

Untersuchungen zur Rolle von alpha-Syntrophin in Adipozyten



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von
Kristina Eisinger
aus Regensburg
im Jahr 2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 24.06.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Kristina Eisinger

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | vi |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Das Fettgewebe | 1 |
| 1.1.1. Entstehung und Aufbau | 1 |
| 1.1.2. Übergewicht / Adipositas | 3 |
| 1.2. Die Leber | 5 |
| 1.2.1. Rolle der Leber im Stoffwechsel | 5 |
| 1.2.2. Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung | 5 |
| 1.2.3. Fettleber und Entzündung | 6 |
| 1.2.4. Interaktion zwischen Fettgewebe und Leber | 7 |
| 1.3. Lipidomics | 8 |
| 1.3.1. Lipidspezies und deren Einteilung | 8 |
| 1.3.2. Serumlipidom in der Adipositas | 11 |
| 1.3.3. Hepatische Lipide in der Fettleber | 11 |
| 1.3.4. Stearoyl-CoA Desaturasen | 12 |
| 1.4. Alpha-Syntrophin | 14 |
| 1.4.1. Struktur und Aufbau | 14 |
| 1.4.2. Funktionen | 14 |
| 1.5. Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| 2. Material und Methoden | 17 |
| 2.1. Material | 17 |
| 2.1.1. Zelllinie | 17 |
| 2.1.2. Antikörper | 17 |
| 2.1.2.1. Primäre Antikörper | 17 |
| 2.1.2.2. Sekundäre Antikörper | 18 |
| 2.1.3. Oligonukleotide | 18 |
| 2.1.4. siRNAs | 19 |
| 2.1.5. Kit-Systeme | 20 |
| 2.1.6. Medien für murine Fibroblasten | 21 |
| 2.1.6.1. Kultivierungsmedium | 21 |
| 2.1.6.2. Differenzierungsmedium | 21 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 2.1.6.3. | Insulin reiches Medium | 21 |
| 2.1.7. | Medium für Gewebekulturen | 21 |
| 2.1.8. | Puffer und Lösungen | 21 |
| 2.1.8.1. | Lösungen für Arbeiten mit DNA | 22 |
| 2.1.8.2. | Lösungen für Arbeiten mit RNA | 22 |
| 2.1.8.3. | Lösungen für die Arbeiten mit Proteinen | 22 |
| 2.1.8.3.1. | Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten | 22 |
| 2.1.8.3.2. | Lösungen für die SDS-PAGE | 23 |
| 2.1.8.3.3. | Lösungen für das Western Blot Verfahren | 24 |
| 2.1.8.3.3.1. | Lösungen für Wet Transfer | 25 |
| 2.1.8.3.3.2. | Lösungen für Semi-dry Transfer | 25 |
| 2.1.8.3.4. | Lösungen für ELISAs | 26 |
| 2.1.8.3.5. | Antikörperlösung | 27 |
| 2.1.8.4. | Lösungen für die Immunhistochemie | 27 |
| 2.1.8.5. | Lösungen für Fettsäurestimulationen | 27 |
| 2.1.9. | Chemikalien | 28 |
| 2.1.10. | Verbrauchsmaterialien | 30 |
| 2.1.11. | Geräte | 31 |
| 2.2. | Methoden | 33 |
| 2.2.1. | Arbeiten mit DNA | 33 |
| 2.2.1.1. | Real Time PCR | 33 |
| 2.2.1.2. | Agarosegelelektrophorese | 34 |
| 2.2.1.3. | Konzentrationsbestimmung von DNA | 35 |
| 2.2.1.4. | Aufreinigung und Sequenzierung von DNA | 35 |
| 2.2.2. | Arbeiten mit RNA | 36 |
| 2.2.2.1. | Isolierung von RNA mittels Trizol® und RNeasy® mini Kit (Qiagen) | 36 |
| 2.2.2.2. | Isolierung von RNA mittel Trizol® und Isopropanolfällung | 36 |
| 2.2.2.3. | Konzentrationsbestimmung von RNA | 36 |
| 2.2.2.4. | Reverse Transkription | 37 |
| 2.2.3. | Arbeiten mit Proteinen | 37 |
| 2.2.3.1. | Präparation von Gesamtzellextrakten | 37 |
| 2.2.3.2. | Präparation von Proteinlysaten aus Geweben | 38 |
| 2.2.3.3. | Konzentrationsbestimmung von Proteinen | 38 |
| 2.2.3.4. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 39 |

| | | |
|------------|---|----|
| 2.2.3.5. | Western Blotting | 39 |
| 2.2.3.5.1. | Wet Transfer Verfahren | 40 |
| 2.2.3.5.2. | Semi-dry Verfahren | 40 |
| 2.2.3.5.3. | Immunologischer Nachweis der Proteine | 40 |
| 2.2.3.6. | Coomassie Färbung | 41 |
| 2.2.3.7. | Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 41 |
| 2.2.3.7.1. | Proinsulin rat / mouse ELISA und Ultrasensitive Insulin mouse ELISA | 42 |
| 2.2.3.7.2. | Duo Set ELISA Systeme | 42 |
| 2.2.4. | Kultivierung muriner Fibroblasten | 42 |
| 2.2.4.1. | Kultivierung | 42 |
| 2.2.4.2. | Differenzierung | 42 |
| 2.2.4.3. | RNA Interference | 43 |
| 2.2.4.4. | Stimulationsexperimente | 44 |
| 2.2.4.4.1. | Inkubation mit Fettsäuren | 44 |
| 2.2.4.4.2. | Stimulation mit Insulin | 44 |
| 2.2.4.4.3. | Stimulation mit Epinephrin | 45 |
| 2.2.4.5. | Zytotoxizitätsbestimmung | 45 |
| 2.2.4.6. | Viabilitätsbestimmung | 46 |
| 2.2.5. | Bestimmung von Cholesterin | 46 |
| 2.2.6. | Bestimmung von Glukose | 46 |
| 2.2.7. | Bestimmung von freiem Glyzerin | 46 |
| 2.2.8. | Bestimmung von Triglyzeriden | 47 |
| 2.2.9. | Massenspektrometrische Analyse von Seren und Leberextrakten | 47 |
| 2.2.10. | Histologische Untersuchungen | 47 |
| 2.2.10.1. | Präparation der histologischen Schnitte | 47 |
| 2.2.10.2. | Hämalaun-Eosin-Färbung | 48 |
| 2.2.11. | Fettgewebekulturen | 48 |
| 2.2.12. | Tiermodelle | 49 |
| 2.2.12.1. | Syntrophin Knock-out Mäuse | 49 |
| 2.2.12.2. | ob/ob Mäuse | 49 |
| 2.2.13. | Experimentaldiäten | 50 |
| 2.2.13.1. | Hochfettdiät (HFD) (ssniff® EF R/M acc. D12451 (II) mod.) | 50 |
| 2.2.13.2. | Standarddiät (SD) (ssniff® EF acc. D12450B (I) mod.) | 51 |
| 2.2.14. | Quantifizierung Immunoblot | 51 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.15. | Statistische Auswertung | 51 |
| 3. | Ergebnisse | 52 |
| 3.1. | SNTA Expression in murinen Adipozyten | 52 |
| 3.1.1. | SNTA während der Adipozytenreifung | 52 |
| 3.1.2. | SNTA während der Adipozytenreifung bei erhöhter Lipidkonzentration | 53 |
| 3.2. | Knock-down von SNTA während der Adipogenese | 53 |
| 3.2.1. | Auswirkung auf die Adipogenese | 53 |
| 3.2.2. | Auswirkung auf die Insulinsensitivität | 55 |
| 3.2.3. | Auswirkung auf die induzierte Lipolyse mit Epinephrin | 56 |
| 3.3. | Knock-down von SNTA in murinen Präadipozyten | 57 |
| 3.3.1. | Auswirkung auf die Proliferation | 57 |
| 3.4. | Mögliche Interaktionen | 58 |
| 3.4.1. | Knock-down von Utrophin und Dystrophin | 58 |
| 3.4.2. | Knock-down von SCD1 | 58 |
| 3.5. | Metabolische Charakterisierung von alpha-Syntrophin knock-out Mäusen nach Diät induzierter Adipositas | 60 |
| 3.5.1. | Gewicht und Futteraufnahme | 60 |
| 3.5.2. | Serumparameter | 61 |
| 3.5.2.1. | Adipositasmarker Chemerin | 61 |
| 3.5.2.2. | Glukosemetabolismus | 62 |
| 3.5.2.2.1. | Glukose | 63 |
| 3.5.2.2.2. | Proinsulin | 63 |
| 3.5.2.2.3. | Insulin | 64 |
| 3.5.2.3. | Lipidmetabolismus | 65 |
| 3.5.2.3.1. | Cholesterin | 65 |
| 3.5.2.3.2. | Triglyzeride | 66 |
| 3.5.2.4. | Serumlipidom | 67 |
| 3.5.3. | Analyse der Fettdepots | 69 |
| 3.5.3.1. | Gewicht | 69 |
| 3.5.3.2. | Histologie | 70 |
| 3.5.3.3. | Analysen auf Proteinebene | 74 |
| 3.5.3.4. | Entzündungsreaktion im Fettgewebe | 78 |
| 3.5.4. | Analyse der Leber | 80 |
| 3.5.4.1. | Gewicht | 80 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.5.4.2. | Histologie | 81 |
| 3.5.4.3. | Analysen auf Proteinebene | 81 |
| 3.5.4.4. | Analysen auf RNA-Ebene | 84 |
| 3.5.4.5. | Leberlipidom | 86 |
| 3.6. | SNTA in der Adipositas | 89 |
| 3.6.1. | SNTA und SCD1 im Fettgewebe von ob/ob Mäusen | 89 |
| 3.6.2. | SNTA und SCD1 in der Leber von ob/ob Mäusen | 91 |
| 4. | Diskussion | 93 |
| 4.1. | Die Rolle von SNTA für die Funktionaliät von Adipozyten | 93 |
| 4.2. | Mögliche Interaktion von SNTA und SCD1 | 97 |
| 4.3. | Die Rolle von SNTA in der hepatischen Lipidspeicherung | 98 |
| 4.4. | SNTA in der Adipositas | 101 |
| 5. | Zusammenfassung | 103 |
| 6. | Publikationen und Kongressbeiträge | 105 |
| 6.1. | Publikationen | 105 |
| 6.1.1. | Erstautorenschaften | 105 |
| 6.1.2. | Koautorenschaften | 105 |
| 6.2. | Kongressbeiträge | 108 |
| 6.2.1. | Vorträge | 108 |
| 6.2.2. | Poster | 108 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 109 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| Abb | Abbildung |
| ABCA1 | ATP-Binding Cassette Transporter A1 |
| AK | Antikörper |
| AKT | Protein Kinase B |
| AMPK | Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATGL | Adipose Triglyceride Lipase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AU | arbitrary unit |
| AUC | Fläche unter der Kurve (area under the curve) |
| BAT | Braunes Fettgewebe |
| BCA | Bicinchoninsäure (-acid) |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin) |
| CE | Cholesterinester |
| Cer | Ceramid |
| cDNA | komplementäre DNA (complementary DNA) |
| C/EBP | CCAAT/Enhancer-Binding Protein |
| Cp | Crossing Point |
| CTB | Cell Titer Blue |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| Cyp7a1 | Cholesterol-7-alpha-hydroxylase |
| Cyp27a1 | Sterol-27-hydroxylase |
| CXCL8 | Interleukin-8 |
| Da | Dalton |
| ddH ₂ O | bidestilliertes Wasser |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMEM-F12 | Dulbecco's Modified Eagle Medium + Ham's F-12 Nutrient Mixture |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| dNTP | Desoxyribonukleotid (N = A, T, G, C) |
| ECL | Enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| epi | epididymal |
| ER | endoplasmatisches Reticulum |
| ERK | p42/44 Mitogen-activated Protein Kinase |
| et al. | et alii (lat.: und andere) |
| E _x | Extinktion bei Wellenlänge x |
| FA/FFA | freie Fettsäuren |
| FC | freies Cholesterin |

| | |
|---------------|--|
| FS | Fettsäuren (Fatty Acid) |
| FABP4 | Fatty Acid-Binding Protein 4 |
| FAS | Fatty Acid Synthase |
| FCS | Fötales Kälberserum (fetal calf serum) |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GLUT4 | Glukose Transporter 4 |
| GTPase | kleines GTP-bindendes Protein |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| H&E | Hämatoxylin-Eosin |
| HFD | Hochfettdiät |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| HSL | Hormone-sensitive Lipase |
| IBMX | 3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| ip | intraperitoneal |
| K | Kontrolle |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| LPC | Lysophosphatidylcholin |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| mRNA | messenger RNA |
| MCS | Mesenchymale Stammzellen |
| min | Minute |
| NCS | Newborn Calf Serum |
| nNOS | neuronale Stickoxid Synthase |
| N-terminal | Amino-terminal |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| OA | Ölsäure |
| OD | optische Dichte |
| pAK | polyklonaler Antikörper |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline) |
| PBST | Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline) mit Tween |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) |
| PDZ | PSD-95/Disc-Large/ZO-1 |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PH | Pleckstrin Homology |
| PI | Phosphatidylinositol |
| Plasma | Phosphatidylethanolamin basierte Plasmalogene |
| PPAR γ | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma |
| pre | Vorläuferform |
| PS | Phosphatidylserin |

| | |
|----------|---|
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| sc | subkutan |
| SCD-1 | Stearoyl-CoA Desaturase-1 |
| SD | Standarddiät |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| siRNA | Small Interfering RNA |
| SM | Sphingomyelin |
| SNTA | alpha-Syntrophin |
| SNTBA KO | alpha-Syntrophin Knockout |
| SR-BI | scavenger receptor B I |
| SU | Syntrophin Unique |
| SVF | stroma-vaskuläre Fraktion |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBS | Trispuffer (Tris Buffered Saline) |
| TBST | Trispuffer (Tris Buffered Saline) mit Tween |
| TEMED | N, N, N', N' - Tetramethyldiamin |
| TG | Triglyzeride |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| Tris | Tris(hydroxymethyl-) aminomethan |
| uni | Univers |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volumen |
| WAT | Weißes Fettgewebe |
| vis | viszeral |
| WT | Wildtyp |

1. Einleitung

1.1. Das Fettgewebe

1.1.1. Entstehung und Aufbau

In Säugern gibt es zwei Arten von Fettgeweben, nämlich weißes und braunes Fettgewebe. Während das weiße Fettgewebe der Energiespeicherung dient, ist das braune Fettgewebe darauf ausgelegt Thermogenese zu betreiben [1]. Sowohl weiße als auch braune Adipozyten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Aus diesen mesenchymalen Stammzellen können nicht nur die Adipozyten, sondern auch Muskel- und Knochenzellen entstehen [2]. Die MSC können sich in weiße Adipozytenvorläuferzellen (CD24+, *Peroxisome-Proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ +)), braune Adipozyten / Muskelvorläuferzellen (myogenic factor 5 (Myf5+)) und Osteoblasten entwickeln. Die weißen Adipozyten Vorläuferzellen differenzieren über eine Kaskade an der PPAR γ und CCAAT/Enhancer-Binding-Protein α (C/EBP α) beteiligt sind zu weißen Adipozyten. Braune Adipozyten und Muskelzellen teilen sich einen gemeinsamen Vorläufer; durch die Induktion von PR Domain containing 16 (PRDM16) und PPAR γ differenzieren diese zu braunen Adipozyten, werden hingegen Myogenin und Myogener Faktor 3 (Myo D) induziert, entstehen Myozyten [2-4]. Runx-related transcription factor 2 (RunX2) und Osterix (Osx) regulieren die Osteoblastendifferenzierung (Abb. 1).

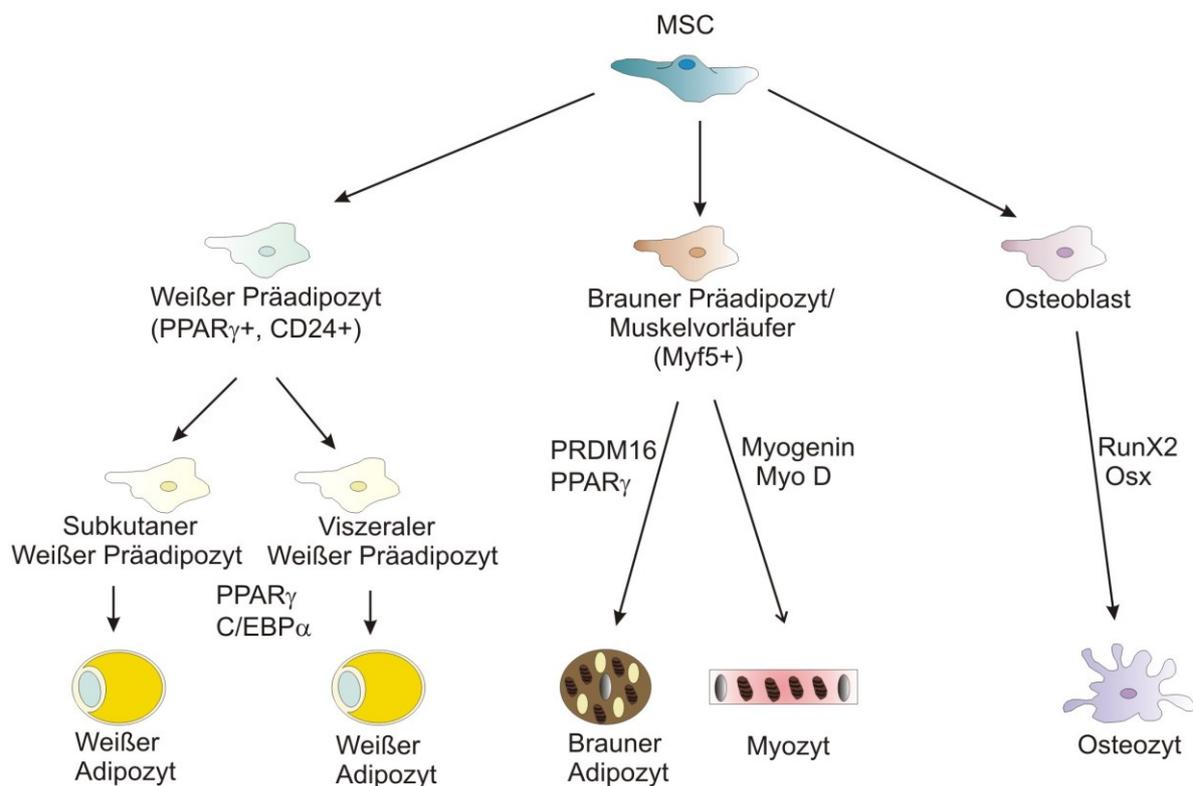


Abb. 1: Darstellung der Entwicklung von Adipozyten ausgehend von mesenchymalen Stammzellen (MSC) (nach [2, 3])

Das weiße Fettgewebe besteht allerdings nicht nur aus Adipozyten, man geht davon aus, dass sich das Fettgewebe zu 50 % aus Adipozyten und zu 50 % aus anderen Zellen wie Präadipozyten, vaskulären Zellen und Immunzellen zusammensetzt. Die Adipozyten, Makrophagen und Präadipozyten im Fettgewebe sezernieren eine Vielzahl an Hormonen und Zytokinen. Mittels dieser Adipokine beeinflusst das Fettgewebe andere Gewebe wie Leber und Muskel [5]. Man kann aber nicht nur weißes und braunes Fettgewebe unterscheiden. Das weiße Fettgewebe auch nach seiner Lokalisation in intraabdominales und subkutanes Fettgewebe differenziert werden. Das intraabdominale Fettgewebe findet sich an der Niere, den Gonaden und am Darm (mesenteriales Fettgewebe) wobei letzteres direkt in die Pfortader drainiert. Das subkutane Fettgewebe befindet sich unter der Haut [3]. Diese Unterscheidung ist wichtig, denn die verschiedenen weißen Fettgewebe haben unterschiedliche Eigenschaften. Dies zeigt sich bei mit der Adipositas / Übergewicht assoziierten metabolischen Erkrankungen, die unter 1.1.2 erklärt werden [6]. Die Gruppe um Philipp E. Scherer konnte mit Hilfe der sogenannten AdipoChaser Maus beeindruckende neue Details zu den Unterschieden zwischen subkutanem und dem intraabdominell lokalisiertem epididymalem Fettgewebe in der Entstehung, Expansion und dem sog. „Browning“ weißer Adipozyten

herausarbeiten. Sie konnten zeigen, dass epididymales Fett hauptsächlich postnatal auftritt, während das subkutane Fettgewebe schon im Embryo zwischen Tag 14 und 18 entsteht. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Adipozyten im epididymalen Fettgewebe bei der Fütterung einer Hochfettdiät zunächst größer werden (Hypertrophie) und bereits nach 4 Wochen Diät neue zusätzliche Adipozyten gebildet werden (Hyperplasie), wohingegen das subkutane Fettgewebe auch nach 12 Wochen Hochfettdiät Fütterung keine Hyperplasie aufweist, sondern nur Hypertrophie. Beim sog. „Browning“ geht man davon aus, dass sich, unter anderem durch Kälte, weiße Adipozyten morphologisch und funktionell in Richtung braune Adipozyten transdifferenzieren und zu sogenannten beige Adipozyten werden. Sie könnten aber auch aus einer bisher nicht näher charakterisierten Untergruppe von Vorläuferzellen entstehen. Anhand des AdipoChase Mausmodells konnte gezeigt werden, dass im subkutanen Fettgewebe die beige Adipozyten aus Vorläuferzellen und nicht aus den vorhandenen weißen Adipozyten hervorgehen. Im epididymalen Fettgewebe konnten durch Kälteexposition keine beige Adipozyten nachgewiesen werden, allerdings eine erhöhte *de novo* Adipogenese. Anhand dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die intraabdominalen und subkutanen Fettdepots unterschiedliche Bedeutungen für den Metabolismus haben [7].

