanteste Ergebnis dieser Arbeit dar. Die Interaktion zwischen diesen Proteinen wird über die PDZ Domäne von SNTA und SNTB2 vermittelt, die wahrscheinlich mit den PDZ Bindemotiven am C-Terminus von AdipoR1 und AdipoR2 wechselwirken. Es konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Rezeptoren so in der Membran orientiert sind, dass der C-Terminus intrazellulär und der N-Terminus extrazellulär liegt. Die Interaktion mit SNTB2 und AdipoR1 oder AdipoR2 wurde durch die Stimulation mit HMW-Apm verstärkt, während die Maskierung der PDZ Bindedomäne der beiden Rezeptoren zu einem Verlust der Interaktion führt. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion wurde mit siRNA Experimenten untersucht. Die Reduktion von SNTA durch siRNA führte zu einer Induktion von AdipoR1 auf Proteinebene, während der Knock-down von SNTB2 zu einer Reduktion von AdipoR1 resultierte. Funktionell führte die Reduktion von SNTA und SNTB2 zu keiner Veränderung im Signalweg von Adiponectin über AdipoR2. Der Knock-down von SNTB2 reduzierte den Effekt von Adiponectin über AdipoR1, während die Reduktion von SNTA zu einer tendenziellen Verstärkung des Adiponectin Effekts über AdipoR1 führte. Dies deutet auf eine antagonistische Wirkung von SNTA und SNTB2 in der Funktion von AdipoR1 hin.

Um zu klären ob diese Interaktion auch in vivo von Bedeutung ist, wurden in Kooperation mit Marvin Adams die Lebern von SNTA^{-/-}, SNTB2^{-/-} und SNTA/B2^{-/-} Knock-out Tieren untersucht. Ähnlich wie in den siRNA Experimenten führte das Fehlen von SNTA zu einer Induktion von AdipoR1, während die Defizienz von AdipoR2 in einer Reduktion von AdipoR1 resultierte. Die Menge an AdipoR2 war im Gegensatz zu den SNTA^{-/-} Mäusen,

wo keine Veränderung von AdipoR2 zu beobachten ist, in den SNTB2^{-/-} Mäusen reduziert. In den SNTA/B2^{-/-} Doppel-Knock-out Tieren war AdipoR2 reduziert, während AdipoR1 Protein in der gleichen Menge enthalten war wie in den WT Tieren. In der metabolischen Charakterisierung zeigten die SNTA^{-/-} und SNTB2^{-/-} Tiere eine gestörte Glukosetoleranz, wohingegen die SNTA/B2^{-/-} Tiere eine normale Gluksoetoleranz aufwiesen. Zusätzlich lag in den SNTB2^{-/-} Tieren eine verringerte Insulinsensitivität vor. Dies unterstützt die in vitro Daten aus den siRNA Experimenten, dass SNTA und SNTB2 gegenteilige Effekte auf den Glukosestoffwechsel ausüben und dass das gleichzeitige Fehlen von SNTA und SNTB2 diese antagonistischen Effekte kompensiert.

6 Publikationen und Kongressbeiträge

6.1 Publikationen

6.1.1 Erstautorenschaften

M. Neumeier, J. Weigert, R. Buettner, J. Wanninger, A. Schaffler, A. M. Muller, S. Killian, S. Sauerbruch, F. Schlachetzki, A. Steinbrecher, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler,

Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans,
Am J Physiol Endocrinol Metab 293 (2007) E965-969.

M. Neumeier, A. Sigrüener, E. Eggenhofer, J. Weigert, T. S. Weiss, A. Schaeffler, H. J. Schlitt, C. Aslanidis, P. Piso, T. Langmann, G. Schmitz, J. Scholmerich, and C. Buechler,
High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes,

Biochem Biophys Res Commun 352 (2007) 543-548.

M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, T. S. Weiss, C. Schmidl, R. Buttner, C. Bollheimer, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler,

Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro,

Biochem Biophys Res Commun 350 (2006) 731-735.

M. Neumeier, C. Hellerbrand, E. Gabele, R. Buettner, C. Bollheimer, J. Weigert, A. Schaffler, T. S. Weiss, M. Lichtenauer, J. Scholmerich, and C. Buechler,

Adiponectin and its receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis,
World J Gastroenterol 12 (2006) 5490-5494.

M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, G. Wehrwein, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, C. Wrede, and C. Buechler,

Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells,
J Leukoc Biol 79 (2006) 803-808.

M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, T. Weiss, S. Kirchner, S. Laberer, J. Scholmerich, and C. Buechler,

Regulation of adiponectin receptor 1 in human hepatocytes by agonists of nuclear receptors, *Biochem Biophys Res Commun* 334 (2005) 924-929.

G. Wehrwein*, **M. Neumeier***, A. Schaffler, A. Kopp, J. Weigert, S. Abke, J. Scholmerich, and C. Buechler, * geteilte Erstautorenschaft

Lipopolysaccharide regulated protein expression is only partly impaired in monocytes from patients with type I diabetes, *Cardiovasc Diabetol* 5 (2006) 5.

6.1.2 Koautorenschaften

F. Stögbauer, **M. Neumeier**, J. Weigert, J. Wanninger, M. Grandl, K. Lehle, G. Schmitz, C. Aslanidis, A. Schäffler, J. Schölmerich, and C. Buechler,

Highly efficient and low-cost method to isolate human blood monocytes with high purity, *J Immunol Methods* (2008).