1.1.2. Übergewicht / Adipositas

Die Adipositas stellt einen Risikofaktor für metabolische Erkrankungen wie Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes, Bluthochdruck, Dyslipidämien, kardiovaskuläre Erkrankungen, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), polyzystisches Ovar Syndrom und verschiedene Krebsarten dar [8, 9] (Abb. 2). Übergewicht bzw. Adipositas entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Von Übergewicht spricht man ab einem BMI größer $25 \text{ kg} / \text{m}^2$ und von Adipositas ab einem BMI größer / gleich $30 \text{ kg} / \text{m}^2$. Das Fettgewebe ermöglicht die Speicherung zusätzlicher Triglyzeride indem die Adipozyten sich vergrößern (Hypertrophie) oder die Zahl der Adipozyten erhöht wird (Hyperplasie). Wie bereits erwähnt, spielt der Ort der Lipideinlagerung eine entscheidende Rolle für die Ausbildung metabolischer Erkrankungen. Wird das Fett hauptsächlich intraabdominell gespeichert, spricht man von einer zentralen oder apfelförmigen Adipositas, die mit einem hohen Risiko für Typ 2 Diabetes und der Ausbildung des metabolischen Syndroms in Verbindung gebracht wird. Werden die Lipide hingegen hauptsächlich im subkutanen Fettgewebe an den Hüften und Oberschenkeln gespeichert,

spricht man von einer peripheren oder birnenförmigen Adipositas, bei der das Risiko Typ 2 Diabetes oder das Metabolische Syndrom auszubilden geringer ist [3]. In adipösem Fettgewebe besteht eine Dysregulation in der Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, die zu den Folgeerkrankungen einer Adipositas beitragen. Es wurde bereits festgestellt, dass das adipöse Fettgewebe, vor allem das viszerale Fett, vermehrt von Makrophagen infiltriert wird, die eine Hauptquelle für das pro-inflammatorische Milieu sind [10, 11]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine parakrine Verbindung zwischen freien Fettsäuren (FFA) und dem Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) besteht, die dazu führt, dass vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (TNF α , IL-6, MCP1) und weniger anti-inflammatorische Faktoren (Adiponektin) sezerniert werden [11]. Die Lipolyse von Triglyzeriden ist in adipösen Patienten um 50 % erhöht, was durch TNF α und IL-6, die von den Makrophagen im Fettgewebe sezerniert werden, gefördert wird. Die erhöhten FFA führen außerdem zu einer gesteigerten hepatischen Glukoseproduktion und zur Insulinresistenz. IL-6 fördert weiterhin die Entzündung in Adipozyten, Endothel- und Leberzellen und die Insulinresistenz indem es in das Insulin Signaling des Fettgewebes und der Leber eingreift [5].

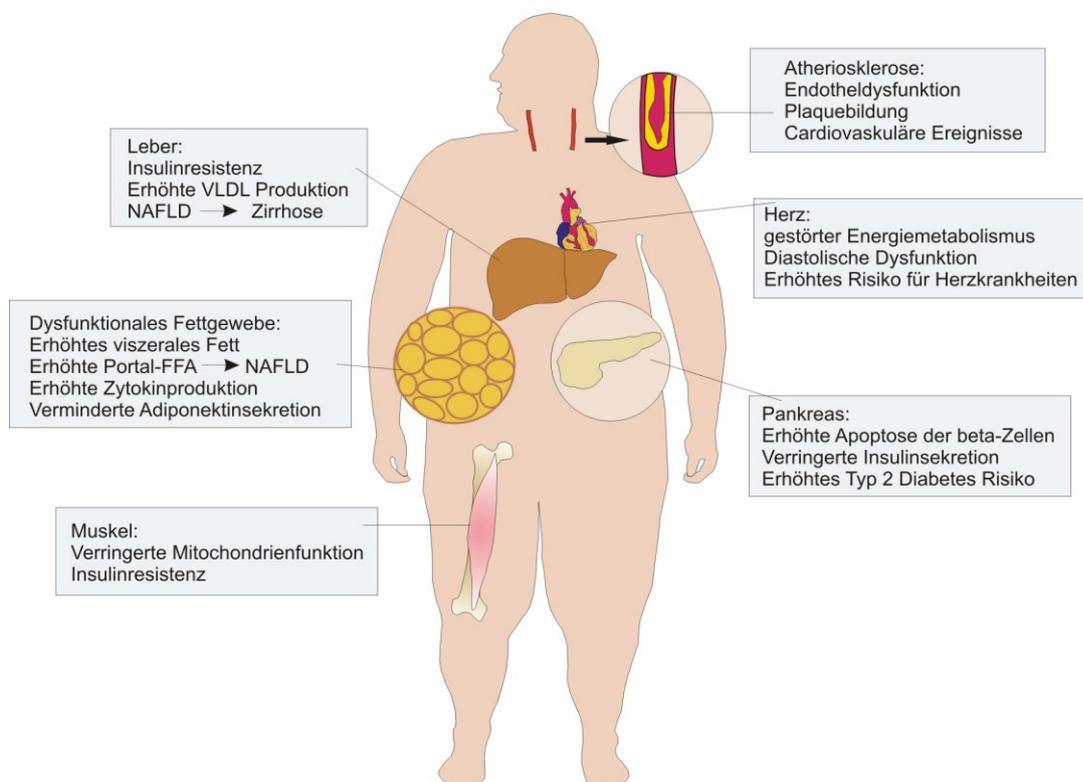


Abb. 2: Darstellung der durch die Adipositas ausgelösten metabolischen Störungen und damit einhergehender Erkrankungen (nach [12]).

1.2. Die Leber

1.2.1. Rolle der Leber im Stoffwechsel

Die Leber hat anatomisch gesehen eine zentrale Lokalisierung im gastrointestinalen Trakt und ist das metabolische Hauptorgan für anabole und katabole Prozesse. Die Leber ist mit dem Darm zum Einen über die Pfortader und zum Anderen über die enterohepatische Gallenzirkulation verbunden. Somit hat die Leber eine Vielzahl an Funktionen im Organismus, wie die Entgiftung, Hormonproduktion, Glukoneogenese und Plasmaproteinsynthese. Eine weitere wichtige Aufgabe hat dieses Organ im Lipidstoffwechsel. Hier findet die Cholesterinbiosynthese, die *de novo* Lipogenese, die Synthese von Apolipoproteinen und die Aufnahme (über Chylomikronen) und Abgabe (über VLDL) von Triglyzeriden ins Blut statt. Außerdem speichert die Leber Glykogen, fettlösliche Vitamine, Eisen und Kupfer. Um für eine Balance im Nährstoffangebot im Blut zu sorgen, können Hepatozyten von einer intensiven Fettsäuresynthese zu einem rapiden Fettsäureabbau wechseln. Die Fettsäuren werden aber nicht als unveresterte oder freie Fettsäuren ins Blut abgegeben, sondern in komplexe Lipide wie Triglyzeride, Phosphoglyzerolipide und Cholesterinester in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingebaut. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) vermittelt die Assoziation von Triglyzeriden mit Apolipoprotein B100 im ER Lumen und die zusammengesetzten VLDL Lipoproteinpartikel verlassen die Zelle durch Exozytose [13]. Des Weiteren wird in der Leber Cholesterin über Cholesterinhydroxylasen in die beiden primären Gallensäuren CA (3α , 7α , 12α -trihydroxy-cholanoic acid) und CDCA (3α , 7α -dihydroxy-cholanoic acid) umgewandelt. Die Gallensäuren werden in den Verdauungstrakt abgegeben, im Darm zum Teil wieder aufgenommen und zurück zur Leber transportiert, wo sie die Gallensäuresynthese inhibieren; der andere Teil wird ausgeschieden [14].

1.2.2. Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) zählt zu den verbreitetsten chronischen Lebererkrankungen in den westlichen Industrieländern mit einer Prävalenz von ca. 20 % - 30 % in der Bevölkerung [15]. Die Prävalenz steigt bei übergewichtigen Personen stark an und kann bei nicht diabetischen adipösen Personen bis zu 98 % betreffen [16]. Die NAFLD beschreibt das Krankheitsbild der benignen Steatose, der Nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) einhergehend mit hepatischer Entzündung und möglicherweise Fibrose, die

letztendlich in einer Leberzirrhose resultiert [17] (Abb. 3). Die Diagnose dieser Erkrankung erfordert den Ausschluss von Patienten die eine Fettlebererkrankung auf Grund von Medikamenten oder übermäßigem Alkoholkonsum entwickeln.

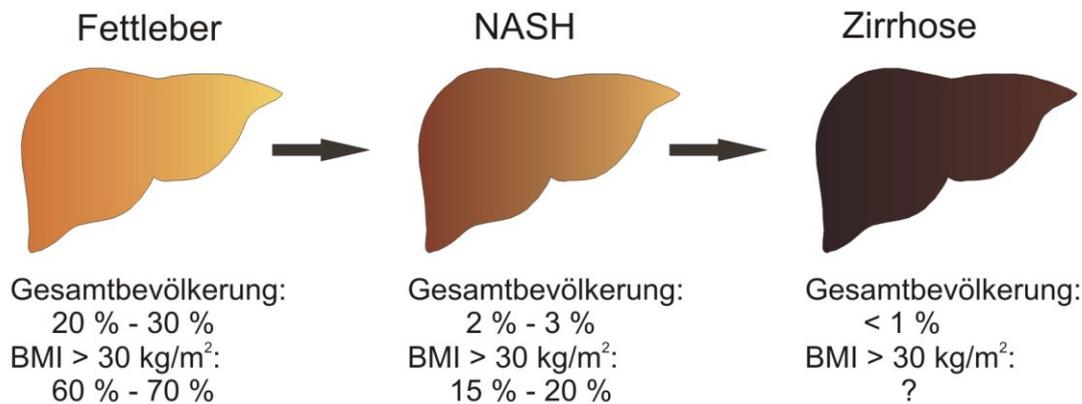


Abb. 3: Epidemiologie der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (nach [18])

1.2.3. Fettleber und Entzündung

Die hepatische Steatose ist mit Adipositas, Insulinresistenz und Hyperlipidämie assoziiert, allesamt Komponenten des metabolischen Syndroms. Aber weder entwickeln alle Personen mit metabolischem Syndrom eine hepatische Steatose, noch bildet sich bei allen Patienten mit hepatischer Steatose eine NASH aus [19]. Tilg et al. stellten die sogenannte „multiple parallel hits“ Hypothese für die Entstehung der NASH auf. Diese postuliert, dass mehrere gleichzeitig wirkende Faktoren zur Pathogenese der NASH beitragen. Während die einfache Steatose lediglich eine Akkumulation von Lipiden im Lebergewebe darstellt, die aus hepatologischer Sicht als benigne bezeichnet wird, ist die NASH durch eine chronische Entzündung charakterisiert. Insbesondere Faktoren, die aus dem Darm und dem Fettgewebe in die Leber gelangen, scheinen hier eine zentrale Rolle zu spielen. Die Verfettung und Entzündung bewirken einen ER Stress, der wiederum die Steatose und Entzündung fördert [20].

Die Leber besteht aus einer Vielzahl von Zelltypen, die alle potentiell an einer Entzündung beteiligt sein können. Hepatozyten machen 60 – 80 % der Leberzellen aus und sind verantwortlich für die Gallensekretion und die metabolische, biosynthetische und entgiftende Rolle der Leber. Aber die Leber besitzt auch verschiedene Immunzellen, wie Kupfferzellen und natürliche Killerzellen (angeborenes Immunsystem), natürliche T Killerzellen, B Zellen und T Zellen (adaptives Immunsystem). Bei Verletzungen werden sehr schnell Neutrophile, Leukozyten, und Monozyten in die Leber rekrutiert. Des Weiteren tragen sinusoidale

Endothelzellen und hepatische Sternzellen zur Entzündung und Fibrose bei [21]. Die mit der Lipidakkumulation einhergehende Entzündung und Insulinresistenz ist assoziiert mit der Aktivierung der Kupffer-Zellen, wobei das TNF α -Signaling durch die Kupffer-Zell-Aktivierung essentiell für die Entwicklung einer NASH und einer Leberfibrose zu sein scheint [22]. Das angeborene Immunsystem spielt in der Pathogenese der NASH eine Rolle wobei insbesondere die Funktion der Kupffer-Zellen in akuten und chronischen Lebererkrankung gut untersucht ist. Die Kupffer-Zellen werden sowohl durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) als auch durch schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) aktiviert. PAMPs sind endogene Warnsignale, die in der NASH zur Entzündung durch das Signaling über „pattern recognition receptors“ (PRRs) beitragen und das angeborene und adaptive Immunsystem aktivieren. PAMPs werden von PRRs, Toll-like Receptors (TLRs), nucleotide-binding und oligomerization domain (NOD)-like Receptors (NLRs), RIG-I like Receptors und anderen nicht-spezifischen Sensoren erkannt. PAMPs werden von Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen hergestellt und schließen Lipide, Lipoproteine, Nukleinsäuren und Proteine mit ein. DAMPs sind endogene Moleküle, die von beschädigten Zellen freigesetzt werden und somit eine sterile Entzündung auslösen. In der NASH besteht der chronische Zustand einer sterilen Entzündung, hervorgerufen durch DAMPs. Ähnlich wie PAMPs aktivieren auch DAMPs beide Zweige des Immunsystems. In der NASH wurden die high-mobility group-1 (HMGB1) und freie Fettsäuren (FFA) mit ihrem Signaling über TLRs bzw. NLR als die wichtigen DAMPs identifiziert [21]. Auch das Fettgewebe, besser gesagt dessen Dysfunktion, trägt zur Entstehung einer NAFLD und einer NASH bei. Denn durch übermäßige Lipideinlagerungen in Adipozyten und erhöhte Konzentrationen an freien Fettsäuren kann es zu einer erhöhten Lipidakkumulation in der Leber, Insulinresistenz und fortschreitendem Leberschaden kommen. Des Weiteren verursacht die Dysfunktion der Fettgewebe eine erhöhte Sezernierung von pro-inflammatorischen Adipokinen und eine verringerte Sekretion von Adiponektin, das anti-inflammatorisch und anti-steatotisch wirkt. Beide Ereignisse tragen zu der Entwicklung einer NAFLD und einer NASH bei [12, 18].

1.2.4. Interaktion zwischen Fettgewebe und Leber

Der Cross Talk zwischen Fettgewebe und Leber findet laut der Portalthypothese hauptsächlich zwischen mesenterialem Fettgewebe und der Leber statt. Die Portalthypothese besagt, dass v.a. in der Adipositas, FFA und Zytokine, die aus diesem Fett freigesetzt werden, direkt über die Pfortader in die Leber gelangen, während andere Fettgewebe FFA und Zytokine

systemisch freisetzen. Die erhöhten Konzentrationen an FFA und pro-inflammatorischen Faktoren wie IL-6 und IL-1 β , die in der Adipositas vom viszeralen Fett direkt über die Pfortader in die Leber gelangen, führen dort zu Entzündung, Insulinresistenz und Steatose [6]. Die exzessive Anhäufung an FFA und pro-inflammatorischen Zytokinen führt auf Dauer in der Leber zur Aktivierung intrazellulärer Entzündungsmechanismen in Hepatozyten und zur Aktivierung der Kupfferzellen und der hepatischen Sternzellen, was die Entwicklung einer Zirrhose fördert [12] (Abb. 4).

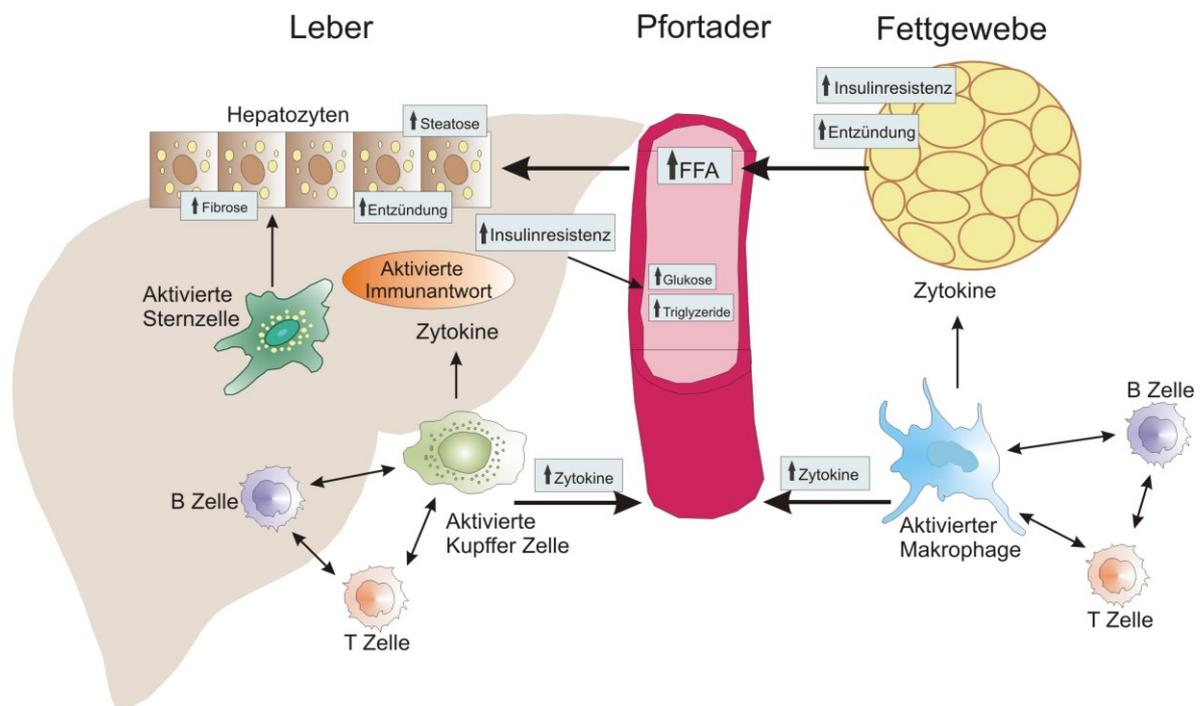


Abb. 4: Darstellung des „Cross Talks“ zwischen Fettgewebe und Leber in der Adipositas (nach [12]).

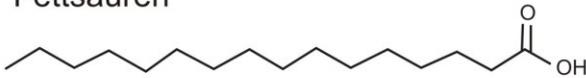
1.3. Lipidomics

1.3.1. Lipidspezies und deren Einteilung

Lipidomics bezeichnet ein relativ junges Forschungsgebiet mit dem Ziel alle Lipidspezies und deren biologische Rolle zu analysieren [23]. Die Lipide lassen sich in folgende Kategorien einteilen: FFA, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Sterollipide und Prenollipide (Abb. 5). Die FFA stellen nur eine kleine Fraktion der Gesamtlipide im Plasma dar, sind aber metabolisch eine hoch aktive Klasse. Die Hauptquelle der FFA liegt im

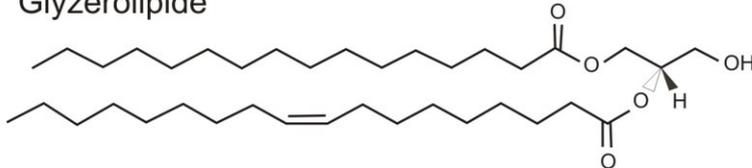
Fettgewebe und wird von diesem bei Energiebedarf anderer Gewebe freigesetzt. Bei manchen Krankheiten ist diese Homöostase gestört und es kommt zu einer erhöhten Lipolyse und exzessiven Freisetzung von FFA [24]. Die Glycerolipide umfassen einen Großteil der Gesamtlipide im Plasma, wobei die Triglyzeride (TG) den größten Teil der Glycerolipide ausmachen. Die absolute Konzentration von TG ist von der Nahrungsaufnahme abhängig, da die Synthese und das Verpacken der TG in Chylomicronen und VLDL die Hauptmechanismen zum Transport der TG in die Gewebe darstellt. Auch Diglyzeride liegen im Plasma vor, allerdings in sehr viel geringerem Maße [24]. Die Glycerophospholipide kann man wiederum einteilen in Glycerophosphat (PA), Glycerophosphocholin (PC), Glycerophosphoethanolamin (PE), Glycerophosphoglycerol (PG), Glycerophosphoinositol (PI) und Glycerophosphoserin (PS). Den größten Anteil an Glycerophospholipiden im humanen Plasma machen die Subklassen PC und PE aus. Diese beiden Klassen weisen auch einen erheblichen Anteil an Ether-gekoppelten Lipiden auf [24]. Zu den Sphingolipiden zählt das Sphingomyelin, das den Hauptteil der Sphingolipide ausmacht. Des Weiteren gehören zu den Sphingolipiden die Ceramide, die Phosphosphingolipide und die Glycosphingolipide [23, 24]. Die Sterollipide lassen sich in Sterole, Cholesterin und seine Derivate, Steroide und Gallensäuren und deren Derivate einteilen [23]. Die Sterollipide liegen sowohl in der freien als auch in der veresterten Form vor. Den Großteil der Sterollipide stellt das Cholesterin dar, das auch in seiner freien Form und als Cholesterinester (CE) vorliegen kann. Prenollipide werden aus 5 Kohlenstoff Isopreneinheiten synthetisiert [24]. Zu den Prenollipiden zählen Isoprenoide, Quinone und Hydroquinone und Polyprenole [23]. Dolichole sind α -gesättigte Polyprenole, die eine klinische Rolle zu spielen scheinen und deren Serum / Plasma Level in einigen Krankheiten erhöht vorliegen. Ubiquinone sind 1,4-benzoquinone, die mit wiederholenden Isopreneinheiten modifiziert werden. Ubiquinone spielen eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Elektronentransferkette und sind somit notwendig für die ATP-Synthese [24].

Fettsäuren



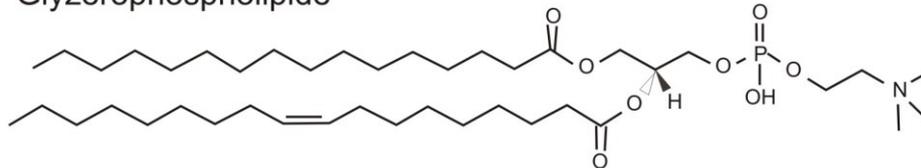
Strukturbeispiel: Hexadecanolsäure

Glyzerolipide



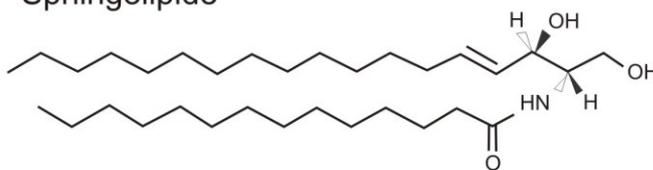
Strukturbeispiel: 1-hexadecanoyl-2-(9Z-oktadecenoyl)-sn-glyzerol

Glyzerophospholipide



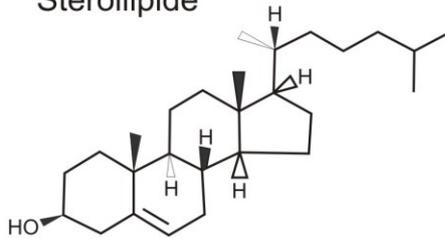
Strukturbeispiel: 1-hexadecanoyl-2-(9Z-oktadekenoyl)_sn-glyzero-phosphocholin

Spingolipide



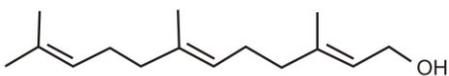
Strukturbeispiel: N-(tetradekanoyl)-sphing-4-enin

Sterollipide



Strukturbeispiel: cholest-5-en3b-ol

Prenollipide



Strukturbeispiel: 2E,6E-farnesol

Abb. 5 : Darstellung der Einteilung der verschiedenen Lipidspezies und Veranschaulichung an Hand eines Strukturbeispiels (nach [23])

1.3.2. Serumlipidom in der Adipositas

Die Adipositas stellt ein ernstes Gesundheitsproblem dar, das mit einer Reihe von chronischen Erkrankungen, wie Typ 2 Diabetes und Insulinresistenz, einhergeht. Es wird davon ausgegangen, dass der Anstieg von freien Fettsäuren und Triglyzeriden im Serum zur Entstehung von Typ 2 Diabetes und Insulinresistenz beiträgt. Wahrscheinlich ist, dass neben diesen Fetten weitere Lipidspezies in der Adipositas verändert sind und ebenfalls metabolische Veränderungen bewirken [25]. Die Identifizierung dieser Lipidspezies und die Klärung der hieran beteiligten Stoffwechselwege sind von pathophysiologischer, diagnostischer und therapeutischer Relevanz. Pietiläinen et al. konnten in einer Studie monozygotischer Zwillinge zeigen, dass in der Adipositas sowohl Lysophosphatidylcholin als auch Ether-Phospholipide im Serum erhöht vorliegen und, dass diese Erhöhung mit der Insulinresistenz in Verbindung steht [26]. Kim et al. identifizieren in ihrem metabolischen Profil adipöser und normalgewichtiger Individuen drei Lysophosphatidylcholine (LPC) Spezies als mögliche Plasmamarker. LPC 14:0 und LPC 18:0 liegen in der Adipositas erhöht und LPC 18:1 erniedrigt vor. Außerdem konnten sie untermauern, dass die Triglyzeride und freien Fettsäuren in der Adipositas im Plasma erhöht sind [27]. Die Untersuchung des Plasmas morbid adipöser Patienten ergab weiterhin erhöhte Konzentrationen an Ethergekoppelten Phosphatidylcholinen und Phosphatidylethanolaminen [28]. Des Weiteren sind in adipösen Typ 2 Diabetes Patienten die Ceramidspiegel erhöht und weisen eine Korrelation mit dem Schweregrad der Insulinresistenz auf [29]. Betrachtet man das Tiermodell konnte gezeigt werden, dass im Plasma von Mäusen, die mit einer Hochfettdiät gefüttert wurden, fast alle LPC Spezies erniedrigt und Sphingomyelin, Ceramid und Phosphatidylcholin erhöht vorliegen [25, 30].

1.3.3. Hepatische Lipide in der Fettleber

Die Akkumulation von vor allem Triglyzeriden in der Leber ist bei vielen Lebererkrankungen zu beobachten. Da die Leber ein zentrales Organ im Lipidstoffwechsel ist und die Adipositas mit einer Veränderung des Serumlipidoms einhergeht, liegt es nahe anzunehmen, dass neben den Triglyzeriden noch weitere Lipide in der Leber erhöht bzw. erniedrigt sind. Puri et al. konnten zeigen, dass in Patienten mit NAFLD bzw. NASH der Gesamtlipidgehalt der Leber erhöht ist, was hauptsächlich durch signifikant erhöhte Triglyzerid (TG) und Diglyzerid Konzentrationen verursacht wird. Betrachtet man die Zusammensetzung der TG näher, stellt man fest, dass bei diesen die gesättigten Fettsäuren (SFA) unverändert, die einfach

ungesättigten Fettsäuren (MUFA) erhöht und die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) erniedrigt vorliegen [31]. Des Weiteren kann festgehalten werden, dass in der steatotischen Leber die freien Fettsäuren, das freie Cholesterin und Cholesterinester (CE) unverändert im Vergleich zu den gesunden Lebern vorliegen. Freies Cholesterin ist jedoch in der NASH erhöht. Lysophosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin sind in der NAFLD nicht verändert. Anders verhält es sich bei Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Diese liegen in der NAFLD in erniedrigter Konzentration vor. Interessant ist auch die Tatsache, dass, obwohl die Cholesterinester (CE) in der NAFLD in der Gesamtkonzentration unverändert vorliegen, deren Zusammensetzung von der in gesunden Probanden abweicht: die CE SFA liegen erniedrigt, die CE MUFA unverändert und die CE PUFA erhöht vor [31]. Bei der Untersuchung von Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Cholin in der Fettleber von Ratten erniedrigt ist und Phosphatidylcholin entgegen den oben dargestellten Ergebnissen in der Fettleber von Mäusen erhöht vorliegt [30, 32]. Außerdem konnten Kurek et al. nachweisen, dass hepatisches Ceramid und Sphingomyelin in der NAFLD von Ratten erhöht vorliegt. Des Weiteren beschreiben sie, dass die Blockierung der Ceramidsynthese die Steatose und die Insulinsensitivität verbessert [33].

1.3.4. Stearoyl-CoA Desaturasen

Die Lipidanalysen in der NAFLD legen nahe, dass die Aktivität von Desaturasen verändert ist. Stearoyl-CoA Desaturasen sind membrangebundene delta-9 Desaturasen, die das Einfügen der ersten cis-Doppelbindung an der delta-9 Position von 12-19 Kohlenstoff langen, gesättigten Fettsäuren katalysieren und somit in einfach ungesättigte Fettsäuren umwandeln. SCD1 bevorzugt als Substrate Palmitat und Stearat und wandelt diese in Palmitoleat und Oleat um. Es ist bekannt, dass SCD1 ein in hohem Maße reguliertes Enzym ist, dessen Genexpression durch Glukose, Fruktose, gesättigte Fettsäuren, Insulin und die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c und LXR induziert und durch Leptin und PUFAs gehemmt wird [34].

Bis jetzt wurden verschiedene Gewebespezifische und ein Ganzkörper SCD1 knock-out im Mausmodell untersucht. Der Ganzkörper knock-out von SCD1 zeigt, dass die Mäuse vor einer Diät induzierten Gewichtszunahme geschützt sind und sogar eine erhöhte Lipidoxidation und Insulinsensitivität in Leber, Muskel und Fettgewebe aufweisen [35]. Der Leber spezifische knock-out von SCD1 konnte nur einen Schutz vor einer kohlenhydratreichen Diät induzierten Gewichtszunahme, nicht aber einen Schutz vor einer Gewichtszunahme bei fettreicher Diät,

nachweisen [36]. Eine Kombination aus Leber und Fettgewebe spezifischem SCD1 knock-out hingegen bewirkte keinen Phänotyp bzgl. der Diät induzierten Gewichtszunahme [37]. Der Fettgewebe spezifische SCD1 knock-out zeigt eine Erhöhung des Glukose Transporters GLUT1 im Fettgewebe [38]. *In vitro* Daten ergeben, dass die Inhibierung der SCD1 in 3T3-L1 Adipozyten eine verringerte Lipid Akkumulation und eine Aktivierung der AMPK zur Folge hat [39]. Ist die Expression von SCD1 auf welche Weise auch immer gehemmt oder nicht existent, werden metabolische Parameter verbessert, wie zum Beispiel die Insulinsensitivität und Entzündung der Haut, die hepatische Steatose, die Adipositas und die Entzündung im Fettgewebe. Allerdings sind die Aussagen bezüglich SCD1 und Entzündung / Stress in verschiedenen Geweben in der Literatur widersprüchlich [40] (Abb. 6). Pathophysiologisch konnte gezeigt werden, dass die murine Fettleber mit einer herunter Regulation der SCD1 auf mRNA Ebene und einer veränderten Proteindimerisierung einhergeht [41], dass die Regulation von SCD1 in morbid adipösen Patienten verändert ist und dass SCD1 mit dem Grad der Insulinresistenz eng verbunden ist [42]. Im viszeralen und subkutanen Fettgewebe von morbid adipösen Patienten ist die mRNA Expression der SCD1 verringert, während die Proteinexpression erhöht ist. In beiden Fettgeweben der morbid adipösen Patienten ist die mRNA Expression der SCD1 mit dem BMI assoziiert und die Proteinexpression von SCD1 mit dem Homeostasis Model Assessment Index [42].

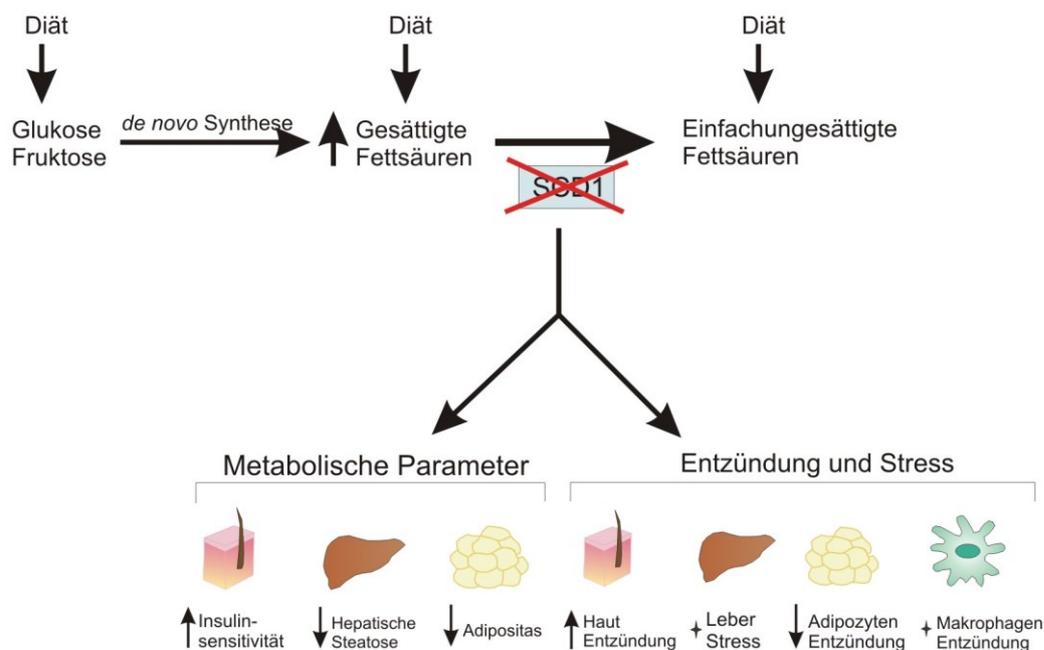


Abb. 6 :Rolle von SCD1 in pathologischen Prozessen (nach [40]). Der Stern bedeutet, dass verschiedene Beobachtungen in der Literatur zu finden sind.

1.4. Alpha-Syntrophin

1.4.1. Struktur und Aufbau

Alpha Syntrophin ist ein 58 kDa großes, peripheres Membranprotein, dessen Gen beim Menschen auf Chromosom 20 und bei der Maus auf Chromosom 2 lokalisiert ist. Alle Syntrophin-Isoformen bestehen aus 4 konservierten Domänen: C-terminal befindet sich die Syntrophin Unique Domäne (56 hoch konservierte Aminosäuren) (SU) und N-terminal sind zwei Pleckstrin Homology (PH) Domänen lokalisiert. Die erste PH Domäne wird dabei von einer Domäne homolog des Drosophila Discs-Large Protein unterbrochen (PDZ) (Abb. 7) [43]. Die Abkürzung PDZ leitet sich von den Proteinen *Post synaptic density 95*, *Septate junction-Protein Discs large* und das *Zonula occludentes-1* ab.

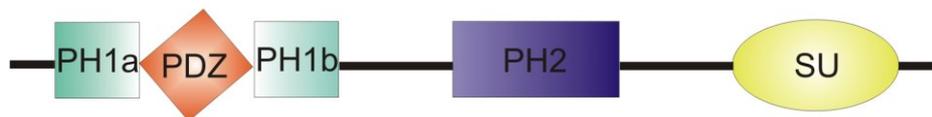


Abb. 7: Struktureller Aufbau der Syntrophine (nach [44]).

1.4.2. Funktionen

Syntrophine bringen, via ihren multiplen Protein-Protein-Interaktionsmotifen, zelluläre Proteine zu ihren spezifischen Einsatzort und regulieren somit auch ihre intrazelluläre Lokalisation und ihre Funktion. Alpha Syntrophin (SNTA) ist zunächst ein Bestandteil des Dystrophin assoziierten Glykoprotein Komplexes (DAPC) im Skelettmuskel [44]. Der DAPC besteht zytosolisch aus Dystrophin, den Syntrophinen und Dystrobrevin und transmembran aus den Glykoproteinen Dystroglycan und Sarkoglykan. Durch die Bindung von Dystroglykan an Laminin und die Assoziation von Dystrophin mit Aktin werden Bestandteile der extrazellulären Matrix an das Zytoskelett gekoppelt [44]. Im Muskel konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von SNTA zur Ausbildung anormaler neuromuskulärer Synapsen einschließlich einer Utrophindefizienz [45] und zu weiteren, den Muskel oder Myozyten betreffenden, Auffälligkeiten führt [46, 47]. Allerdings können sich die Tiere normal bewegen [45, 48]. Laut Hosaka et al. spielt SNTA aber eine wichtige Rolle für die Muskelregeneration [49]. SNTA scheint nicht nur eine Bedeutung für den Muskel, sondern auch für den Glukose- und Lipidmetabolismus zu haben, indem es Proteine wie Growth Factor Receptor-bound Protein 2 (Grb2) [50], G-Proteine [51], G alpha Untereinheiten [52], ATP-Binding Cassette Transporter A 1 (ABCA1) [53] und adrenerge Rezeptoren [54] lokalisiert und / oder reguliert.