J. Wanninger, **M. Neumeier**, J. Weigert, G. Liebisch, T.S. Weiss, A. Schaeffler, C. Aslanidis, G. Schmitz, J. Schölmerich, C. Buechler,

Metformin reduces cellular lysophosphatidylcholine and thereby may lower apolipoprotein B secretion in primary human hepatocytes, *Biochim Biophys Acta* (2008).

J. Weigert, **M. Neumeier**, J. Wanninger, S. Wurm, A. Kopp, F. Schober, M. Filarsky, A. Schäffler, M. Zeitoun, C. Aslanidis, C. Buechler,

Reduced response to adiponectin despite higher abundance of Adiponectin receptor mRNAs in type 2 diabetic monocytes, *FEBS Lett* 582 (2008) 1777-1782.

B. Wölfling, C. Buechler, J. Weigert, **M. Neumeier**, C. Aslanidis, J. Schoelmerich, A. Schaeffler,

Effects of the new C1q/TNF-related protein (CTRP-3) "cartonectin" on the adipocyte secretion of adipokines,

Obesity (Silver Spring) (2008)

G. H. Pfeiler, C. Buechler, **M. Neumeier**, A. Schaffler, G. Schmitz, O. Ortmann, and O. Treeck,

Adiponectin effects on human breast cancer cells are dependent on 17-beta estradiol,

Oncol Rep 19 (2008) 787-793.

B. Wolfing, **M. Neumeier**, C. Buechler, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and A. Schaffler,

Interfering effects of insulin, growth hormone and glucose on adipokine secretion,

Exp Clin Endocrinol Diabetes 116 (2008) 47-52.

F. Schober, **M. Neumeier**, J. Weigert, S. Wurm, J. Wanninger, A. Schaffler, A. Dada, G. Liebisch, G. Schmitz, C. Aslanidis, and C. Buechler,

Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release,

Biochem Biophys Res Commun 361 (2007) 968-973.

S. Wurm, **M. Neumeier**, J. Weigert, A. Schaffler, and C. Buechler,

Plasma levels of leptin, omentin, collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein (CORS-26) and adiponectin before and after oral glucose uptake in slim adults,

Cardiovasc Diabetol 6 (2007) 7.

A. Schaffler, J. Weigert, **M. Neumeier**, J. Scholmerich, and C. Buechler,

Regulation and function of collagenous repeat containing sequence of 26-kDa protein gene product "cartonectin",

Obesity (Silver Spring) 15 (2007) 303-313.

S. Abke, **M. Neumeier**, J. Weigert, G. Wehrwein, E. Eggenhofer, A. Schaffler, K. Maier, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler,

Adiponectin-induced secretion of interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2) and interleukin-8 (IL-8, CXCL8) is impaired in monocytes from patients with type I diabetes,

Cardiovasc Diabetol 5 (2006) 17.

G. Paul, A. Schaffler, **M. Neumeier**, A. Furst, F. Bataille, C. Buechler, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, G. Rogler, and H. Herfarth,

Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease,

Inflamm Bowel Dis 12 (2006) 471-477.

A. Schaffler, **M. Neumeier**, H. Herfarth, A. Furst, J. Scholmerich, and C. Buchler,

Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue,

Biochim Biophys Acta 1732 (2005) 96-102.

J. Weigert, **M. Neumeier**, A. Schaffler, M. Fleck, J. Scholmerich, C. Schutz, and C. Buechler,

The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells,

FEBS Lett 579 (2005) 5565-5570.

B. Zietz, C. Buechler, K. Kobuch, **M. Neumeier**, J. Scholmerich, A. Schaeffler,

Serum levels of adiponectin are associated with diabetic retinopathy and with adiponectin gene mutations in Caucasian patients with diabetes mellitus,

Europ. J. Ophthalmol, 2008, im Druck

Letter to the Editor: J Clin Invest., Juli 2006

Buechler C, **Neumeier M**, Weigert J,

Response to Kadowaki et al. AdipoR2 is a 43 kDa protein,

6.1.3 Eingereichte Publikationen

M. Neumeier, J. Weigert, J. Wanninger, M.E. Adams, W. Mages, E. Eggenhofer, C. Aslanidis, T.S. Weiss, A. Schäffler, J. Schölmerich, C. Buechler,

Impaired glucose tolerance and reduced abundance of adiponectin receptors in beta 2-syntrophin deficient mice is partly improved by the simultaneous deletion of alpha-syntrophin,

eingereicht

C. Buechler, A. Schäffler, M. Johann, **M. Neumeier**, P. Köhl, T.S. Weiss, N. Wodarz, P. Kiefer, C. Hellerbrand,

Elevated adiponectin serum levels in patients with chronic alcohol abuserapidly decline during alcohol withdrawal,

eingereicht

J. Weigert, **M. Neumeier**, A. Schäffler, W. Mages, A. Schnitzbauer, A. Obed, B. Gröschl, A. Hartmann, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler,

Aldehyde oxidase 1 is downregulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists in adipocytes,

FEBS Lett, in Revision

S. Wurm, **M. Neumeier**, J. Weigert, M. Gerl, A. Gindner, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler,

Insulin induces monocytic CXCL8 secretion by the mitogenic signalling pathway,

in Revision

A. Schaeffler, P. Gross, R. Buettner, C. Bollheimer, C. Buechler, **M. Neumeier**, A. Kopp, J. Schoelmerich, W. Falk,

Fatty acid-induced induction of TLR-4/NF- κ B-pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity,

eingereicht

A. Kopp, C. Buechler, **M. Neumeier**, J. Weigert, C. Aslanidis, J. Schoelmerich, A. Schaeffler,

Innate immunity and adipocyte function: Ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine and chemokine secretion in adipocytes,
eingereicht

6.2 Kongressbeiträge

6.2.1 Vorträge

Neumeier M,

Tutzing: 06.09.2006

European Lipoprotein Club 29th Annual Meeting, Tutzing, 04.-07.9.2006

Adiponectin Ameliorates Dyslipidemia by Downregulating Apolipoprotein B and E Release in Human Hepatocytes.