Über die Bindung von SNTA und Grb2 kommt es zur Aktivierung von downstream gelegenen Wachstumsfaktoren, einschließlich des Insulin growth factor (IGF) und Insulin, die eine zentrale Bedeutung für den Zucker- und Fettstoffwechsel haben [50, 55, 56]. Außerdem kann SNTA mittels der PDZ Domäne mit dem Bindemotiv des α 1D-adrenergen Rezeptors interagieren und erhöht die Dichte an Rezeptoren [54], welche an der Regulation des Blutdrucks und der Glukoseaufnahme der Adipozyten beteiligt sind [57, 58]. Wie bereits erwähnt, interagiert SNTA auch mit G alpha Untereinheiten und zwar über die PH1a und die SU Domäne [52]. Das ist insofern interessant da beta-adrenerge Rezeptoren mit G alpha Untereinheiten gekoppelt sind und die Lipolyse in Adipozyten regulieren [59]. Des Weiteren konnten Lyssand et al. zeigen, dass durch den knock-down von SNTA die Produktion von cAMP und die Phosphorylierung des durch Isoproterenol induzierten cAMP response element binding protein (CREB) gesteigert wird, was darauf schließen lässt, dass SNTA die Lipolyse hemmt [54]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SNTA über die PDZ Domäne an ABCA1 bindet und dieses stabilisiert. Daraus folgte die Erhöhung der Cholesterinfreisetzung mittels Apolipoprotein AI [53]. Im Zusammenhang mit einer ABCA1 Defizienz ist bekannt, dass diese mit Adipositas und Insulinresistenz assoziiert ist [60]. Pathophysiologisch scheinen Mutationen im SNTA am Long-QT Syndrom (führt zum plötzlichem Herztod) und am plötzlichem Kindstod beteiligt zu sein [61, 62]. SNTA ist die vorwiegende Syntrophinisoform im Herzen und es wurde gezeigt, dass die PDZ Domäne von SNTA an die C-terminale PDZ Binderegion des murinen, kardialen spannungsabhängigen Natrium-Kanals bindet [61]. Sowohl Long-QT Syndrom als auch der plötzliche Kindstod sind Krankheiten, die mit einer Dysfunktion der Natriumkanäle im Herzen verbunden sind [52, 61].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Rolle von SNTA im Kontext der Adipositas zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der metabolischen Charakterisierung der SNTA defizienten Maus sowie den Folgen des SNTA knock-downs auf die Morphologie und Funktion der Adipozyten. In meiner Diplomarbeit konnte ich bereits nachweisen, dass der knock-down von SNTA in Präadipozyten die Ausbildung kleiner Lipidtropfen und eine veränderte Lipidspeicherung in den reifen Adipozyten zur Folge hat. Deswegen sollte die Rolle von SNTA in der Adipogenese und Lipolyse untersucht werden. Außerdem sollte die Auswirkung des knock-downs auf die Proliferation von Präadipozyten analysiert werden. Durch die metabolische Charakterisierung der SNTA defizienten Maus soll die

physiologische Bedeutung von SNTA untersucht werden. Wie bereits erwähnt scheint SNTA sowohl eine Rolle im Lipidstoffwechsel [53] als auch im Glukosestoffwechsel [50, 55, 56] zu haben. Da metabolische Effekte durch „Extremsituationen“ besser zur Geltung kommen, wurden die Mäuse für 14 Wochen mit einer Hochfettdiät bzw. die Kontrolltiere mit einer Standarddiät ernährt. Anschließend wurden die verschiedenen Serumparameter des Glukose- und Lipidstoffwechsels und die metabolischen und morphologischen Veränderungen des Fettgewebes und der Leber überprüft. Außerdem wurden ein Diät induziertes und ein genetisches Adipositasmodell zur Untersuchung einer möglichen Veränderung der SNTA Expression im Fettgewebe und in der Leber herangezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinie

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinie fand unter konstanten Bedingungen von 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank statt.

| Zelllinie | Herkunft |
|-----------|----------------------------|
| 3T3-L1 | murine Fibroblasten (ATCC) |

2.1.2. Antikörper

Die nachfolgende Liste führt alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (AK), deren Bezugsfirmen und die Spezies, aus denen die AK gewonnen wurden, auf.

2.1.2.1. Primäre Antikörper

| | | |
|---|-----------|-----------------------------|
| Anti-AMPK (pan) pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-Akt (pan) mAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-ATGL (30A4) mAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-βActin pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-Caveolin-1 (D46G3) mAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-Chemerin pAK | Ziege | R&D Systems |
| Anti-CyclophilinA pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-FABP4 pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-FAS (C20G5) mAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-GAPDH (14C10) mAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-HSL pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anit-p44/p42 MAP Kinase pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-Perilipin (D418) pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-Phospho-Akt (Ser473) (D9E) mAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-Phospho-HSL (Ser 563) pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-Phospho-p44/p42 MAP Kinase (Thr 202/Tyr 204) pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-PPAR _γ pAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |
| Anti-SCD-1 (C12H5) mAK | Kaninchen | Cell Signaling Technologies |

| | | |
|----------------|-----------|----------------------------------|
| Anti-SNTA pAK | Kaninchen | Prof. Marvin Adams (Kooperation) |
| Anti-SR-BI pAK | Kaninchen | US Biological |

2.1.2.2. Sekundäre Antikörper

| | | |
|------------------------------------|-----------|-------------------------|
| Anti-Kaninchen HRP-konjugierter AK | Esel | Jackson Immuno Research |
| Anti-Ziege HRP-konjugierter AK | Kaninchen | Jackson Immuno Research |

2.1.3. Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

Die Primer für die LightCycler Expressionsanalyse wurden jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt, damit eine Amplifizierung genomischer DNA vermieden wurde. Die amplifizierten Fragmente haben in etwa eine Länge von 300 Basenpaaren, was eine kurze Elongationszeit garantiert. Außerdem wurde beim Design der Primer darauf geachtet, dass die Annealing-Temperatur etwa 60°C betrug (Roche Applied Science, Universal ProbeLibrary Assay Design Center: www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp).

Die amplifizierten DNA-Produkte wurden mittels Sequenzierung durch die Firma GeneArt (Regensburg) auf ihre Richtigkeit überprüft. Hierfür wurden die PCR-Produkte und der jeweils zugehörige uni Primer verwendet.

| Oligonukleotid | Sequenz (5' → 3') | PCR Produkt (bp) |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 18S rRNA_m_uni | gac tgg caa cct caa gaa gg | 217 |
| 18S rRNA_m_rev | caa gtt ccg gtg tga ctc g | |
| Chemerin_m_uni | tgg gtg ctg act aca acc tct | 213 |
| Chemerin_m_rev | cgc gtg atg gtc tgt ttg t | |
| CXCL 8_m_uni | ctt gaa ggt gtt gcc ctc ag | 210 |
| CXCL8_m_rev | tgg gga cac ctt tta gca tc | |
| Cyp 7a1_m_uni | cac ata aag ccc ggg aaa g | 242 |
| Cyp 7a1_m_rev | ggc tgc ttt cat tgc ttc a | |
| Cyp 27a1_m_uni | gag atg caa ctg atg ctg tca | 216 |
| Cyp 27a1_m_rev | ttg tgc cag aca ttt ggt gt | |
| Galectin 3_m_uni | gcc tac ccc agt gct cct | 219 |
| Galectin_3_m_rev | ctc att gaa gcg ggg gtt a | |
| GAPDH_m_uni | cac ccc gat agc aat atc ca | 375 |
| GAPDH_m_rev | cat att gta ccg cta tcc ctt tg | |
| SCD-1_m_uni | ccg gga gaa tat cct ggt tt | 328 |
| SCD-1_m_rev | cac ccc gat agc aat atc ca | |
| SNTA_m_uni | cat cct gtc tgt gaa tgg tga | 122 |
| SNTA_m_rev | agg gtg aga cct cct tca tgt | |

2.1.4. siRNAs

Die anschließende Liste enthält alle Silencer® Select Pre-designed siRNAs, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die aufgeführten genspezifischen siRNAs, einschließlich der Silencer® Select Negative Control#1 siRNA, die als Kontrolle für die oben genannten siRNAs herangezogen wurde, wurden von der Firma Ambion bezogen.

| Identifikationsnummer | siRNA | Sequenz (5' → 3') |
|------------------------------|--------------------|--------------------------|
| s73339 | SCD1_sense | gggauuuucuacuacaugatt |
| | SCD1_antisense | ucauguaguagaaaauccga |
| s73340 | SCD1_sense | ccgcgcaucucuauggauatt |
| | SCD1_antisense | uauccauagagaugcgcggca |
| s74114 | SNTA_sense | cgauggucuuuaucauccatt |
| | SNTA_antisense | uggaugauaaagaccaucgtt |
| s75835 | Utrophin_sense | cgaacugaaucaaacccgatt |
| | Utrophin_antisense | uccgguuugauucaguucgtc |

| Identifikationsnummer | siRNA | Sequenz (5' → 3') |
|------------------------------|--------------------|--------------------------|
| s75836 | Utrophin_sense | ggaccuauuggagaccguutt |
| | Utrophin_antisense | aacggucuccaauaggucctt |
| s75837 | Utrophin_sense | gguugagaauuguucgggaatt |
| | Utrophin_antisense | uucccgaacauucucaacctg |

2.1.5. Kit-Systeme

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme und deren Bezugsfirmen aufgeführt.

| | |
|--|----------------------|
| BCA Protein Assay Kit | Pierce |
| Cell Titer Blue Assay | Promega |
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Roche |
| DuoSet® ELISA Development System mouse Chemerin | R&D Systems |
| DuoSet® ELISA Development System mouse IL-6 | R&D Systems |
| ECL Plus Western Blotting Detection Reagent | Amersham Biosciences |
| ECL Prime Western Blotting Detection Reagent | Amersham Biosciences |
| Endo-Porter | GeneTools |
| Free Glycerol Assay Kit | BioCat |
| LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I | Roche |
| Proinsulin mouse ELISA | Mercodia |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kit | Qiagen |
| QIAquick® PCR Purification Mini Elute Kit | Qiagen |
| Quantichrom™ Glucose Assay Kit | Biotrend |
| Reagenz zur quantitativen in-vitro-Bestimmung von Gesamt-Cholesterin im Serum / Plasma | Diaglobal |
| Reverse Transcription System | Promega |
| RNeasy® Mini Kit | Qiagen |
| Streptavidin-HRP | R&D Systems |
| Substrate Reagent Pack | R&D Systems |
| Triglyzeride GPO-PAP, Halbmikro-Test | Roche |
| Ultrasensitive Insulin mouse ELISA | Mercodia |
| X-tremeGene siRNA Transfection Reagent | Roche |

2.1.6. Medien für murine Fibroblasten

2.1.6.1. Kultivierungsmedium

DMEM HochGlukose (4,5 g/l), 10 % Serum von neugeborenen Kälbern (NCS *Newborn Calf Serum*) und 1 % Penicillin / Streptomycin.

2.1.6.2. Differenzierungsmedium

DMEM / Ham's F-12 enthält bereits 15 mM HEPES und 365,10 mg/l L-Glutamin.

Zusätze:

- 5 % Serum von fötalen Kälbern (FCS *Foetal Calf Serum*)
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 2 µg/ml apo Transferrin
- 17 µM Pantothensäure
- 1 µM Biotin
- 300 µg/ml Fetuin
- 1 µM Corticosteron (frisch zusetzen)
- 200 µM Ascorbat (frisch zusetzen)
- 20 µM IBMX (frisch zusetzen)
- 100 nM Insulin (frisch zusetzen)

2.1.6.3. Insulin reiches Medium

DMEM / Ham's F-12, das bereits 15 mM HEPES und 365,10 mg/l L-Glutamin enthält, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 mM Insulin.

2.1.7. Medium für Gewebekulturen

DMEM HochGlukose (4,5 g/l), 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin.

2.1.8. Puffer und Lösungen

Nachfolgend werden die Zusammensetzungen aller selbst hergestellten Lösungen und Puffer angeführt. Diese wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert, sofern nichts anderes angegeben ist.

2.1.8.1. Lösungen für Arbeiten mit DNAGelladepuffer, 10-fach:

| | | |
|-----------------|-------|--------------------------------|
| Glyzerin (87 %) | 5,8 | ml |
| Bromphenolblau | 0,025 | g |
| Xylencyanol | 0,025 | g |
| ad | 0,010 | 10,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0 |

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

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

| | | |
|--------------------------------|-------|----------------------|
| Tris-NH ₃ | 121,0 | g |
| Essigsäure (99 %) | 28,6 | ml |
| EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0 | 50,0 | ml |
| ad | 0,5 | l ddH ₂ O |

2.1.8.2. Lösungen für Arbeiten mit RNA75 %iger Ethanol:

| | | |
|-------------------------|----|----|
| Ethanol (p.a.) | 15 | ml |
| Nukleasen freies Wasser | 5 | ml |

2.1.8.3. Lösungen für die Arbeiten mit Proteinen**2.1.8.3.1. Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten**RIPA-Lysepuffer:

| | | |
|------------------------------|------|----------------------|
| NaCl, 3 M Stammlösung | 2,50 | ml |
| Igepal | 0,50 | ml |
| Desoxycholat | 0,25 | g |
| SDS, 20 %ige Stammlösung | 0,25 | ml |
| Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5 | 2,50 | ml |
| ad | 0,05 | l ddH ₂ O |

Zur Fertigstellung des Lysepuffers wurden pro 10 ml RIPA-Puffer jeweils eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail vor Gebrauch frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

RIPA-Lysepuffer für den GentleMACS:

| | | |
|------------------------------|------|----------------------|
| NaCl, 3 M Stammlösung | 2,50 | ml |
| Desoxycholat | 0,25 | g |
| Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5 | 2,50 | ml |
| ad | 0,05 | l ddH ₂ O |

Zur Fertigstellung des Lysepuffers wurden pro 10 ml RIPA-Puffer jeweils eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail vor Gebrauch frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt. Nach dem Aufschließen der Proben mittels GentleMACS wurden pro 1 ml RIPA-Lysepuffer 100 µl Igepal (10 %ig) und 5 µl SDS (20 %ige Stammlösung) zugegeben.

2.1.8.3.2. Lösungen für die SDS-PAGE

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

| | | |
|--------------------------|-----|----------------------|
| Glyzin | 144 | g |
| Tris-NH ₃ | 30 | g |
| SDS, 20 %ige Stammlösung | 50 | ml |
| ad | 1 | l ddH ₂ O |

Lösung für 15%ige Trenngele:

| | | |
|----------------------------------|------|----|
| Acrylamid 40 % | 30,0 | ml |
| Bisacrylamid 2 % | 3,4 | ml |
| Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7 | 10,0 | ml |
| SDS, 20 %ige Stammlösung | 0,4 | ml |
| ddH ₂ O | 32,0 | ml |

Lösung für 5%ige Sammelgele:

| | | |
|----------------------------------|------|----|
| Acrylamid 40% | 5,0 | ml |
| Bisacrylamid 2% | 2,6 | ml |
| Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8 | 5,0 | ml |
| SDS, 20%ige Stammlösung | 0,2 | ml |
| ddH ₂ O | 24,0 | ml |

Die Acrylamid- und die Bisacrylamidlösung wurden bei 4 °C aufbewahrt. Vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels wurde den entsprechenden Lösungen eine 10 %ige APS-Lösung im Verhältnis 1:200 und TEMED im Verhältnis 1:250 zugegeben um die Polymerisation anzustoßen.

SDS-Probenpuffer (5 x Lämmli), 5-fach:

| | | |
|--------------------------|---------|-----------------------|
| Glyzerin 20 % | 5,0 | ml |
| 1M Tris-HCl pH 6,8 | 0,3 | ml |
| β-Mercaptoethanol | 1,0 | ml |
| SDS, 20 %ige Stammlösung | 2,0 | ml |
| Bromphenolblau | 0,025 | g |
| | ad 10,0 | ml ddH ₂ O |

Der Puffer wurde immer im Verhältnis 1:5 dem jeweiligen Probenlysat zugegeben.

2.1.8.3.3. Lösungen für das Western Blot VerfahrenTBS, pH 7,6, 10-fach

| | | |
|----------------------|--------|----------------------|
| Tris-NH ₃ | 24,2 | g |
| NaCl | 80,0 | g |
| | ad 1,0 | l ddH ₂ O |

Die pH-Einstellung des Puffers erfolgte mit konzentrierter Salzsäure.

TBS, 1-fach:

| | | |
|----------------------|-----|----------------------|
| TBS, pH 7,6, 10-fach | 100 | ml |
| ad | 1 | l ddH ₂ O |

TBST:

| | | |
|----------------------|-----|----------------------|
| TBS, pH 7,6, 10-fach | 100 | ml |
| Tween® 20 | 1 | ml |
| ad | 1 | l ddH ₂ O |

Blockierlösung TBST:

| | | |
|------------------|-----|---------|
| Magermilchpulver | 5 | g |
| ad | 100 | ml TBST |

Die Blockierlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.1.8.3.3.1. Lösungen für Wet TransferTank-Puffer, 10-fach:

| | | |
|----------------------|-----|----------------------|
| Glyzin | 140 | g |
| Tris-NH ₃ | 30 | g |
| SDS | 5 | g |
| ad | 1 | l ddH ₂ O |

Wettransfer-Puffer:

| | | |
|----------------------|-----|----------------------|
| Methanol (technisch) | 200 | ml |
| Tank-Puffer, 10-fach | 80 | ml |
| ad | 1 | l ddH ₂ O |

2.1.8.3.3.2. Lösungen für Semi-dry TransferAnodenpuffer (pH 8,5):

| | | |
|----------------------|-----|----------------------|
| Glyzin | 192 | mM |
| Tris-NH ₃ | 25 | mM |
| Methanol | 15 | % |
| ad | 1 | l ddH ₂ O |

Kathodenpuffer (pH 8,5):

| | | | |
|----------------------|-----|----------------------|--|
| Glyzin | 192 | mM | |
| Tris-NH ₃ | 25 | mM | |
| SDS | 0,1 | % | |
| ad | 1 | l ddH ₂ O | |

2.1.8.3.4. Lösungen für ELISAsWaschpuffer:

| | | | |
|-----------|-----|-------|--|
| Tween® 20 | 0,5 | ml | |
| ad | 1,0 | l PBS | |

Reagent Diluent:

| | | | |
|-----|-----|-------|--|
| BSA | 5,0 | g | |
| ad | 0,5 | l PBS | |

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Substratlösung:

Der Substrate Reagent Pack von R&D Systems enthält zwei Lösungen (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin), die im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt wurden.

Stopplösung:

| | | | |
|--------------------------|------|----------------------|--|
| Schwefelsäure (rauchend) | 5,70 | ml | |
| ad | 0,05 | l ddH ₂ O | |

Verdünnung des Standards, der Antikörper und des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Laut dem Protokoll des Herstellers wurde der entsprechende Standard, der Detection AK und das HRP-Streptavidin-Konjugat in Reagent Diluent verdünnt, während der Capture AK in PBS aufgenommen wurde.

Verdünnung der Proben:

Die Proben wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll in Reagent Diluent verdünnt.

2.1.8.3.5. AntikörperlösungBSA-TBST:

| | | |
|-------------|-----|-----------|
| BSA | 7,5 | g |
| Natriumazid | 0,5 | g |
| Tween® 20 | 0,5 | ml |
| | ad | 0,5 l TBS |

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Die primären Antikörper wurden in dieser Lösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Ausnahme: Der Anti-Caveolin-1 Antikörper wurde bei den Immunoblots der Fettgewebeproteinlysate 1:100 000 und bei den Immunoblots der Leberproteinlysate 1:10 000 verdünnt.

Die Sekundären Antikörper wurden in der Blockierlösung normalerweise 1:5000 verdünnt. Ausnahme: Der sekundäre Antikörper wurde beim Nachweis von Caveolin-1 in Fettgewebeproteinlysaten 1:50 000 verdünnt.

2.1.8.4. Lösungen für die ImmunhistochemieAlkohollösungen für die Alkoholreihe

96 %iger Ethanol: 480 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH₂O

90 %iger Ethanol: 450 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH₂O

80 %iger Ethanol: 400 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH₂O

70 %iger Ethanol: 350 ml Ethanol (100 %) ad 500 ml ddH₂O

2.1.8.5. Lösungen für FettsäurestimulationenÖlsäure 200 mM

| | | |
|---------|-------|--------------|
| Ölsäure | 0,056 | g |
| | ad | 1 ml Ethanol |

Die 200 mM Lösung wurde auf 70°C erwärmt, bis die Ölsäure in Lösung gegangen war.

BSA Lösung

| | | |
|-----------------------|----|--------------------------|
| BSA (fatty acid free) | 1 | g |
| | ad | 10 ml ddH ₂ O |

Die BSA Lösung wurde steril filtriert und auf 55°C erwärmt.

Ölsäure Stocklösungen 20 mM

| | | |
|-----------------------------|-----|----|
| 200 mM Ölsäurelösung (70°C) | 100 | µl |
| BSA Lösung (55°C) | 900 | µl |

Kontroll Stocklösungen

| | | |
|------------|-----|----|
| Ethanol | 100 | µl |
| BSA Lösung | 900 | µl |

Die Stocklösungen wurden bei -20°C aufbewahrt und vor jedem Gebrauch auf 55°C erwärmt.

2.1.9. Chemikalien

| | |
|---|---------|
| 1-kb DNA Molekulargewichtsleiter | NEB |
| 100bp DNA Molekulargewichtsleiter | NEB |
| Iso-Propanol | Merck |
| Acrylamidlösung 40 % | Bio-Rad |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Bio-Rad |
| Apo-Transferrin | Sigma |
| Ascorbat | Sigma |
| β-Mercaptoethanol | Sigma |
| Biosafe™ Coomassie | Bio-Rad |
| Biotin | Sigma |
| Bisacrylamidlösung 2 % | Bio-Rad |
| Bromphenolblau | Sigma |
| BSA (fatty acid free) | Roche |
| BSA (Fraktion V) | Biomol |
| BSA (Fraktion V) für ELISA | Sigma |
| Chloroform | VWR |
| Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail | Roche |
| Corticosteron | Sigma |
| Desoxycholat | Sigma |

| | |
|---|--------------------|
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck |
| DMEM, Hochglukose Medium | Biochrom AG |
| DMEM / Ham's F-12 | Cambrex |
| Entellan | Merck |
| Eosin G Lösung | Roth |
| Epinephrin | Sigma |
| Essigsäure (99 %) | Merck |
| Ethanol | Merck |
| Ethanol, technisch | Chemikalienausgabe |
| Ethidiumbromid | Merck |
| Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) | Merck |
| Fetuin | MP |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Biochrom AG |
| Formaldehydlösung 37 % | Merck |
| Glukose | Fluka |
| Glutardialdehyd | Merck |
| Glyzerin | Merck |
| Glyzerin-Standard | Sigma |
| Glyzin | Merck |
| Hämalaunlösung | Roth |
| Histol | Roth |
| IBMX | Serva |
| Igepal | Sigma |
| Insulin, bovines | Sigma |
| LPS | Sigma |
| Magermilchpulver | Frema |
| Methanol, technisch | Chemikalienausgabe |
| N, N, N', N' , - Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Merck |
| Natriumazid | Fluka |
| Natriumchlorid | Merck |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck |
| Natriumhydroxid | Merck |
| Newborn calf serum (NCS) | Biochrom AG |
| Nukleasefreies Wasser | Promega |
| Ölsäure | Sigma |
| Pantothensäure | Sigma |
| PBS Dulbecco | Biochrom AG |

| | |
|---|------------|
| Penicillin / Streptomycin | Gibco |
| PeqGOLD Protein Marker | Peqlab |
| PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail | Roche |
| Salzsäure rauchend | Merck |
| Schwefelsäure rauchend | Merck |
| SeaKam LE Agarose | Biozym |
| SeaKem® GTG® Agarose | Cambrex |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat | Roth |
| Tris-NH ₃ | Merck |
| Tris-HCl | Merck |
| TRIzol Reagenz | Invitrogen |
| Trypanblau | Sigma |
| Trypsin / EDTA | Gibco |
| Tween® 20 | Sigma |
| Xylencyanol | Merck |
| Xylol | Merck |

2.1.10. Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|----------------------|
| Absaugpipette (5 ml) | BD Falcon |
| Biosphere Filterspitzen (10 µl, 1250 µl) | Sarstedt |
| Combitips plus | Eppendorf |
| Combitips advanced | Eppendorf |
| Dampfsterilisations-Indikatorband | Omnilab |
| Deckgläser | VWR |
| Elektrophorese Tips | Bio-Rad |
| ELISA 96 Lochplatte | Corning Costar® |
| Einmal-Feindosierungsspritze (1 ml) | Braun Injekt®-F |
| Filterspitzen | Biozym |
| Gentle Macs Tubes | Miltenyi |
| 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 |
| Mikrotube EDTA | Sarstedt |
| Objektträger Superfrost Ultra Plus | VWR |

| | |
|--|------------------------|
| Parafilm | American National Can™ |
| Petrischalen (10 x 1,5 cm) | BD Falcon |
| Pipettenspitzen | Eppendorf |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml) | Eppendorf |
| Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| Skalpell (No. 22) | Feather |
| Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml) | Sarstedt |
| Serologische Einwegpipetten (25 ml, 50 ml) | Corning Costar® |
| Sterile Biopsiestanzen (4 mm Durchmesser) | Stiefel |
| Sterile Filterspitzen (10 µl, 1250 µl) | Sarstedt |
| Sterile Filter-Spitzen (100 µl, 200 µl) | Biozym Diagnostik |
| Sterile Kanülen | BD Microlance™ |
| Sterilfilter | Milipore |
| Trockenblock für Objektträger | Labomedic |
| Vakuum Sterilfiltrationssystem (50 ml, 150 ml, 500 ml) | Millipore |
| Wattestab | Hartmann |
| Wägeschälchen | Omnilab |
| Whatman GB003 0,8 mm | VWR |
| Zell Schaber | Sarstedt |
| Zellkulturflaschen 75 cm ² | Sarstedt |
| Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-Loch) | BD Falcon |
| Zellsieb Porengröße 100 µM | Omnilab |

2.1.11. Geräte

| | |
|---|------------------------|
| Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör | Bio-Rad |
| Akku-Chek® Comfort | Roche |
| Analysenwaage BP 221 S | Sartorius |
| Analysenwaage PT-1200 | Sartorius |
| Autoklav Varioklav Dampfsterilisator | H + P |
| Autoklav Systec VX 150 | Systec |
| 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 |
| Flüssigstickstoffanlage ESPACE 600 | AIR LIQUIDE Karyotechnik |
| Färbegestell Hecht | Omnilab |
| Färbekasten nach Hellendahl | Roth |
| Glaskasten mit Zubehör nach Hauser | Roth |
| Glaskasten Hecht | Omnilab |
| iMark Microplate Reader | Bio-Rad |
| Incubationsschrank 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 |
| Microtom RM 2145 | Leica |
| Mikroskop DM IL und Zubehör | Leica |
| Mikroskop Axiovert 200 M und Zubehör | Zeiss |
| Mikroskop BZ 9000 | Keyence |
| Mikrowellengerät 7015 | Privileg |
| Milli-Q Biocell | Millipore |
| Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (CCD Kamerasystem) | Bio-Rad |
| Nanodrop ND 200 | Thermo Scientific |
| Peristaltikpumpe Pumpdrive 5001 | Heidolph |
| pH-Meter 764 Multi-Calimatic | Knick |
| Photometer Scandrop 250 mit Zubehör | Analytik Jena |
| Photometer Varioscan Flash Multimode Reader | Thermo Scientific |
| Pipettensatz | Eppendorf |
| Power Supply E835 | Consort |
| Power Supply Power Pac 200 | Bio-Rad |
| Pumpe MC 1000 PEC | Multifix |
| Schüttler 3013 | GFL |
| SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör | Bio-Rad |
| Sequenza Slide Rack | Thermo Scientific |
| Sicherheitswerkbank | Heraeus Instruments |
| Sterilisator WTC | Binder |
| Thermoblock TB 1 | Biometra |
| Thermomixer Comfort | Eppendorf |
| Tischzentrifuge 5415D | Eppendorf |

| | |
|------------------------------------|---------------------|
| Tischzentrifuge 5424 | Eppendorf |
| Trans-Blot Cell Wet-Transferkammer | Bio-Rad |
| Ultraschallgerät mit Power Supply | Bandelin |
| UV-Flächenstrahler TFX-20 M | MWG-Biotech |
| UV/Vis Photometer Ultraspec 2000 | Pharmacia |
| Vakuumpumpe | KNF Laboport |
| Vortex VF2 | Janke und Kunkel |
| Wasserbad HI 1210 | Leica |
| Wasserbad WPE 45 | Memmert |
| X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm) | Siemens |
| Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm | Neubauer |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R | Heraeus Instruments |

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit DNA

2.2.1.1. Real Time PCR

Unter der Real Time PCR (RT-PCR) versteht man die Methode, die es zusätzlich zur bekannten DNA-Amplifikation mittels PCR erlaubt die Nukleinsäuren zu quantifizieren.

Für die Durchführung der PCR wurde in dieser Arbeit der LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I Kit verwendet. Der darin enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA, wobei ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex entsteht, der grünes Licht ($\lambda = 521 \text{ nm}$) emittiert. Die Fluoreszenz verhält sich bei einer für das Produkt spezifischen Meßtemperatur direkt proportional zur amplifizierten DNA-Menge.

Für einen typischen Reaktionsansatz gilt folgendes Schema:

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

Der Reaktionsmix enthielt bereits SYBR[®] Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase.

Für die Reaktion wurden dünne Glaskapillaren verwendet, die sich in einem Probenkarusell befinden und in diesem in die Reaktionskammer eingesetzt wurden. Das Protokoll startet zunächst mit einem Hitzeschritt (10 min, 95°C) um die HotStart Taq-Polymerase zu aktivieren. Danach werden 40-45 Amplifizierungszyklen folgendermaßen ausgeführt:

| Phase | Temperatur | Zeit |
|---------------|-------------------|-------------|
| Denaturierung | 95°C | 15 s |
| Annealing | 62°C | 10 s |
| Elongation | 72°C | 10 s |

Nach Beendigung der Amplifizierungszyklen wurde die DNA langsam aufgeschmolzen (60°-90°C, 0,1°C / s) und währenddessen die Fluoreszenz gemessen, welche bei einer produktspezifischen Temperatur wieder abnimmt. Anhand der daraus erhaltenen Schmelzkurve kann man die Spezifität der PCR-Produkte überprüfen. Nach jeder Elongationsphase wurde die Fluoreszenzintensität der Proben gemessen. Diese Messung erfolgte bei einer Temperatur (75°-85°C), die für das PCR-Produkt charakteristisch ist. Um die Menge an gebildeter DNA zu validieren wird der Crossing Point (Cp) bestimmt. Mittels Standardkurve können die erhaltenen Cp-Werte unter Berücksichtigung der PCR Effizienz in bestimmte Zahlenwerte umgerechnet werden und somit verschiedene PCR-Reaktionen miteinander verglichen werden. Um Veränderungen in der Genexpression des Zielgens feststellen zu können, muss außerdem die Expression eines sogenannten Housekeeping Gens bestimmt werden, auf das die Expression des Zielgens normalisiert wird. Bei einem Housekeeping Gen handelt es sich um ein Gen, das zwischen zu vergleichenden Gruppen nicht reguliert ist (unterschiedliche Gewebe, unterschiedliche Stimulationen). Zur Normalisierung wird der Quotient aus c[cDNA Zielgen] und c[cDNA Housekeeping Gen] gebildet. Dieser Quotient gibt die relative Expression des zu untersuchenden Gens wieder.

2.2.1.2. Agarosegelelektrophorese

Die Größe der DNA-Moleküle wurde durch die Auftrennung der DNA in 1,5 %igen Agarosegelen analysiert. Hierzu wurde die Agarose in 100 ml TAE-Puffer unter Kochen in der Mikrowelle aufgelöst und in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen, nachdem noch 1 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) zugesetzt worden war. Bevor die Proben in die Taschen gefüllt wurden, wurden sie mit einem Gelladepuffer im Verhältnis 1:10 versetzt. Die

Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V, dafür musste das Agarosegel mit TAE-Puffer bedeckt sein. Als Größenstandard dienten eine 100 bp- und eine 1 kb-DNA-Leiter. Nach Beendigung der Auftrennung konnte man die DNA-Fragmente im Gel unter einer UV-Lampe sehen, fotografieren und bei Bedarf für eine Aufreinigung ausschneiden.

2.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration aus der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Hierfür wurde in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen Wasser, das als Referenz diente, gemessen. Die DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt. Die DNA-Konzentration (c_{dsDNA}) konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$c_{\text{dsDNA}} = E_{260} \times \epsilon_{\text{dsDNA}} \times V$$

c_{dsDNA} : Konzentration an dsDNA in der Lösung [$\mu\text{g/ml}$]

E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm

ϵ_{dsDNA} : Extinktionskoeffizient von dsDNA, gleich 50 $\mu\text{g/ml}$

V: Verdünnungsfaktor, hier 100

Durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm konnte die Reinheit der DNA bestimmt werden. Bei reiner DNA liegt das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} zwischen 1,8 und 2,1.

2.2.1.4. Aufreinigung und Sequenzierung von DNA

Die PCR-Fragmente wurden, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, aufgetrennt, ausgeschnitten und aus dem Gel-Stück herausgelöst. Für das Herauslösen wurde nach dem Protokoll des QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kits (Qiagen) verfahren. Anschließend wurde die DNA-Konzentration im Scandrop Photometer gemessen. Für die Durchführung der Sequenzierung wurde die DNA mit sequenzspezifischen Primern an die Firma GeneArt (Regensburg) versandt, die wiederum unter Verwendung des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger [63] die DNA-Sequenzierungen durchgeführt hat.

2.2.2. Arbeiten mit RNA

2.2.2.1. Isolierung von RNA mittels Trizol® und RNeasy® mini Kit (Qiagen)

Die Gesamt-RNA aus Gewebe wurde mittels dem Reagenz TRIzol® (Invitrogen) isoliert. Hierfür wurden die Gewebe mit 1 ml TRIzol® im GentleMacs homogenisiert und im Anschluss zum Scheren der genomischen DNA durch eine dünne Kanüle mehrmals auf- und abgezogen. Die weiteren Isolierungsschritte wurden gemäß des Herstellerprotokolls mit Hilfe der RNeasy® Spin Columns des RNeasy® Mini Kits (Qiagen) durchgeführt. Am Ende der Isolierung wurde die RNA mit 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und bei -80°C eingelagert.

2.2.2.2. Isolierung von RNA mittel Trizol® und Isopropanolfällung

Das Homogenisieren des Gewebes in TRIzol® und das Scheren der genomischen DNA erfolgte wie unter 2.2.2.1 bereits beschrieben. Im nächsten Schritt wurde 1/5 Volumen Chlorophorm zu dem TRIzol®-Gewebehomogenisat gegeben, mehrmals zum Mischen invertiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Proben 15 min bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Chlorophormphase abgezogen. Zu der erhaltenen Chlorophormphase wurde 0,7 Volumen Isopropanol pipettiert, mehrmals invertiert und die RNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Dann wurde das Chlorophorm / Isopropanol-Gemisch für 30 min bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig komplett abgezogen und das Pellet zweimal mit eiskaltem 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Ethanol komplett abgezogen und verbleibende Reste bei Raumtemperatur ausgedampft. Anschließend wurde das Pellet in 30 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.2.3. Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die unter 2.2.1.3 beschriebene DNA-Konzentrationsbestimmung. Allerdings gilt für die RNA ein spezifischer Extinktionskoeffizient von 40 µg ml⁻¹, der in die schon bekannte Formel eingesetzt wird.

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \times \epsilon_{\text{RNA}} \times V$$

- C_{RNA} : Konzentration an RNA in der Lösung [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
 E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
 ϵ_{RNA} : Extinktionskoeffizient von RNA, gleich $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
 V : Verdünnungsfaktor, hier 100

2.2.2.4. Reverse Transkription

Um eine PCR durchführen zu können benötigt man als Edukt DNA. Deshalb wurde die isolierte Gesamt-RNA mittels Reverser Transkriptase (vom Avian-Myoblastosis-Virus) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Für die Durchführung der Reaktion wurde das Reverse Transcription System von Promega verwendet. Als Startpunkt für die Reverse Transkriptase dienten Random Hexamer Primer, die sich an komplementäre Sequenzen innerhalb der RNA-Stränge anlagerten. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

| | |
|---|--------------------|
| RNA (1 μg) in nukleasefreiem Wasser | 21,5 μl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 8 μl |
| 10x RT-Puffer | 4 μl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 4 μl |
| <i>Random Hexamer</i> Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 1 μl |
| RNasin Ribonuklease-Inhibitor (40 U/ μl) | 1 μl |
| AMV-Reverse Transkriptase (25 U/ μl) | 0,5 μl |

Der oben aufgeführte Ansatz wurde bei 42°C für 1 h inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde die Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen bei 95°C inaktiviert. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3. Arbeiten mit Proteinen

2.2.3.1. Präparation von Gesamtzellextrakten

Für die Präparation von Gesamtzellextrakten wurde zunächst das Medium, das die Zellen bedeckt, abgenommen und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers und eiskaltem PBS, das mit Proteinaseinhibitor versetzt wurde, vom Boden der Zellkulturplatten abgelöst. Diese

Zellsuspension wurde für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und das dabei entstandene Zellpellet in 60 µl eiskaltem RIPA-Lysepuffer (versetzt mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren) resuspendiert. Um die genomische DNA zu scheren wurde das Zellysate mit Ultraschall behandelt und die Proben anschließend bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.2. Präparation von Proteinlysaten aus Geweben

Um Proteinlysate aus Fett- und Lebergewebspräparaten zu erhalten wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Vor Beginn der Arbeiten wurde eiskalter RIPA Puffer für GentleMacs, d.h. ohne Igepal und SDS, mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt. Anschließend wurde jeweils 1 ml in die für den GentleMacs vorgesehenen M-Tubes vorgelegt, die gefrorenen Gewebepreparate (ungefähr 50 mg) dorthin überführt und homogenisiert. Nachdem die Homogenisate bei 600 rpm und 4°C ca. 10 s lang ab zentrifugiert wurden, erfolgte die Zugabe von 100 µl 10 %iges Igepal und 5 µl 20 %ige SDS-Lösung. Im Anschluss wurden die Proben zum Scheren der genomischen DNA mit Ultraschall behandelt (dreimal, bei 32 %, jeweils 10 s). Um reines Proteinlysate zu erhalten (ohne Verunreinigungen durch Fett und andere Zellbestandteile) wurden die Lysate dreimal je 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und jedes mal nur die klare Interphase in ein neuer Cup überführt. Die so erhaltenen Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die Bicinchoninsäure Methode verwendet. Diese Methode beinhaltet die Reduktion von Cu^{2+} Ionen zu Cu^+ Ionen durch vorhandene Proteine und die Komplexbildung des Cu^+ Ions mit der Bicinchoninsäure. Diese Komplexbildung hat einen Farbumschlag von grün nach violett zur Folge, welchen man bei einer Wellenlänge von 540 nm messen kann. Die Quantitative Bestimmung des Proteingehalts erfolgte anhand eines BSA Standards.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die Probe mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. 200 µl der laut Herstellerprotokoll gemischten Kupfer(II)sulfatlösung und der Bicinchoninsäure wurden zu 10 µl der 1:10 verdünnten Probe gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Messung bei 540 nm.

2.2.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter der SDS-Page versteht man die Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe in Polyacrylamidgelen in einem elektrischen Feld. Vor der Auftrennung werden die Proteinlysate mit dem sogenannten Lämmli-Puffer gemischt und auf 95°C erwärmt. Durch das Aufkochen werden die Proteine denaturiert und treten in Interaktion mit dem im Lämmli-Puffer enthaltenem SDS. Das SDS sorgt aufgrund seiner aliphatischen Seitenketten für eine teilweise Auffaltung der Proteine. Mit Hilfe des zugesetzten β -Mercaptoethanols werden die Disulfidbrücken der Proteine gespalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem 5 %igen Sammelgel und einem 15 %igen Trenngel bestanden. Den verschiedenen Gellösungen wurden die entsprechenden Mengen an Ammoniumpersulfat und N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin zugesetzt um die radikalische Polymerisation des Acrylamids anzustoßen. Zuerst wurde das Trenngel, in dem durch die Enge der Maschen die Proteine aufgetrennt werden, zwischen zwei Glasplatten gegossen. Sobald dieses auspolymerisiert war, wurde darauf das Sammelgel mit seinen weiten Maschen und den Taschen für die Proben gegossen. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert bevor sie auf das Trenngel treffen. Nach der Auspolymerisation wurde das Gel in die Elektrophorese Apparatur eingebracht, mit 1x SDS-Gellaufpuffer aufgefüllt und mit den Proben beladen (20 μ g Protein pro Tasche, wenn nicht anders angegeben). Die Proben wurden vorher im Verhältnis 1:5 mit 5x Lämmli-Puffer gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Um die Größe der Proteine einschätzen zu können wurde zusätzlich noch eine Tasche mit Proteinstandard beladen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 25 mA pro Gel für ca. 70 min verwendet.

2.2.3.5. Western Blotting

Die Methode des Western Blot meint den Transfer von Proteinen, die, wie unter 2.2.3.4 beschrieben, aufgetrennt wurden, auf eine Membran, mit darauffolgendem immunologischem Nachweis [64]. In dieser Arbeit wurde sowohl das Wettransfer-Verfahren als auch das Semi Dry-Verfahren angewendet, bei denen die Proteine mittels elektrischer Spannung auf die Membran transferiert wurden.