6.2.2 Poster

Neumeier M, Weigert J, Weiss TS, Büttner R, Bollheimer C, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C:

Effects of adiponectin on primary human hepatocytes and identification of the associated signal transduction pathways.

European Lipoprotein Club 30th Annual Meeting, Tutzing, 3.-6.9.2007

Neumeier M, Abke S, Eggenhofer E, Schäffler A, Weiss TS, Schölmerich J, Buechler C:

Adiponectin induces IL-6 and CXCL8 in primary human hepatocytes and thereby may alleviate hepatic steatosis.

World Congress of Diabetes, Kapstadt, 03.-07.12.2006

Neumeier M, Wehrwein G, Schäffler A, Weigert J, Schölmerich J, Buechler C:

Die Lipopolysaccharid-vermittelte Proteinexpression ist in Monozyten von Patientinnen mit Typ 1 Diabetes nur partiell verändert.

41. Jahrestagung der DDG, Leipzig, 24.-27.05.2006

Neumeier M, Schäffler A, Wehrwein G, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Wrede C, Buechler C:

Common and specific effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells.

European Lipoprotein Club 28th Annual Meeting, Tutzing, 12.-15.9.2005

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. C. Aslanidis für die Betreuung dieser Arbeit, die Diskussionsbereitschaft, und die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Christa Büchler für die großartige Betreuung, die vielen ausführlichen Diskussionen, für die umfassende Hilfestellung bei diversen Problemen und Problemchen, das Beisteuern vieler Ideen zu dieser Arbeit, das Korrekturlesen, das Erstellen des Zweitgutachtens und für Vieles mehr.

Bei Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly bedanke ich mich für die Bereitschaft den dritten Prüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Herbert Tschochner bedanke ich mich für die Bereitschaft den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.

Mein großer Dank geht an meine Mitstreiterin und gute Freundin Johanna für die Hilfe bei den IPs und den Immunfluoreszenzfärbungen, die helfenden Hände, für die Aufmunterung, die Diskussionen, die Kritik und für das Lachen und den Spaß im Labor.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Wolfgang Mages für die Arbeit am Lasermikroskop und die Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder.

Bei Dr. Alexander Sigrüner möchte ich mich für die Durchführung der Lipid Efflux Experimente bedanken.

PD. Dr. Roland Büttner, PD. Dr. Cornelius Bollheimer, Dr. Erwin Gäbele und Prof. Dr. Marvin Adams danke ich für die Bereitstellung der Lebergewebs- und Serumproben ihrer Versuchstiere.

Dank geht an meine Laborkolleginnen Kerstin, Johanna, Elke, Sylvia, Andrea, Franziska, Natalie, Iris, Christl und an meine Laborkollegen Josef und Fabian für ihre helfenden Hände, die vielen netten Gespräche und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Besonders sei meiner Freundin Kerstin für ihre Nachsicht, für die Aufmunterung, für den Zuspruch, für die moralische und tatkräftige Unterstützung gedankt. Es war sicherlich oft nicht leicht mit meinen Arbeitszeiten auszukommen.

Meiner Familie möchte ich für ihre ständige und uneingeschränkte Unterstützung während meiner Arbeit besonders danken.

Abschließend danke ich noch meinen Freunden Anton, Lars, Markus, Peter, Johanna, Andrea, Thomas, Jakob, Gerd, Alex, und Josch fürs Feierabendbier und für die nötige Abwechslung nach einem anstrengenden Tag.

Diese Arbeit wurde mit der finanziellen Unterstützung der DFG (BU 1141/3-2) durchgeführt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Regensburg, den 16.06.2008

Markus Neumeier

7 Literaturverzeichnis

- [1] D. E. Moller, and K. D. Kaufman, Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective, *Annu Rev Med* 56 (2005) 45-62.
- [2] U. Meier, and A. M. Gressner, Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin, *Clin Chem* 50 (2004) 1511-1525.
- [3] M. K. Lingohr, R. Buettner, and C. J. Rhodes, Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes?, *Trends Mol Med* 8 (2002) 375-384.
- [4] P. Meerarani, J. J. Badimon, E. Zias, V. Fuster, and P. R. Moreno, Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications, *Curr Mol Med* 6 (2006) 501-514.
- [5] C. L. Malmendier, C. Delcroix, and J. F. Lontie, The effect of combined fenofibrate and cholestyramine therapy on low-density lipoprotein kinetics in familial hypercholesterolemia patients, *Clin Chim Acta* 162 (1987) 221-227.
- [6] B. Staels, N. Vu-Dac, V. A. Kosykh, R. Saladin, J. C. Fruchart, J. Dallongeville, and J. Auwerx, Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates, *J Clin Invest* 95 (1995) 705-712.
- [7] P. J. Barter, and K. A. Rye, Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008) 39-46.
- [8] R. J. Shaw, K. A. Lamia, D. Vasquez, S. H. Koo, N. Bardeesy, R. A. Depinho, M. Montminy, and L. C. Cantley, The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin, *Science* 310 (2005) 1642-1646.
- [9] G. Zhou, R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, and D. E. Moller, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J Clin Invest* 108 (2001) 1167-1174.
- [10] B. Kola, M. Boscaro, G. A. Rutter, A. B. Grossman, and M. Korbonits, Expanding role of AMPK in endocrinology, *Trends Endocrinol Metab* 17 (2006) 205-215.
- [11] B. Viollet, M. Foretz, B. Guigas, S. Horman, R. Dentin, L. Bertrand, L. Hue, and F. Andreelli, Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders, *J Physiol* 574 (2006) 41-53.
- [12] F. Chang, L. A. Jaber, H. D. Berlie, and M. B. O'Connell, Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists, *Ann Pharmacother* 41 (2007) 973-983.
- [13] D. J. Betteridge, Effects of pioglitazone on lipid and lipoprotein metabolism, *Diabetes Obes Metab* 9 (2007) 640-647.
- [14] L. Takiya, and S. Chawla, Therapeutic options for the management of type 2 diabetes mellitus, *Am J Manag Care* 8 (2002) 1009-1023; quiz 1024-1007.
- [15] A. Ibrahim, L. Teboul, D. Gaillard, E. Z. Amri, G. Ailhaud, P. Young, M. A. Cawthorne, and P. A. Grimaldi, Evidence for a common mechanism of action for fatty acids