2.2.3.5.1. Wet Transfer Verfahren

Beim Wet Transfer Verfahren werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels elektrischem Feld in einer mit Puffer gefüllten Apparatur auf eine Immun-Blot™ PVDF Membran aufgebracht. Hierfür wurde zunächst die besagte PVDF-Membran in Methanol und dann in Wet Transfer Puffer äquilibriert. Die benötigten Vliese, Whatman-Papiere und das Gel wurden gleichfalls in Wet Transfer Puffer äquilibriert. Anschließend wurden die oben genannten Komponenten zu einem sogenannten „Sandwich“ Luftblasen frei übereinander gelegt und in die Apparatur eingesetzt. Für die Übertragung der Proteine wurde eine Spannung von 80 V gewählt. Der Wet Transfer Puffer wurde während des 90 minütigen Vorgangs über eine Wasserkühlung stets gekühlt.

2.2.3.5.2. Semi-dry Verfahren

Anders als beim Wet Transfer Verfahren ist beim Semi Dry Verfahren zu beachten, dass überschüssiger, ausgetretener Puffer entfernt wird und die Metallplatten der Apparatur trocken sind. Zunächst wurde das, aus der SDS-PAGE erhaltene Gel für 20 min im Kathoden Puffer inkubiert. Die Immun-Blot™ PVDF-Membran, auf die die Proteine transferiert werden sollte, wurde zunächst kurz in Methanol und anschließend für dieselbe Zeitspanne wie das Gel in Anoden-Puffer äquilibriert. Die Whatman-Filterpapiere, die für das „Blot-Sandwich“ an der Kathode lagen, wurden in Kathoden-Puffer und die, die an der Anode lagen, in Anoden-Puffer äquilibriert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde aus den Whatman-Filterpapieren, der Membran und dem Gel ein „Blot-Sandwich“ aufgebaut und in die Blot-Apparatur eingespannt. Bei einer Spannung von 10 V und 3 mA pro cm² wurden die Proteine in 30 min auf die Membran übertragen.

2.2.3.5.3. Immunologischer Nachweis der Proteine

Um die Proteine auf der Membran mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren, wurde die Membran zunächst für 1 h in Blockierlösung inkubiert und somit eine unspezifische Bindung des Antikörpers ausgeschlossen. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit Waschpuffer zu je 15 min. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Als nächstes erfolgten wiederum 3 Waschschrte a 15 min und daran anschließend die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Dieser mit

Meerrettichperoxidase konjugierte Antikörper wurde 1:5000 in Blockierlösung verdünnt. Nachdem die Membran wiederum gewaschen worden war, wurde die Meerrettichperoxidase mittels ECL Western Blotting Detection Reagent von Amersham detektiert. Hierfür wurden die beiden Lösungen des ECL-Reagenz laut Protokoll des Herstellers miteinander vermischt, auf die Membran aufgebracht (1 ml) und für 5 min inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde entweder in einer lichtdichten Filmkassette mittels Hyperfilm ECLTM oder mittels des CCD Kamerasystems des Molecular Imagers ChemiDoc XRS+ (BioRad) detektiert. Die Detektionszeit betrug eine Zeitspanne von 1 s bis hin zu 30 min in Abhängigkeit von der Intensität des Chemilumineszenz Signals.

2.2.3.6. Coomassie Färbung

Unter der Coomassie Färbung versteht man die Bildung eines nicht-kovalenten Komplexes aus Proteinen und dem Coomassie-Farbstoff. Die Proteine werden z.B. auf einer Membran als blau-violette Banden sichtbar.

Für die Färbung wurde die aus dem Western Blot Verfahren erhaltene Membran zunächst für ca. 10 min mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit BiosafeTM Coomassie inkubiert bis die Banden deutlich sichtbar waren. Im Anschluss wurde die Membran nochmal gewaschen und zwischen Whatman-Filterpapier getrocknet.

2.2.3.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Unter einem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) versteht man die Methode zum Nachweis gelöster Proteine in z.B. Serum, Plasma und Zell- bzw. Gewebekulturüberständen. Das Prinzip dahinter ist, ähnlich zum Western Blotting, der Nachweis des Proteins via Antikörper und einen daran gekoppelten Farbumschlag.

Am Plattenboden befindet sich ein verankerter Capture Antikörper, der das Protein aus der Lösung bindet. An das Protein bindet anschließend der sogenannte Detection Antikörper, der über eine enzymatische Interaktion ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Die Menge des Farbstoffs ist direkt proportional zum gebundenen Protein und wird photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration kann anhand einer Standardkurve berechnet werden.

2.2.3.7.1. Proinsulin rat / mouse ELISA und Ultrasensitive Insulin mouse ELISA

Die Menge an Proinsulin in den Seren wurde mittels des Proinsulin rat / mouse ELISA von Mercodia laut Protokoll des Herstellers nachgewiesen.

Die Insulinmenge in den Seren wurde mittels des Ultrasensitive Insulin mouse ELISA von Mercodia gemäß den Herstellerangaben quantitativ bestimmt. Die Proben für die postprandiale Untersuchung wurden laut Anweisung des Herstellers verdünnt.

2.2.3.7.2. Duo Set ELISA Systeme

Für die quantitative Bestimmung von Chemerin und IL-6 wurden die DuoSet® ELISA Development System Kits von R&D Systems laut Herstellerprotokoll angewandt.

2.2.4. Kultivierung muriner Fibroblasten

2.2.4.1. Kultivierung

Die Zelllinie 3T3-L1 ist eine murine Fibroblastenzelllinie, die in konfluentem Zustand zu Adipozyten differenziert werden kann. Durch Hinzufügen verschiedener adipogener Substanzen wird eine Differenzierung zu Adipozyten erreicht, die primären Adipozyten funktionell und morphologisch sehr ähnlich sind.

Die Kultivierung der 3T3-L1 Zelllinie erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 10 ml Kultivierungsmedium in einem Brutschrank bei konstant 37°C und 5 % CO₂. Die Passagierung der Zellen erfolgte, sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Hierfür wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Flasche gelöst (10 min, 37°C). Durch Zugabe von Kultivierungsmedium wurde das Trypsin inaktiviert und somit die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Zelllösung bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, das Pellet in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert, die Zellzahl in der Neubauerkammer bestimmt und in neue Zellkulturflaschen überführt (125 000 Zellen pro Flasche).

2.2.4.2. Differenzierung

Für die Differenzierung wurden die Passagen 3 bis 8 der 3T3-L1 Zelllinie verwendet. Dafür wurden die Fibroblasten in Zellkulturschalen mit Kultivierungsmedium in einer Dichte von

5000 Zellen pro cm^2 verteilt. 24 h nach dem Aussäen wurde die Differenzierung angestoßen (Tag 0), indem das Kultivierungsmedium gegen das Differenzierungsmedium ausgetauscht wurde. Die Erneuerung des Differenzierungsmediums erfolgte an den Tagen 3 und 6. An Tag 7 der Differenzierung wurde das Differenzierungsmedium durch DMEM / Ham's F-12, das 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 μM Insulin, aber kein Serum enthielt, ersetzt. Tags darauf erfolgte ein erneuter Mediumwechsel diesmal mit DMEM / Ham's F-12, das als einzigen Zusatz 1 % Penicillin / Streptomycin enthielt. Die Differenzierung war an Tag 9 abgeschlossen und wurde mikroskopisch überprüft.

2.2.4.3. RNA Interference

Mittels siRNA kann man einen genspezifischen knock-down in Zellen verursachen. Durch Transfektion wird die doppelsträngige siRNA, deren Sequenz homolog zu der mRNA des herunter zu regulierenden Gens ist, in die Zelle gebracht. In der Zelle wird dann die doppelsträngige RNA in kurze Oligonukleotide gespalten (Dicer vermittelt), wobei der sense-Strang degradiert wird und der antisense-Strang in Struktur namens RISC (RNA induced silencing complex) eingebracht wird. Dieser entstandene Komplex bindet nun aufgrund der RNA-Bruchstücke an die komplementären Bereiche der Zielgen-mRNA. Daraufhin wird die mRNA degradiert und eine Expression des Zielgens ist nicht mehr möglich. Dieser Vorgang hat dabei auf die Expression anderer Gene keinen Einfluss. Für die Transfektion von 3T3-L1 Präadipozyten wurden das XtremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche) oder der Endo-Porter (GeneTools) verwendet.

Die Zusammensetzung des Transfektionsansatzes mit Xtreme sah folgendermaßen aus:

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| siRNA (100 nM) | 10 μl |
| Xtreme | 5 μl |
| DMEM / Ham's F-12 Medium, serumfrei | 85 μl |

Der Transfektionsansatz unter Verwendung des Endo-Porters hatte folgende Zusammensetzung:

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| siRNA (100 nM) | 10 μl |
| Endo-Porter | 7 μl |
| DMEM / Ham's F-12 Medium, serumfrei | 83 μl |

Zunächst wurde in einem nukleasefreiem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß das Medium vorgelegt und anschließend die siRNA und das Transfektionsreagenz hinzu pipettiert. Der Ansatz mit Xtreme wurde für 20 min und der mit Endo-Porter für 60 min bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Ansatz vorsichtig zu den Zellen, welche mit 900 µl Zellkulturmedium versetzt worden waren, zugetropft.

Für die Transfektion mit SNTA siRNA und SCD1 siRNA wurde die siRNA 150 nM eingesetzt.

Die Transfektion der Präadipozyten fand immer an Tag null der Differenzierung statt, allerdings wurde bei dem knock-down von SNTA und SCD1 ein weiteres Mal an Tag sechs transfiziert.

Die weitere Differenzierung folgte dem oben bereits beschriebenen Protokoll.

Der SNTA knock-down mittels XtremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche) wurden schon in der Diplomarbeit „Die Rolle von alpha-Syntrophin für die Funktionalität von Adipozyten“ (Kristina Eisinger, Universität Regensburg, 2011) etabliert. Der SNTA knock-down mittels EndoPorter wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit etabliert.

2.2.4.4. Stimulationsexperimente

Die für die Stimulationsexperimente verwendeten 3T3-L1 Adipozyten wurden entweder als Präadipozyten transfiziert und differenziert oder ohne Transfektion differenziert.

2.2.4.4.1. Inkubation mit Fettsäuren

Die 3T3-L1 Zellen wurden während der Differenzierung mit Ölsäure mit einer Konzentration von 400 µM inkubiert. An den Tagen null, eins, zwei, drei, sechs und neun der Differenzierung wurden die Zellüberstände und Zelllysate aufgehoben und mittels Western Blotting die Proteine, die eine Rolle in der Lipidaufnahme und -speicherung spielen, untersucht.

2.2.4.4.2. Stimulation mit Insulin

Die fertig differenzierten 3T3-L1 Adipozyten wurden an Tag neun für 20 min mit Insulin ($c = 0,2 \mu\text{M}$ Endkonzentration) bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend wurde der Zellüberstand und Zelllysate gewonnen. Als Lösungsmittelkontrolle diente H₂O.

Die Insulinstimulation in 3T3-L1 Zellen mit SNTA knock-down via XtremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche) wurde bereits in der Diplomarbeit „Die Rolle von alpha-Syntrophin für die Funktionalität von Adipozyten“ (Kristina Eisinger, Universität Regensburg, 2011) etabliert. Dieselbe Stimulation wurde im Rahmen dieser Arbeit in 3T3-L1 Zellen mit SNTA knock-down mittels EndoPorter (GeneTools) etabliert.

2.2.4.4.3. Stimulation mit Epinephrin

Das Epinephrin wurde in 10 mM HCl aufgenommen und auf die Endkonzentrationen 100 nM und 500 nM verdünnt. Die 3T3-L1-Adipozyten wurden an Tag neun der Differenzierung für 2 h mit Epinephrin oder 10 mM HCl als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Die erhaltenen Zellüberstände wurden auf freies Glycerin untersucht und das Zellysate via Western Blot Analyse auf Enzyme, die an der Lipolyse beteiligt sind.

2.2.4.5. Zytotoxizitätsbestimmung

Die mögliche zytotoxische Wirkung des durch die siRNA Behandlung hervorgerufenen knock-downs oder der verschiedenen Stimulantien auf die 3T3-L1 Zellen wurde mittels des Cytotoxicity Detection Kit (Roche) untersucht. In diesem Kit wird die Aktivität des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) kolorimetrisch in Zellüberständen nachgewiesen. Tritt der Zelltod aus oben genannten Gründen ein wird die LDH aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum freigesetzt. Somit korreliert die Aktivität der LDH direkt mit der Menge an toten Zellen. Die Zellkulturüberstände wurden mit dem verwendeten Kulturmedium im Verhältnis 1:2 verdünnt und auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen. Zunächst wurden die Komponenten NAD⁺, Katalyst und Tetrazolium gemäß dem Protokoll des Herstellers miteinander gemischt und anschließend zugegeben. Hierauf wurde die Platte bei RT für 30 min im Dunklen inkubiert. In dieser Zeit wurde Lactat, das sich im Überstand befand, von der LDH in Pyruvat umgesetzt und gleichzeitig NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert. Das gebildete NADH/H⁺ wurde vom Katalyst verbraucht um das gelbe Tetrazolium in rotes Formazan umzusetzen. Dieser Farbumschlag wurde bei 490 nm gemessen. Als Negativkontrolle wurde Kulturmedium verwendet.

2.2.4.6. Viabilitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Viabilität wurde Cell Titer Blue Assay von Promega verwendet. Mit diesem Assay kann man die Zahl der lebenden Zellen, die sich in Kultur befinden, bestimmen. Der Farbstoff Resazurin (blau) wird von den Zellen, die metabolisch aktiv sind, zu Resorufin (pink) reduziert. Dieses Reduktionspotential ist proportional zum Farbumschlag von blau nach pink. (Beschreibung unter www.promega.com).

2.2.5. Bestimmung von Cholesterin

Für die Bestimmung von Cholesterin wurde ein kolorimetrischer, enzymatischer Assay verwendet. Hierbei werden die vorliegenden Cholesterinester mit Hilfe von Cholesterinesterase in Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das freie Cholesterin wiederum wird mittels Cholesterinoxidase zu Wasserstoffperoxid und Cholestenon umgewandelt. Zusammen mit 4-Chlorphenol, 4-Aminophenazon und Peroxidase wird Wasserstoffperoxid zu einem Chinoniminfarbstoff umgesetzt. Die Konzentration des Farbstoffs ist proportional zur Cholesterinmenge und wird photometrisch gemessen. 4 µl der Probe bzw. des Lösungsmittels wurden als Doppelwerte in einer 96-Loch-Platte vorgelegt und 200 µl des Reagenz zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurde eine photometrische Messung laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.6. Bestimmung von Glukose

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration in Seren wurde der QuantiChrom™ Glucose Assay Kit (Biotrend) verwendet. Dieser funktioniert nach der o-Toluidin Methode: o-Toluidin und Glukose bilden unter Hitzeeinwirkung einen grünen Farbstoff. Die photometrische Bestimmung des Farbstoffs bei 630 nm verhält sich proportional zur Glukosekonzentration. Der Assay wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.7. Bestimmung von freiem Glyzerin

Glyzerin wird bei der Spaltung von Triglyzeriden freigesetzt und um dieses freie Glyzerin zu bestimmen wurde der Free Glycerol Assay Kit (BioCat) verwendet. In diesem Assay wird das freie Glyzerin mittels Enzym oxidiert und das Oxidationsprodukt bildet mit dem Reagenz des

Assays einen photometrisch nachweisbaren farbigen Komplex. Die Messung erfolgte bei 570 nm und anhand einer Standardkurve wurde die Glycerinmenge berechnet.

2.2.8. Bestimmung von Triglyzeriden

Bei den Triglyzeriden handelt es sich um Ester, die aus einem Glycerin und drei Fettsäuren aufgebaut sind. In dem hier verwendeten Test (enzymatisch und colorimetrisch) werden zunächst die Triglyzeride mit Hilfe der Lipoproteinlipase in die oben genannten Bestandteile gespalten. Anschließend wird das freigesetzte Glycerin unter Beteiligung von ATP, Mg^{2+} und Glycerinkinase in Glycerin-3-phosphat und ADP umgewandelt. Im nächsten Schritt wird nun das Glycerin-3-phosphat mittels Glycerinphosphatoxidase und Sauerstoff zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das erhaltene Wasserstoffperoxid wird zusammen mit 4-Aminophenazon (gelb) und 4-Chlorphenol unter Verwendung von Peroxidase zu Wasser, Salzsäure und 4-(p-Benzoquinonmonoimino)-phenazon (rot) umgesetzt. Die Menge an gebildetem rotem Farbstoff ist proportional zu der Menge an Triglyzeriden und wird photometrisch bestimmt. Für den Nachweis wurden 2 μ l der Probe, des Lösungsmittels und des Glycerinstandards als Doppelwerte in einer 96-Loch-Platte vorgelegt und 200 μ l des Reagenz zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurde eine photometrische Messung bei 570 nm durchgeführt. Die Triglyzeridkonzentration wurde anhand des Standards berechnet.

2.2.9. Massenspektrometrische Analyse von Seren und Leberextrakten

Die Aufbereitung und anschließende massenspektrometrische Analyse der Lipidspezies in den Seren und Lebern der Wildtyp und SNTA defizienten Mäuse wurde vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin in Kooperation mit Herrn PD Dr. Gerhard Liebisch durchgeführt.

2.2.10. Histologische Untersuchungen

2.2.10.1. Präparation der histologischen Schnitte

Die aus den Tieren herauspräparierten Gewebe wurden unverzüglich in 4 %iger Formalinlösung konserviert und später in Paraffin eingebettet. Von diesen so erhaltenen Paraffinblöcken wurden mittels Microtom 5 μ m dünne Schnitte angefertigt, in einem Wasserbad bei 45°C für 5 min gestreckt und auf Objektträger gezogen. Die Objektträger

wurden über Nacht getrocknet und für weitere Verwendungen unter Lichtausschluß aufbewahrt.

2.2.10.2. Hämalaun-Eosin-Färbung

Bei Hämalaun handelt es sich um einen basischen Farbstoff, der basophile Bestandteile wie z.B. Zellkerne blau färbt. Eosin dagegen ist ein saurer Farbstoff, der eosinophile Elemente wie das Zytoplasma rot anfärbt. Um eine HE-Färbung durchführen zu können mussten die Schnitte zunächst mittels Histol entparaffiniert und anschließend in einer Alkoholreihe (absteigend von 100 %igem zu 70 %igem Ethanol) rehydriert werden. Danach wurden die Schnitte in ddH₂O gewaschen. Für die Blaufärbung wurden die Objektträger für 2 min in Hämalaunlösung inkubiert und hierauf unter fließendem Wasser gebläut. Dann wurden die Schnitte mit Eosin rot gegengefärbt und in der Alkoholreihe (aufsteigend von 70 % zu 100 % und zuletzt Histol) dehydratisiert. Zur Konservierung wurden die Schnitte mittels Entellan eingedeckt.

2.2.11. Fettgewebekulturen

Für die Fettgewebekulturen wurden fünf SNTA KO und sechs Wildtyp Mäuse, die eine Hochfettdiät erhalten hatten, und je vier SNTA KO und Wildtyp Tiere, die die entsprechende Standarddiät bekommen hatten, verwendet. Alle Tiere wurden zunächst mit CO₂ betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Danach wurde den Tieren das epididymale, perirenale und subkutane Fettgewebe entfernt, in Gefäße mit physiologischer Kochsalzlösung überführt und mittels steriler Biopsiestanze (4 mm Durchmesser, Stiefel) gleich große Stücke gewonnen. Diese Fettgewebsstücke wurden für 24 h in Medium für Fettgewebekulturen im Brutschrank in Kultur gehalten und danach mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid für weitere 24 h inkubiert (als Negativkontrolle diente H₂O). Am nächsten Tag wurde der Überstand gewonnen und aus den Gewebsstücken wurde Proteinlysate hergestellt. In den Überständen wurde später die Konzentration von IL-6 mittels ELISA gemessen. Zur Normalisierung der gemessenen Konzentrationen wurde der Proteingehalt der Lysate, das Gewicht der Fettdepots und deren Zellzahl herangezogen.

2.2.12. Tiermodelle

Die Tierexperimente wurden entsprechend dem Deutschen Gesetz zum Schutz von Tieren durchgeführt. Die Experimente waren vom Tierschutzkomitee des Universitätsklinikums Regensburg genehmigt worden. Alle Tiere wurden in einem 12 h Tag- / Nacht-Zyklus bei konstanter Raumtemperatur ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) und Luftfeuchtigkeit gehalten und hatten ad libitum Zugang zu Wasser und Futter.