and thiazolidinedione antidiabetic agents on gene expression in preadipose cells, *Mol Pharmacol* 46 (1994) 1070-1076.

[16] Y. Miyazaki, A. Mahankali, E. Wajcberg, M. Bajaj, L. J. Mandarino, and R. A. DeFronzo, Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients, *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004) 4312-4319.

[17] J. M. Lehmann, L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson, and S. A. Kliewer, An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), *J Biol Chem* 270 (1995) 12953-12956.

[18] H. Tilg, and A. R. Moschen, Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity, *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 772-783.

[19] M. Lafontan, and M. Berlan, Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights?, *Trends Pharmacol Sci* 24 (2003) 276-283.

[20] S. E. Meek, K. S. Nair, and M. D. Jensen, Insulin regulation of regional free fatty acid metabolism, *Diabetes* 48 (1999) 10-14.

[21] A. Schaffler, J. Scholmerich, and C. Buchler, Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2 (2005) 273-280.

[22] M. R. Taskinen, Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice, *Diabetologia* 46 (2003) 733-749.

[23] A. Schaffler, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, and C. Buchler, Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases, *Endocr Rev* 27 (2006) 449-467.

[24] E. E. Kershaw, and J. S. Flier, Adipose tissue as an endocrine organ, *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004) 2548-2556.

[25] A. Schaffler, J. Scholmerich, and C. Buchler, Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2 (2005) 103-111.

[26] E. Hu, P. Liang, and B. M. Spiegelman, AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity, *J Biol Chem* 271 (1996) 10697-10703.

[27] Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1999) 79-83.

[28] A. R. Nawrocki, and P. E. Scherer, The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation, *Curr Opin Pharmacol* 4 (2004) 281-289.

[29] F. Vasseur, F. Lepretre, C. Lacquemant, and P. Froguel, The genetics of adiponectin, *Curr Diab Rep* 3 (2003) 151-158.

[30] A. Schaffler, T. Langmann, K. D. Palitzsch, J. Scholmerich, and G. Schmitz, Identification and characterization of the human adipocyte apM-1 promoter, *Biochim Biophys Acta* 1399 (1998) 187-197.

- [31] J. M. Bruun, A. S. Lihn, C. Verdich, S. B. Pedersen, S. Toubro, A. Astrup, and B. Richelsen, Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285 (2003) E527-533.
- [32] M. Chandran, S. A. Phillips, T. Ciaraldi, and R. R. Henry, Adiponectin: more than just another fat cell hormone?, *Diabetes Care* 26 (2003) 2442-2450.
- [33] Y. Nakano, T. Tobe, N. H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita, Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma, *J Biochem* 120 (1996) 803-812.
- [34] K. Maeda, K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara, cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1), *Biochem Biophys Res Commun* 221 (1996) 286-289.
- [35] M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, G. Wehrwein, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, C. Wrede, and C. Buechler, Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells, *J Leukoc Biol* 79 (2006) 803-808.
- [36] X. Wu, H. Motoshima, K. Mahadev, T. J. Stalker, R. Scalia, and B. J. Goldstein, Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes, *Diabetes* 52 (2003) 1355-1363.
- [37] J. P. Whitehead, A. A. Richards, I. J. Hickman, G. A. Macdonald, and J. B. Prins, Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome, *Diabetes Obes Metab* 8 (2006) 264-280.
- [38] T. Kadowaki, and T. Yamauchi, Adiponectin and adiponectin receptors, *Endocr Rev* 26 (2005) 439-451.
- [39] H. Waki, T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, and T. Kadowaki, Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin, *J Biol Chem* 278 (2003) 40352-40363.
- [40] T. S. Tsao, E. Tomas, H. E. Murrey, C. Hug, D. H. Lee, N. B. Ruderman, J. E. Heuser, and H. F. Lodish, Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways, *J Biol Chem* 278 (2003) 50810-50817.
- [41] F. Schober, M. Neumeier, J. Weigert, S. Wurm, J. Wanninger, A. Schaffler, A. Dada, G. Liebisch, G. Schmitz, C. Aslanidis, and C. Buechler, Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release, *Biochem Biophys Res Commun* 361 (2007) 968-973.
- [42] F. Haugen, and C. A. Drevon, Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin, *Endocrinology* 148 (2007) 5478-5486.
- [43] C. Weyer, T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R. E. Pratley, and P. A. Tataranni, Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 1930-1935.
- [44] P. A. Kern, G. B. Di Gregorio, T. Lu, N. Rassouli, and G. Ranganathan, Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression, *Diabetes* 52 (2003) 1779-1785.
- [45] J. J. Diez, and P. Iglesias, The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease, *Eur J Endocrinol* 148 (2003) 293-300.

- [46] N. Stefan, M. Stumvoll, B. Vozarova, C. Weyer, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, C. Bogardus, and P. A. Tataranni, Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans, *Diabetes Care* 26 (2003) 3315-3319.
- [47] M. E. Trujillo, and P. E. Scherer, Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome, *J Intern Med* 257 (2005) 167-175.
- [48] K. Hotta, T. Funahashi, N. L. Bodkin, H. K. Ortmeier, Y. Arita, B. C. Hansen, and Y. Matsuzawa, Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys, *Diabetes* 50 (2001) 1126-1133.
- [49] C. Pender, I. D. Goldfine, C. J. Tanner, W. J. Pories, K. G. MacDonald, P. J. Havel, J. A. Houmard, and J. F. Youngren, Muscle insulin receptor concentrations in obese patients post bariatric surgery: relationship to hyperinsulinemia, *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 (2004) 363-369.
- [50] B. Zietz, H. Herfarth, G. Paul, A. Ehling, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, and A. Schaffler, Adiponectin represents an independent cardiovascular risk factor predicting serum HDL-cholesterol levels in type 2 diabetes, *FEBS Lett* 545 (2003) 103-104.
- [51] M. Matsubara, S. Maruoka, and S. Katayose, Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia, *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 2764-2769.
- [52] G. Targher, L. Bertolini, L. Scala, F. Poli, L. Zenari, and G. Falezza, Decreased plasma adiponectin concentrations are closely associated with nonalcoholic hepatic steatosis in obese individuals, *Clin Endocrinol (Oxf)* 61 (2004) 700-703.
- [53] A. Lopez-Bermejo, P. Botas, T. Funahashi, E. Delgado, S. Kihara, W. Ricart, and J. M. Fernandez-Real, Adiponectin, hepatocellular dysfunction and insulin sensitivity, *Clin Endocrinol (Oxf)* 60 (2004) 256-263.
- [54] F. Tacke, T. Wustefeld, R. Horn, T. Luedde, A. Srinivas Rao, M. P. Manns, C. Trautwein, and G. Brabant, High adiponectin in chronic liver disease and cholestasis suggests biliary route of adiponectin excretion in vivo, *J Hepatol* 42 (2005) 666-673.
- [55] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, and T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat Med* 8 (2002) 1288-1295.
- [56] T. Masaki, S. Chiba, H. Tatsukawa, T. Yasuda, H. Noguchi, M. Seike, and H. Yoshimatsu, Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice, *Hepatology* 40 (2004) 177-184.
- [57] M. Adachi, and D. A. Brenner, High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase, *Hepatology* 47 (2008) 677-685.
- [58] M. Haluzik, J. Parizkova, and M. M. Haluzik, Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications, *Physiol Res* 53 (2004) 123-129.
- [59] N. Kubota, Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, and T. Noda, Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation, *J Biol Chem* 277 (2002) 25863-25866.

- [60] N. Maeda, I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30, *Nat Med* 8 (2002) 731-737.
- [61] A. H. Berg, T. P. Combs, X. Du, M. Brownlee, and P. E. Scherer, The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action, *Nat Med* 7 (2001) 947-953.
- [62] Y. Kamada, S. Tamura, S. Kiso, H. Matsumoto, Y. Saji, Y. Yoshida, K. Fukui, N. Maeda, H. Nishizawa, H. Nagaretani, Y. Okamoto, S. Kihara, J. Miyagawa, Y. Shinomura, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin, *Gastroenterology* 125 (2003) 1796-1807.
- [63] C. Hug, J. Wang, N. S. Ahmad, J. S. Bogan, T. S. Tsao, and H. F. Lodish, T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 10308-10313.
- [64] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, and T. Kadowaki, Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature* 423 (2003) 762-769.
- [65] T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe, Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome, *J Clin Invest* 116 (2006) 1784-1792.
- [66] M. Fasshauer, J. Klein, S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Bluher, and R. Paschke, Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes, *FEBS Lett* 558 (2004) 27-32.
- [67] G. Chinetti, C. Zawadzki, J. C. Fruchart, and B. Staels, Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR, *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2004) 151-158.
- [68] I. Kharroubi, J. Rasschaert, D. L. Eizirik, and M. Cnop, Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells, *Biochem Biophys Res Commun* 312 (2003) 1118-1122.
- [69] A. Tsuchida, T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M. Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai, and T. Kadowaki, Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity, *J Biol Chem* 279 (2004) 30817-30822.
- [70] A. Shimizu, T. Takamura, N. Matsuzawa, S. Nakamura, S. Nabemoto, Y. Takeshita, H. Misu, S. Kurita, M. Sakurai, M. Yokoyama, Y. Zen, M. Sasaki, Y. Nakanuma, and S. Kaneko, Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line, *Metabolism* 56 (2007) 1478-1485.
- [71] T. Yamauchi, Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki, Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions, *Nat Med* 13 (2007) 332-339.