2.2.12.1. Syntrophin Knock-out Mäuse

Die männlichen alpha Syntrophin defizienten Mäuse (24 Stück) und die entsprechenden Wildtyp Kontrolltiere (24 Stück) wurden in einem Alter von 10 Wochen von der Firma The Jackson Laboratory bezogen. Nach vier wöchiger Akklimatisierungszeit wurden je 12 Tiere beider Genotypen auf Hochfettdiät und 12 Tiere auf Standarddiät gesetzt. Die Dauer der Diätgabe betrug 14 Wochen. Drei Tiere aus der SNTA KO Hochfettgruppe mussten vorzeitig aus dem Versuch entfernt werden. Die Gewichtsbestimmung der Tiere erfolgte wöchentlich über den gesamten Zeitraum. Über eine Zeitspanne von 6 Wochen wurde wöchentlich der Futterverbrauch bestimmt. Nach Ende der Diät wurde auf zweierlei Weisen verfahren: Untersuchung nüchterner Tiere und die Untersuchung postprandialer Effekte. Der einen Hälfte der Tiere wurden Gewebe und Herzblut entnommen nachdem sie über Nacht nüchtern waren. Zur Untersuchung der postprandialen Effekte wurde die andere Hälfte zunächst über Nacht nüchtern gesetzt. Anschließend hatten die Tiere für 2 h Zugang zum Futter, dann erst wurde ihnen Gewebe und Herzblut entnommen. Die Gewebe- und Herzblutentnahme erfolgte in beiden Fällen, nachdem die Tiere mittels CO_2 betäubt und per Genickbruch getötet worden waren.

2.2.12.2. ob/ob Mäuse

Auch die Leptin defizienten ob/ob Mäuse (B6.V-Lep^{ob}/J) und die entsprechenden Kontrolltiere wurden von der Firma The Jackson Laboratory bezogen. Es handelte sich dabei um je 5 Männchen im Alter von 10 Wochen. Nach einer Akklimatisierungszeit von 3 Wochen wurde den Tieren über Nacht das Futter entzogen. Anschließend wurden sie mittels CO_2 betäubt und per Genickbruch getötet. Danach wurde ihnen Gewebe und Herzblut entnommen. Ich danke Frau Dr. Sabrina Krautbauer für die Gewinnung und Bereitstellung der von mir verwendeten Protein- und RNA-Proben der ob/ob Mäuse.

2.2.13. Experimentaldiäten

Die Experimentaldiäten wurden von der Firma sniff® Spezialdiäten GmbH (Soest) bezogen.

2.2.13.1. Hochfettdiät (HFD) (sniff® EF R/M acc. D12451 (II) mod.)

Bei der Hochfettdiät handelt es sich um eine Diät, die als Hauptenergielieferanten Fett und Zucker enthält. Mit Hilfe dieser Diät lässt sich eine diätinduzierte Adipositas hervorrufen. Des Weiteren enthält die Diät eine hohe Menge an tierischem Cholesterin. Die Bruttoenergie dieser HFD beträgt 22,1 MJ/kg. 31 % der kJ stammen aus Kohlenhydraten, 27 % aus Proteinen und 42 % aus Fett. Die Cholesterinmenge beträgt 194 mg/kg (sniff, Soest).

| Rohnährstoffe | [%] |
|-----------------------|------------|
| Trockenmasse | 93,9 |
| Rohprotein (N x 6,25) | 22,5 |
| Rohfett | 23,1 |
| Rohfasern | 5,7 |
| Rohasche | 5,9 |
| N freie Extrakte | 36,8 |
| Stärke | 6,6 |
| Zucker | 20,4 |
| Dextrin | 11,1 |

2.2.13.2. Standarddiät (SD) (ssniff® EF acc. D12450B (I) mod.)

Diese Diät mit ihrem niedrigen Fettgehalt und hohem Zucker- und Dextringehalt wird als Kontrolldiät zur oben beschriebenen Hochfettdiät empfohlen. Der Bruttoenergiegehalt dieser SD beträgt 17.8 MJ/kg wobei 65 % der kJ aus Kohlenhydraten, 26 % aus Protein und 9 % aus Fett stammen. Die Cholesterinmenge beträgt 14 mg/kg (ssniff, Soest).

| Rohnährstoffe | [%] |
|-----------------------|------------|
| Trockenmasse | 93,3 |
| Rohprotein (N x 6,25) | 18,1 |
| Rohfett | 4,1 |
| Rohfasern | 4,7 |
| Rohasche | 6,2 |
| N freie Extrakte | 63,4 |
| Stärke | 26,0 |
| Zucker | 32,8 |
| Dextrin | 5,0 |

2.2.14. Quantifizierung Immunoblot

Die Banden der Immunblotanalysen wurden mittels ImageJ, einem Bildverarbeitungsprogramm, quantifiziert [65].

2.2.15. Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen erfolgten für nicht gepaarte Proben mittels Mann-Whitney-U-Test (SPSS 19 bis 21) und für gepaarte Proben mittels Student's t-test (Microsoft Excel 2007). Die graphischen Darstellungen erfolgten als sogenannte Boxblots (SPSS 21). Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ festgelegt. Für die Beschriftung der Diagramme wurde folgendes Schema zugrunde gelegt: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. SNTA Expression in murinen Adipozyten

Zur Untersuchung der Adipogenese *in vitro* wird häufig die Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 verwendet, da sich diese Zellen zu reifen Adipozyten differenzieren lassen und dabei spezifische Eigenschaften reifer Adipozyten aufweisen [66, 67].

3.1.1. SNTA während der Adipozytenreifung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein-Expressionsmuster von SNTA während der Adipozytenreifung untersucht. Zusätzlich wurden die Expressionsmuster von PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), FAS (*Fatty acid synthase*), HSL (*Hormone sensitive lipase*), SCD1 (*Stearoyl-CoA-Desaturase 1*) und FABP4 (*Fatty acid binding protein 4*) untersucht (Abbildung 8).

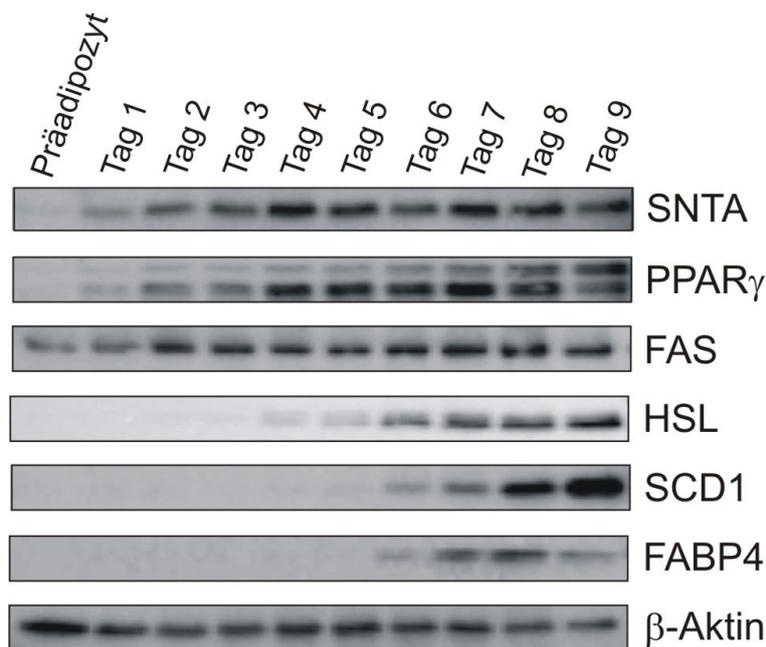


Abb. 8: Protein Expression von SNTA, PPAR γ , FAS, HSL, SCD1 und FABP4 in Präadipozyten und während der Adipogenese von 3T3-L1 Zellen, Als Ladungskontrolle dient β -Aktin.

FAS und SNTA werden während der Differenzierung mäßig induziert, während PPAR γ ab Tag 1 der Differenzierung heraufreguliert wird. HSL, SCD1 und FABP4 werden dagegen erst ab Tag 6 der Adipozytenreifung stark exprimiert.

3.1.2. SNTA während der Adipozytenreifung bei erhöhter Lipidkonzentration

Um ein *in vitro* Adipositas Modell zu schaffen, wurden die 3T3-L1 Zellen unter Zugabe von freien Fettsäuren zum Medium zu Adipozyten differenziert. Hierbei wurden die Protein-Expressionsmuster von SNTA, Caveolin-1 und FABP4 während der Differenzierung untersucht.

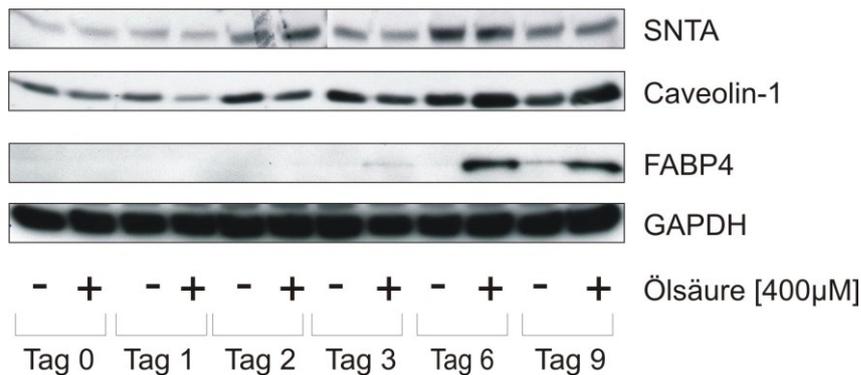


Abb. 9: Protein Expression von SNTA, Caveolin-1 und FABP4 während der Adipogenese mit bzw. ohne Zugabe von Ölsäure in 3T3-L1 Zellen, angefangen bei den Präadipozyten (Tag 0) bis hin zu reifen Adipozyten an Tag 9. Als Ladungskontrolle dient GAPDH.

Die erhöhte Fettsäurekonzentration hat keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von SNTA während der Adipozytenreifung. Caveolin-1 und FABP4 zeigen ab Tag 6 der Differenzierung eine Induktion ihrer Proteinexpression durch die erhöhte Lipidkonzentration.

3.2. Knock-down von SNTA während der Adipogenese

Um einen möglichen Einfluss von SNTA auf die Adipogenese näher zu untersuchen, wurde mittels RNA Interference Technologie ein knock-down von SNTA bereits in den Präadipozyten durchgeführt, der bis hin zu den reifen Adipozyten bestehen blieb.

3.2.1. Auswirkung auf die Adipogenese

Morphologisch betrachtet scheinen die 3T3-L1 Zellen mit SNTA knock-down während der Adipogenese kleinere Fetttropfen auszubilden als die mit Kontroll siRNA behandelten Zellen, wie man in Abbildung 10 in den zwei exemplarischen Mikroskop Aufnahmen sieht.

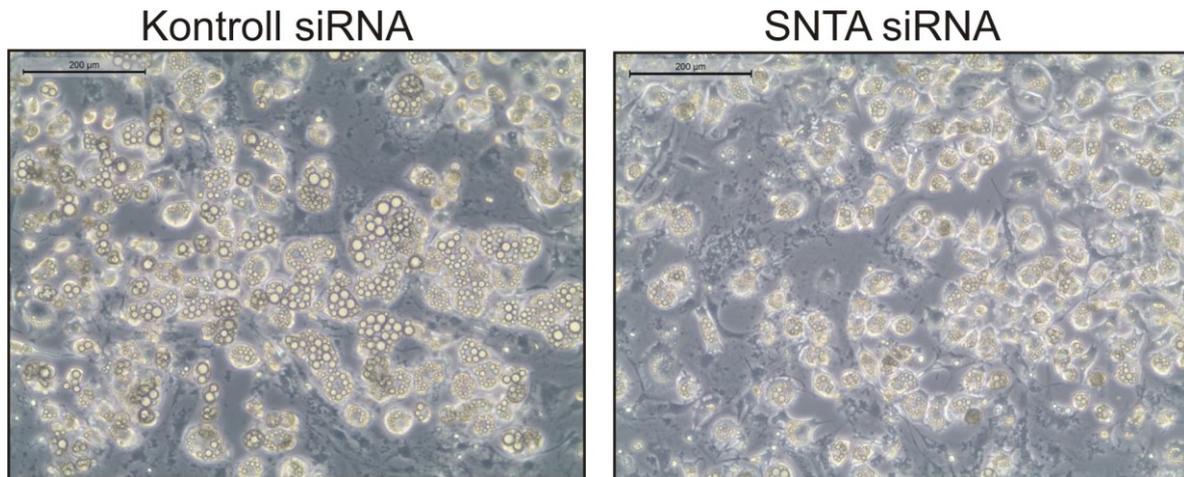


Abb. 10: Repräsentative Mikroskop Aufnahmen von 3T3-L1 Adipozyten, die während der Adipogenese entweder mit einer Kontroll siRNA oder mit SNTA siRNA behandelt wurden.

Zunächst wurde nach dem oben beschriebenen knock-down die Proteinexpression von Proteinen wie FAS und SCD1, die an der Fettsäuresynthese beteiligt sind, untersucht. Außerdem die Lipase ATGL, das mit den Fetttropfen assoziierte Protein Perilipin und das in den Caveolae exprimierte Caveolin-1, das an der Cholesterin Homöostase beteiligt ist (Abb. 11).

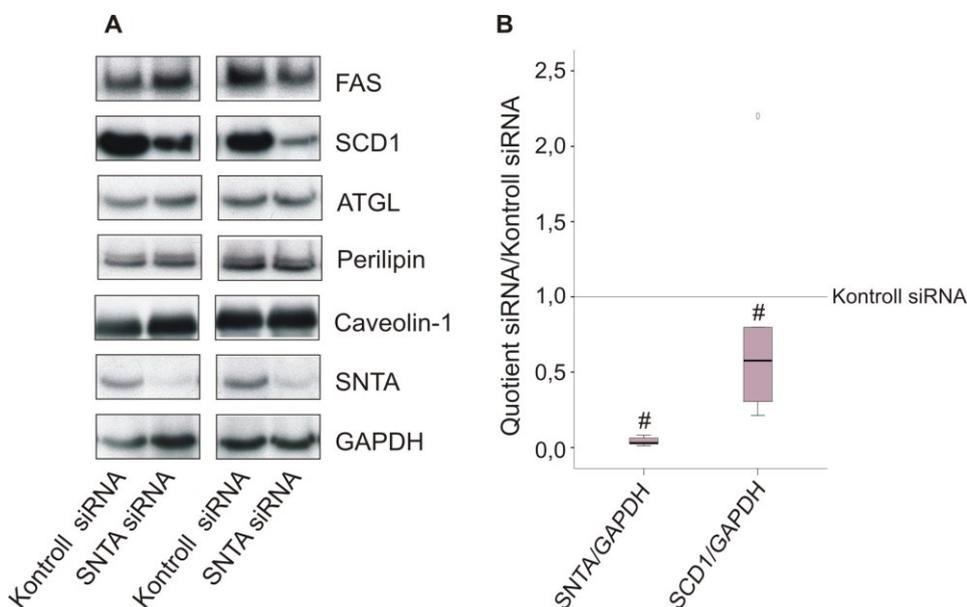


Abb. 11: Protein Expression von FAS, SCD1, ATGL, Perilipin, Caveolin-1 und SNTA am Tag 9 der Adipogenese. Die Präadipozyten wurden mit Kontroll- oder SNTA siRNA behandelt und sofort auf Differenzierungsmedium gesetzt. Als Ladungskontrolle dient GAPDH. (A) Repräsentative Ausschnitte aus den Western Blots und (B) die Vermessung von SNTA und SCD1 unter Normalisierung auf GAPDH. (# = $p < 0,05$)

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, besteht der knock-down von SNTA nach neun Tagen Differenzierung nach wie vor. Während auf die Proteinexpression von FAS, Perilipin, Caveolin-1 und ATGL keinerlei Auswirkung des SNTA knock-downs zu erkennen ist, ist die SCD1 Expression vermindert.

Des Weiteren wurden die Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen in den Zelllysaten der reifen Adipozyten nach SNTA knock-down bestimmt. Während die Triglyzeridmenge in den Zellen mit SNTA knock-down verringert ist, hat der knock-down auf die Cholesterinmenge keinen Einfluss (Abb. 12).

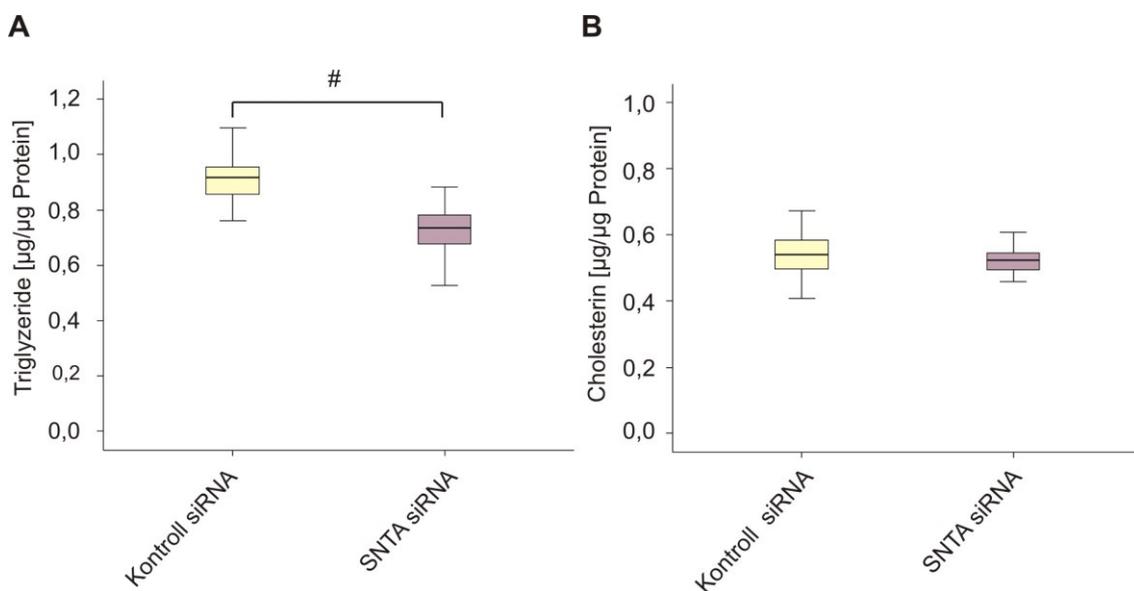


Abb. 12: Triglyzeride (A) und Cholesterin (B) im Zelllysate von reifen 3T3-L1 Adipozyten nach SNTA knock-down in den Präadipozyten. (# = $p < 0,05$)

3.2.2. Auswirkung auf die Insulinsensitivität

Als nächstes sollte die Auswirkung des knock-downs von SNTA während der Adipogenese auf die Insulinsensitivität untersucht werden. Hierfür wurden die reifen 3T3-L1 Adipozyten mit Insulin [0,2 µM] stimuliert und anschließend die Expression der am Insulinsignalweg beteiligten Proteine Akt und p44/42 MAP Kinase und deren phosphorylierte Formen untersucht (Abb. 13).