- [72] J. Capeau, The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow, *J Hepatol* 47 (2007) 736-738.
- [73] M. Bjursell, A. Ahnmark, Y. M. Bohlooly, L. William-Olsson, M. Rhedin, X. R. Peng, K. Ploj, A. K. Gerdin, G. Arnerup, A. Elmgren, A. L. Berg, J. Oscarsson, and D. Linden, Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism, *Diabetes* 56 (2007) 583-593.
- [74] Y. Liu, M. D. Michael, S. Kash, W. R. Bensch, B. P. Monia, S. F. Murray, K. A. Otto, S. K. Syed, S. Bhanot, K. W. Sloop, J. M. Sullivan, and A. Reifel-Miller, Deficiency of adiponectin receptor 2 reduces diet-induced insulin resistance but promotes type 2 diabetes, *Endocrinology* 148 (2007) 683-692.
- [75] X. Mao, C. K. Kikani, R. A. Riojas, P. Langlais, L. Wang, F. J. Ramos, Q. Fang, C. Y. Christ-Roberts, J. Y. Hong, R. Y. Kim, F. Liu, and L. Q. Dong, APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function, *Nat Cell Biol* 8 (2006) 516-523.
- [76] M. Miaczynska, S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler-Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R. G. Parton, and M. Zerial, APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment, *Cell* 116 (2004) 445-456.
- [77] T. Saito, C. C. Jones, S. Huang, M. P. Czech, and P. F. Pilch, The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation, *J Biol Chem* 282 (2007) 32280-32287.
- [78] K. K. Cheng, K. S. Lam, Y. Wang, Y. Huang, D. Carling, D. Wu, C. Wong, and A. Xu, Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells, *Diabetes* 56 (2007) 1387-1394.
- [79] Y. Mitsuuchi, S. W. Johnson, G. Sonoda, S. Tanno, E. A. Golemis, and J. R. Testa, Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2, *Oncogene* 18 (1999) 4891-4898.
- [80] C. A. Nechamen, R. M. Thomas, B. D. Cohen, G. Acevedo, P. I. Poulikakos, J. R. Testa, and J. A. Dias, Human follicle-stimulating hormone (FSH) receptor interacts with the adaptor protein APPL1 in HEK 293 cells: potential involvement of the PI3K pathway in FSH signaling, *Biol Reprod* 71 (2004) 629-636.
- [81] L. Yang, H. K. Lin, S. Altuwajjri, S. Xie, L. Wang, and C. Chang, APPL suppresses androgen receptor transactivation via potentiating Akt activity, *J Biol Chem* 278 (2003) 16820-16827.
- [82] T. Varsano, M. Q. Dong, I. Niesman, H. Gacula, X. Lou, T. Ma, J. R. Testa, J. R. Yates, 3rd, and M. G. Farquhar, GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling, *Mol Cell Biol* 26 (2006) 8942-8952.
- [83] P. Zimmermann, The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions, *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006) 947-956.
- [84] D. L. Daniels, A. R. Cohen, J. M. Anderson, and A. T. Brunger, Crystal structure of the hCASK PDZ domain reveals the structural basis of class II PDZ domain target recognition, *Nat Struct Biol* 5 (1998) 317-325.
- [85] S. C. Harrison, Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains, *Cell* 86 (1996) 341-343.
- [86] B. Z. Harris, and W. A. Lim, Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly, *J Cell Sci* 114 (2001) 3219-3231.

- [87] J. Schultz, U. Hoffmuller, G. Krause, J. Ashurst, M. J. Macias, P. Schmieder, J. Schneider-Mergener, and H. Oschkinat, Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels, *Nat Struct Biol* 5 (1998) 19-24.
- [88] D. A. Doyle, A. Lee, J. Lewis, E. Kim, M. Sheng, and R. MacKinnon, Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ, *Cell* 85 (1996) 1067-1076.
- [89] C. Buechler, A. Boettcher, S. M. Bared, M. C. Probst, and G. Schmitz, The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-syntrophin/utrophin complex, *Biochem Biophys Res Commun* 293 (2002) 759-765.
- [90] M. R. Spaller, Act globally, think locally: systems biology addresses the PDZ domain, *ACS Chem Biol* 1 (2006) 207-210.
- [91] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [92] H. C. Birnboim, and J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 7 (1979) 1513-1523.
- [93] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, ed., ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001.
- [94] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1 (1986) 263-273.
- [95] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 5463-5467.
- [96] B. E. Slatko, Thermal cycle dideoxy DNA sequencing, *Methods Mol Biol* 31 (1994) 35-45.
- [97] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150 (1985) 76-85.
- [98] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979, *Biotechnology* 24 (1992) 145-149.
- [99] Y. Ohsaki, T. Maeda, and T. Fujimoto, Fixation and permeabilization protocol is critical for the immunolabeling of lipid droplet proteins, *Histochem Cell Biol* 124 (2005) 445-452.
- [100] W. Drobnik, H. Borsukova, A. Bottcher, A. Pfeiffer, G. Liebisch, G. J. Schutz, H. Schindler, and G. Schmitz, Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains, *Traffic* 3 (2002) 268-278.
- [101] C. Buechler, S. M. Bared, C. Aslanidis, M. Ritter, W. Drobnik, and G. Schmitz, Molecular and functional interaction of the ATP-binding cassette transporter A1 with Fas-associated death domain protein, *J Biol Chem* 277 (2002) 41307-41310.
- [102] M. E. Adams, N. Kramarcy, T. Fukuda, A. G. Engel, R. Sealock, and S. C. Froehner, Structural abnormalities at neuromuscular synapses lacking multiple syntrophin isoforms, *J Neurosci* 24 (2004) 10302-10309.
- [103] M. F. Peters, M. E. Adams, and S. C. Froehner, Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex, *J Cell Biol* 138 (1997) 81-93.

- [104] J. E. Yeon, K. M. Choi, S. H. Baik, K. O. Kim, H. J. Lim, K. H. Park, J. Y. Kim, J. J. Park, J. S. Kim, Y. T. Bak, K. S. Byun, and C. H. Lee, Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease, *J Gastroenterol Hepatol* 19 (2004) 799-804.
- [105] R. Buettner, K. G. Parhofer, M. Woenckhaus, C. E. Wrede, L. A. Kunz-Schughart, J. Scholmerich, and L. C. Bollheimer, Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types, *J Mol Endocrinol* 36 (2006) 485-501.
- [106] M. Saborowski, G. A. Kullak-Ublick, and J. J. Eloranta, The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4 α , *J Pharmacol Exp Ther* 317 (2006) 778-785.
- [107] J. Huuskonen, M. Vishnu, P. E. Fielding, and C. J. Fielding, Activation of ATP-binding cassette transporter A1 transcription by chromatin remodeling complex, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2005) 1180-1185.
- [108] Y. Kato, C. Watanabe, and A. Tsuji, Regulation of drug transporters by PDZ adaptor proteins and nuclear receptors, *Eur J Pharm Sci* 27 (2006) 487-500.
- [109] G. M. Riefler, and B. L. Firestein, Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS, *J Biol Chem* 276 (2001) 48262-48268.
- [110] C. Mulvey, E. Harno, A. Keenan, and K. Ohlendieck, Expression of the skeletal muscle dystrophin-dystroglycan complex and syntrophin-nitric oxide synthase complex is severely affected in the type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat, *Eur J Cell Biol* 84 (2005) 867-883.
- [111] R. S. Obach, P. Huynh, M. C. Allen, and C. Beedham, Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs, *J Clin Pharmacol* 44 (2004) 7-19.
- [112] S. Kitamura, K. Sugihara, and S. Ohta, Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases, *Drug Metab Pharmacokinet* 21 (2006) 83-98.
- [113] S. Shaw, and E. Jayatilleke, The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat, *Biochem J* 268 (1990) 579-583.
- [114] D. Y. Huang, and Y. Ichikawa, Two different enzymes are primarily responsible for retinoic acid synthesis in rabbit liver cytosol, *Biochem Biophys Res Commun* 205 (1994) 1278-1283.
- [115] C. Li, and Y. J. Wan, Differentiation and antiproliferation effects of retinoic acid receptor beta in hepatoma cells, *Cancer Lett* 124 (1998) 205-211.
- [116] Y. Muto, H. Moriwaki, M. Ninomiya, S. Adachi, A. Saito, K. T. Takasaki, T. Tanaka, K. Tsurumi, M. Okuno, E. Tomita, T. Nakamura, and T. Kojima, Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group, *N Engl J Med* 334 (1996) 1561-1567.
- [117] P. M. LoRusso, S. Prakash, A. Wozniak, L. Flaherty, M. Zalupski, A. Shields, H. Sands, R. Parchment, and B. Jasti, Phase I clinical trial of 5-fluoro-pyrimidinone (5FP), an oral prodrug of 5-fluorouracil (5FU), *Invest New Drugs* 20 (2002) 63-71.
- [118] P. Y. Cheng, and E. T. Morgan, Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states, *Curr Drug Metab* 2 (2001) 165-183.

- [119] P. Anzenbacher, and E. Anzenbacherova, Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 737-747.
- [120] M. Kotlyar, and S. W. Carson, Effects of obesity on the cytochrome P450 enzyme system, *Int J Clin Pharmacol Ther* 37 (1999) 8-19.
- [121] D. Lucas, R. Ferrara, E. Gonzalez, P. Bodenez, A. Albores, M. Manno, and F. Berthou, Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans, *Pharmacogenetics* 9 (1999) 377-388.
- [122] C. Lara-Castro, N. Luo, P. Wallace, R. L. Klein, and W. T. Garvey, Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster, *Diabetes* 55 (2006) 249-259.
- [123] O. Ukkola, and M. Santaniemi, Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities?, *J Mol Med* 80 (2002) 696-702.
- [124] T. Bobbert, H. Rochlitz, U. Wegewitz, S. Akpulat, K. Mai, M. O. Weickert, M. Mohlig, A. F. Pfeiffer, and J. Spranger, Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction, *Diabetes* 54 (2005) 2712-2719.
- [125] F. F. Fisher, M. E. Trujillo, W. Hanif, A. H. Barnett, P. G. McTernan, P. E. Scherer, and S. Kumar, Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males, *Diabetologia* 48 (2005) 1084-1087.
- [126] G. P. Hayhurst, Y. H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez, Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis, *Mol Cell Biol* 21 (2001) 1393-1403.
- [127] B. Lucas, K. Grigo, S. Erdmann, J. Lausen, L. Klein-Hitpass, and G. U. Ryffel, HNF4alpha reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma, *Oncogene* 24 (2005) 6418-6431.
- [128] M. Stoffel, and S. A. Duncan, The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 13209-13214.
- [129] K. Greenow, N. J. Pearce, and D. P. Ramji, The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis, *J Mol Med* 83 (2005) 329-342.
- [130] A. Von Eckardstein, C. Langer, T. Engel, I. Schaukal, A. Cignarella, J. Reinhardt, S. Lorkowski, Z. Li, X. Zhou, P. Cullen, and G. Assmann, ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages, *Faseb J* 15 (2001) 1555-1561.
- [131] J. Heeren, U. Beisiegel, and T. Grewal, Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006) 442-448.
- [132] C. Maugeais, U. J. Tietge, K. Tsukamoto, J. M. Glick, and D. J. Rader, Hepatic apolipoprotein E expression promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice, *J Lipid Res* 41 (2000) 1673-1679.
- [133] K. Tsukamoto, C. Maugeais, J. M. Glick, and D. J. Rader, Markedly increased secretion of VLDL triglycerides induced by gene transfer of apolipoprotein E isoforms in apoE-deficient mice, *J Lipid Res* 41 (2000) 253-259.

- [134] A. Xu, Y. Wang, H. Keshaw, L. Y. Xu, K. S. Lam, and G. J. Cooper, The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice, *J Clin Invest* 112 (2003) 91-100.
- [135] A. R. Tall, N. Wang, and P. Mucksavage, Is it time to modify the reverse cholesterol transport model?, *J Clin Invest* 108 (2001) 1273-1275.
- [136] J. D. Bub, T. Miyazaki, and Y. Iwamoto, Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 340 (2006) 1158-1166.
- [137] X. Sun, R. Han, Z. Wang, and Y. Chen, Regulation of adiponectin receptors in hepatocytes by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone, *Diabetologia* 49 (2006) 1303-1310.
- [138] W. Li, J. Tonelli, P. Kishore, R. Owen, E. Goodman, P. E. Scherer, and M. Hawkins, Insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones are not linked to adiponectin receptor expression in human fat or muscle, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007) E1301-1307.
- [139] G. Ding, Q. Qin, N. He, S. C. Francis-David, J. Hou, J. Liu, E. Ricks, and Q. Yang, Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *J Mol Cell Cardiol* 43 (2007) 73-84.
- [140] K. G. Tolman, and J. Chandramouli, Hepatotoxicity of the thiazolidinediones, *Clin Liver Dis* 7 (2003) 369-379, vi.
- [141] D. J. Mangelsdorf, and R. M. Evans, The RXR heterodimers and orphan receptors, *Cell* 83 (1995) 841-850.
- [142] L. J. Millatt, V. Bocher, J. C. Fruchart, and B. Staels, Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis, *Biochim Biophys Acta* 1631 (2003) 107-118.
- [143] R. Buettner, I. Ottinger, J. Scholmerich, and L. C. Bollheimer, Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (2004) E828-833.
- [144] F. Oana, H. Takeda, A. Matsuzawa, S. Akahane, M. Isaji, and M. Akahane, Adiponectin receptor 2 expression in liver and insulin resistance in db/db mice given a beta3-adrenoceptor agonist, *Eur J Pharmacol* 518 (2005) 71-76.
- [145] R. Vuppalachchi, S. Marri, D. Kolwankar, R. V. Considine, and N. Chalasani, Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study, *J Clin Gastroenterol* 39 (2005) 237-242.
- [146] T. Takamura, A. Shimizu, N. Matsuzawa, M. Honda, and S. Kaneko, Adiponectin receptor II in non-alcoholic fatty liver disease, response to Kaser et al., *GUT* 54 (2005).
- [147] S. Kaser, A. Moschen, A. Cayon, A. Kaser, J. Crespo, F. Pons-Romero, C. F. Ebenbichler, J. R. Patsch, and H. Tilg, Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis, *Gut* 54 (2005) 117-121.
- [148] M. Gil-Campos, R. R. Canete, and A. Gil, Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity, *Clin Nutr* 23 (2004) 963-974.
- [149] R. Fayad, M. Pini, J. A. Sennello, R. J. Cabay, L. Chan, A. Xu, and G. Fantuzzi, Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation, *Gastroenterology* 132 (2007) 601-614.

- [150] J. Chudek, M. Adameczak, H. Karkoszka, G. Budzinski, W. Ignacy, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, L. Cierpka, F. Kokot, and A. Wiecek, Plasma adiponectin concentration before and after successful kidney transplantation, *Transplant Proc* 35 (2003) 2186-2189.
- [151] E. A. Rodriguez-Garay, Cholestasis: human disease and experimental animal models, *Ann Hepatol* 2 (2003) 150-158.
- [152] M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, T. S. Weiss, C. Schmidl, R. Buttner, C. Bollheimer, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* 350 (2006) 731-735.
- [153] M. E. Adams, T. M. Dwyer, L. L. Dowler, R. A. White, and S. C. Froehner, Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain, *J Biol Chem* 270 (1995) 25859-25865.
- [154] M. J. Allikian, and E. M. McNally, Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex, *Traffic* 8 (2007) 177-183.
- [155] Y. Munehira, T. Ohnishi, S. Kawamoto, A. Furuya, K. Shitara, M. Imamura, T. Yokota, S. Takeda, T. Amachi, M. Matsuo, N. Kioka, and K. Ueda, Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1, *J Biol Chem* 279 (2004) 15091-15095.
- [156] T. Ort, S. Voronov, J. Guo, K. Zawalich, S. C. Froehner, W. Zawalich, and M. Solimena, Dephosphorylation of beta2-syntrophin and Ca²⁺/mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion, *Embo J* 20 (2001) 4013-4023.
- [157] S. Shklyaev, G. Aslanidi, M. Tennant, V. Prima, E. Kohlbrenner, V. Kroutov, M. Campbell-Thompson, J. Crawford, E. W. Shek, P. J. Scarpance, and S. Zolotukhin, Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 14217-14222.