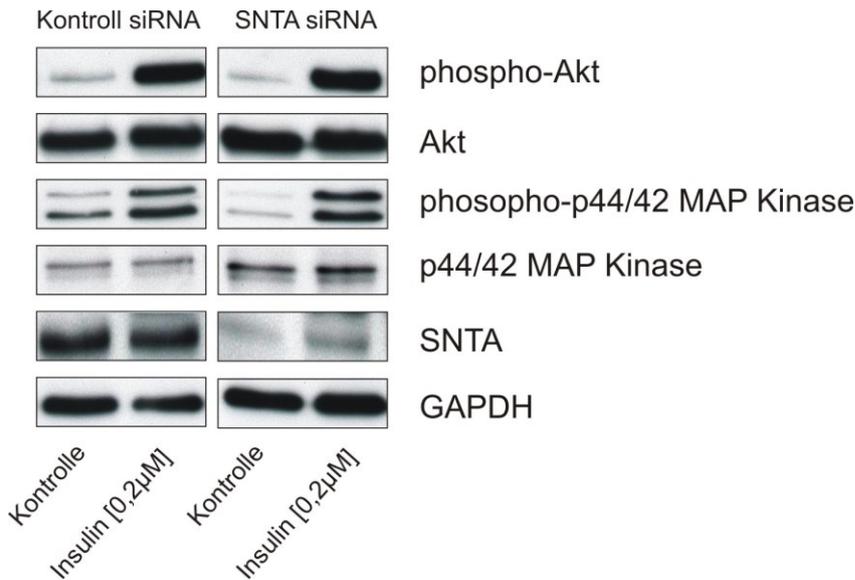


Abb. 13: Immunoblot Analyse zur Auswirkung des SNTA knock-downs auf die Insulinsensitivität: Die Protein Expression von phospho-Akt, Akt, phospho-p44/42 MAP Kinase, p44/42 MAP Kinase und SNTA an Tag 9 der Adipogenese nach SNTA knock-down während der Differenzierung. Als Ladungskontrolle dient GAPDH. Zur Aktivierung des Insulinsignalweges wurden die Adipozyten mit 0,2 μ M Insulin bzw H₂O als Kontrolle für 20 min inkubiert.

Die Insulinstimulation bewirkt, wie erwartet, eine Induktion der phospho-Akt und der phospho-p44/42 MAP Kinase, allerdings hat der SNTA knock-down keinen Einfluss auf diese Induktion.

3.2.3. Auswirkung auf die induzierte Lipolyse mit Epinephrin

Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von SNTA in der Lipolyse untersucht. Hierfür wurde SNTA während der Differenzierung der 3T3-L1 Zellen mittels siRNA herunter reguliert und die reifen Adipozyten mit Epinephrin stimuliert um eine Lipolyse zu induzieren.

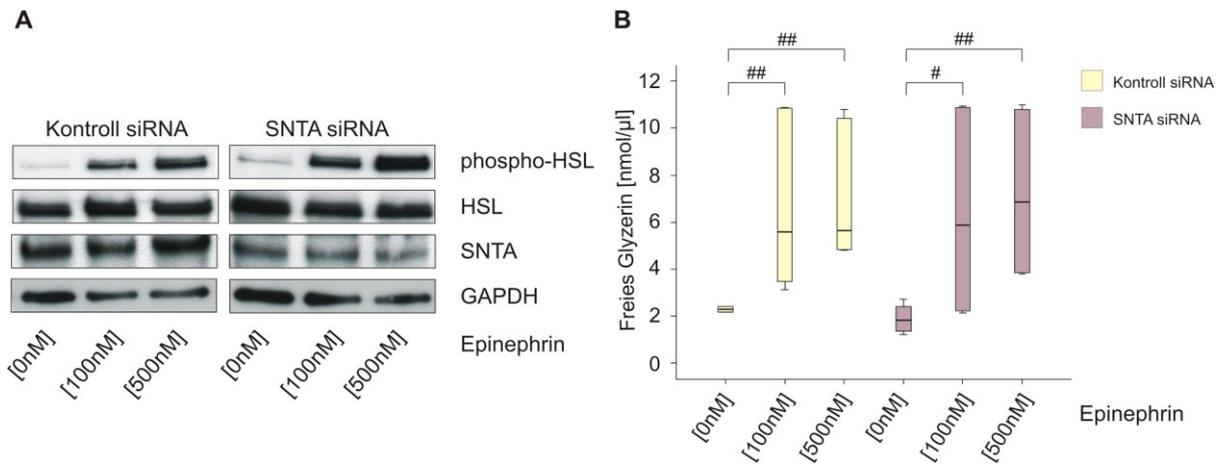


Abb. 14: Protein Expression von phospho-HSL, HSL und SNTA an Tag 9 der Adipogenese nach SNTA knock-down während der Differenzierung und zwei stündiger Stimulation mit Epinephrin ([100 nM] und [500 nM]). Als Ladungskontrolle dient GAPDH. (A) Repräsentative Ausschnitte aus den Western Blots und die Bestimmung von freiem Glycerin in den Zellüberständen (B). (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$)

Die Immunoblotanalyse (Abb. 14 A) ergibt die erwartete Induktion von phospho-HSL durch Epinephrin, allerdings hat der knock-down von SNTA keinen Einfluss auf diese Induktion. Die Bestimmung des freien Glycerins in den Zellüberständen zeigt eine erhöhte Menge an freiem Glycerin nach der Epinephrinstimulation, allerdings macht es keinen Unterschied, ob die Zellen zuvor mit Kontroll siRNA oder SNTA siRNA behandelt worden waren (Abb. 14 B). Somit hat SNTA keine Auswirkung auf die induzierte Lipolyse.

3.3. Knock-down von SNTA in murinen Präadipozyten

3.3.1. Auswirkung auf die Proliferation

Neben den Auswirkungen des SNTA knock-downs auf die Adipogenese und die reifen Adipozyten sollte auch untersucht werden, welche Rolle SNTA bzw. dessen verminderte Expression in murinen Präadipozyten spielt. Hierbei wurde in 3T3-L1 Präadipozyten ein SNTA knock-down herbeigeführt und anschließend mittels des Cell Titer Blue Assays die Proliferation der Zellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Präadipozyten mit verringerter SNTA Proteinexpression im Vergleich zu den mit Kontroll siRNA behandelten Zellen eine erhöhte Proliferation aufweisen (Abb.15).

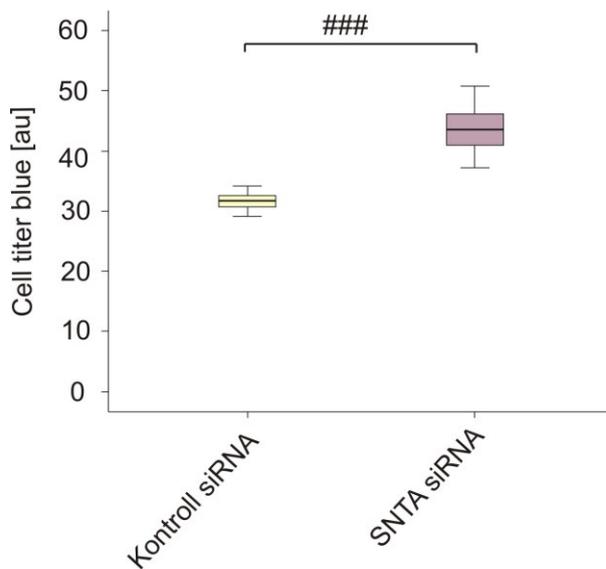


Abb. 15: Messung der Proliferation mittels Cell Titer Blue in 3T3-L1 Präadipozyten, die entweder mit Kontroll siRNA oder SNTA siRNA behandelt wurden. (### = $p < 0,001$)

3.4. Mögliche Interaktionen

3.4.1. Knock-down von Utrophin und Dystrophin

Utrophin und Dystrophin sind wie die Syntrophine Bestandteile des DAPC [44]. Durch den knock-down von Utrophin bzw. Dystrophin sollte die Auswirkung auf bzw. eine mögliche Interaktion mit SNTA untersucht werden. Der knock-down von Utrophin in 3T3-L1 Adipozyten zeigte keine Auswirkung auf die Proteinexpression von SNTA (Daten nicht gezeigt). Ein knock-down von Dystrophin war leider technisch nicht durchführbar, deswegen kann keine Aussage über dessen Wirkung auf SNTA getroffen werden.

3.4.2. Knock-down von SCD1

Der knock-down von SNTA bewirkt eine verminderte Proteinexpression von SCD1. Um zu überprüfen, ob die erniedrigte SCD1 Expression die verringerte TG Speicherung in den Adipozyten mit SNTA knock-down bewirkt, wurde die SCD1 in Präadipozyten mit Hilfe von siRNA herunterreguliert und die Zellen dann differenziert. Der knock-down von SCD1 in den 3T3-L1 Adipozyten sollte auch Aufschluss über dessen Wirkung auf die Proteinexpression von SNTA bringen. Zusätzlich diente er der Überprüfung des für die Immunoblots verwendeten SCD1 Antikörpers auf dessen spezifische Bindung. In Abbildung 16 sind exemplarisch Mikroskopaufnahmen von 3T-L1 Adipozyten gezeigt, die während der Adipogenese mit einer Kontroll siRNA oder der SCD1 siRNA behandelt

wurden. Der SCD1 knock-down scheint optisch keinen Einfluss auf die Adipogenese und die Morphologie der Zellen zu haben.

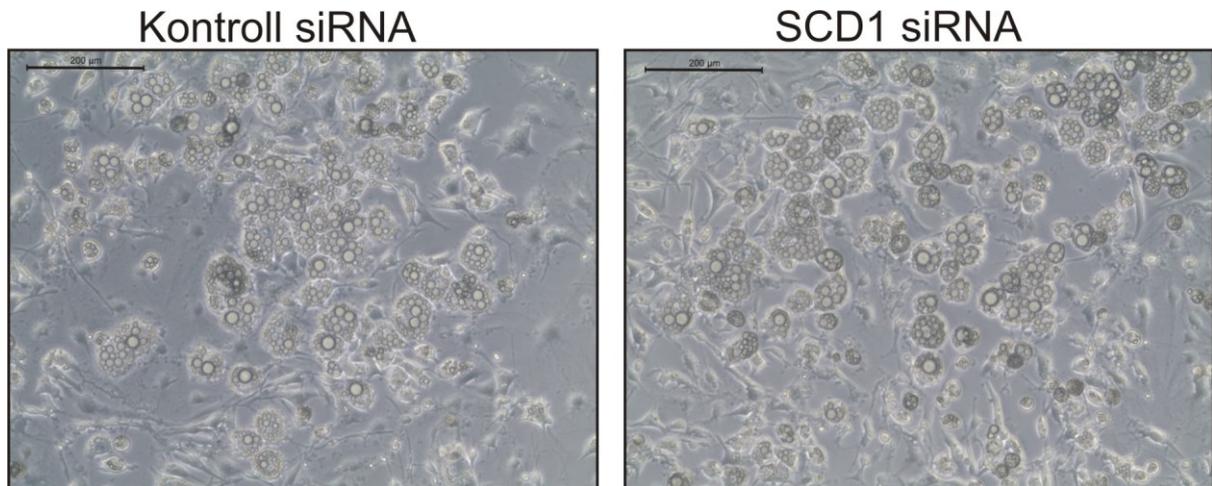


Abb. 16: Repräsentative Mikroskop Aufnahmen von 3T3-L1 Adipozyten, die während der Adipogenese mit einer Kontroll siRNA oder mit SCD1 siRNA behandelt wurden.

In Abbildung 17 ist die Immunoblot Untersuchung des SCD1 knock-downs gezeigt. Hierbei wurden die Proteinexpressionen von FAS, HSL und PPAR γ , die am Ende der Adipogenese induziert vorliegen, untersucht. Bei keinem dieser Marker für die Adipogenese ist eine Beeinflussung der Expression durch den SCD1 knock-down zu beobachten. Auch die SNTA Proteinexpression ist durch die verringerte SCD1 Expression unverändert. Der knock-down von SCD1 hingegen ist gut zu erkennen.

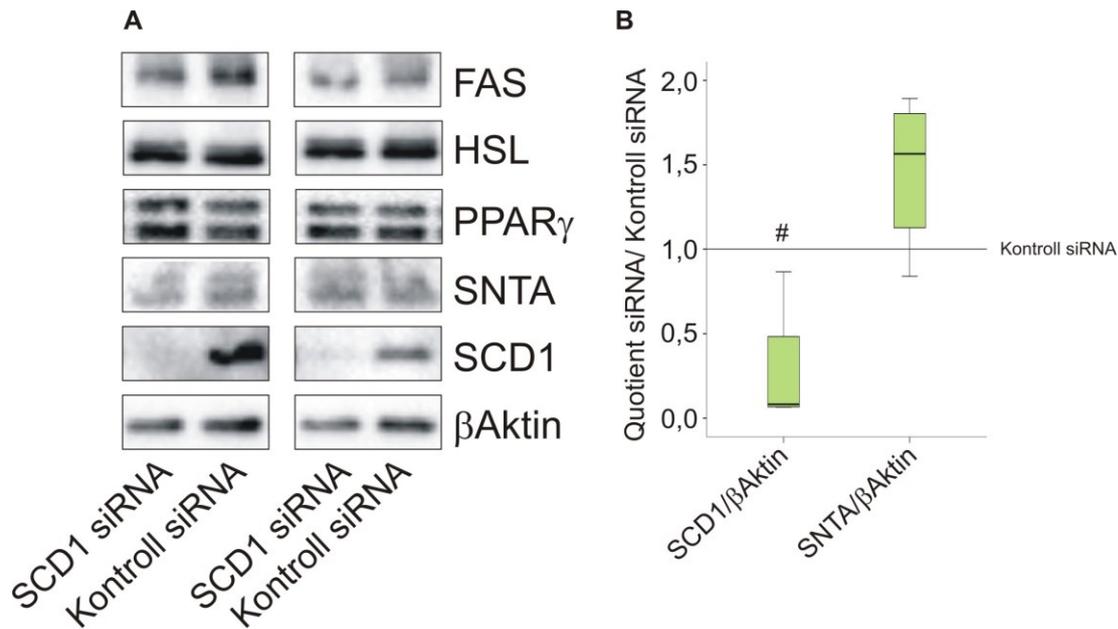


Abb. 17: Protein Expression von FAS, HSL, PPAR γ , SNTA und SCD1 an Tag 9 der Adipogenese nach SCD1 knock-down während der Differenzierung. Als Ladungskontrolle dient β Aktin. (A) Repräsentative Ausschnitte aus den Western Blots und die Vermessung von SNTA und SCD1 unter Normalisierung auf β Aktin (B). (# = $p < 0,05$)

3.5. Metabolische Charakterisierung von alpha-Syntrophin knock-out Mäusen nach Diät induzierter Adipositas

Die bisherigen *in vitro* Daten zeigen, dass SNTA die Lipidspeicherung in Adipozyten und die Proliferation von Prädipozyten beeinflusst. Daher sollte die Rolle von SNTA in einem Tiermodell der Adipositas untersucht werden. Die SNTA defizienten Mäuse wurden bei der Firma The Jackson Laboratory erworben. Diese Tiere zeigen keine phänotypischen Veränderungen.

3.5.1. Gewicht und Futtermittelaufnahme

Um eine Diät induzierte Adipositas herbeizuführen, wurden Wildtyp (C57BL/6) und SNTA defiziente Mäuse für 14 Wochen mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert. Parallel dazu wurden die Tiere mit einer Standarddiät (SD) ernährt. Die Futtermittelaufnahme und das Körpergewicht wurden regelmäßig dokumentiert. Am Ende des Versuchs wurden das Körpergewicht und das Gewicht der verschiedenen Fettdepots, der Leber und der Milz erfasst. In Abbildung 18 A ist das Körpergewicht während der Diät als Fläche unter der Kurve (AUC) dargestellt. Die Gewichtszunahme war sowohl bei den Wildtyp als auch bei den SNTA KO Mäusen auf HFD, im Vergleich zu den Kontrollmäusen auf SD, erheblich

größer. Allerdings ergab sich kein Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen den beiden Genotypen. Des Weiteren besteht kein Unterschied in der Futteraufnahme zwischen den beiden Diäten und den beiden Genotypen, wie in Abbildung 18 B gezeigt ist.

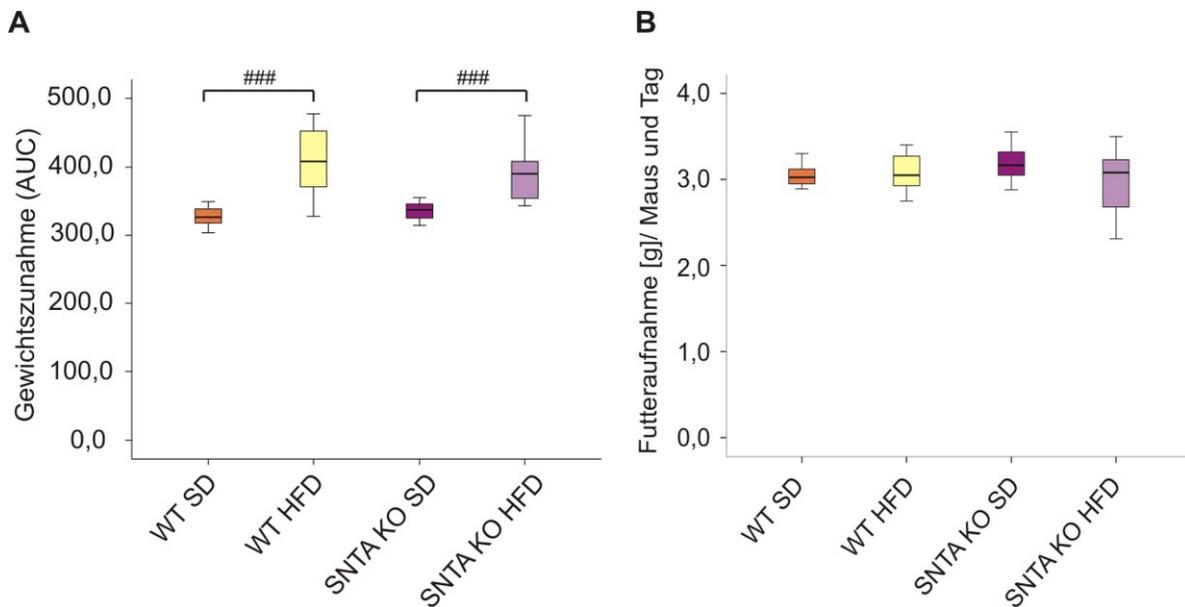


Abb. 18: (A) Gewichts Zunahme der WT und SNTA KO Tiere während der Fütterung einer Standarddiät (SD) bzw. Hochfettdiät (HFD) dargestellt als Fläche unter der Kurve. (B) Durchschnittliche Futteraufnahme der Tiere in Gramm pro Tag. (### = $p < 0,001$). Tierzahl pro Gruppe $n = 11 - 12$.

3.5.2. Serumparameter

3.5.2.1. Adipositasmarker Chemerin

Das Adipokin Chemerin liegt in der Adipositas systemisch in erhöhter Konzentration vor [68] und kann somit als Adipositasmarker verwendet werden. Chemerin wurde im Serum der Wildtyp und SNTA KO Tiere sowohl nach Fütterung der SD als auch HFD gemessen. In den Wildtyp Mäusen liegt das systemische Chemerin nach HFD im Vergleich zu den Kontrolltieren auf SD erhöht vor, was bei den SNTA KO Mäusen nicht der Fall ist. Somit ist bei HFD die Chemerinkonzentration im Serum der SNTA KO Tiere verringert im Vergleich zu den Wildtyp Tieren. (Abb. 19)

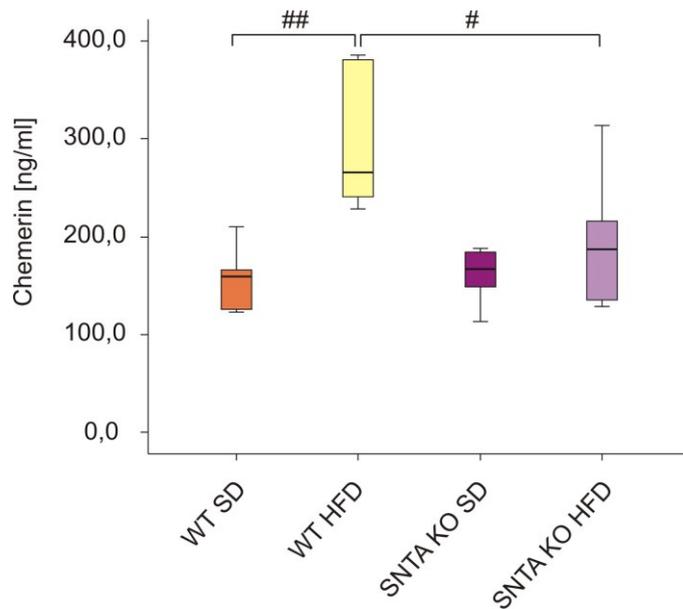


Abb. 19: Chemerin [ng/ml] gemessen im Serum der WT und SNTA KO Mäuse sowohl auf HFD als auch auf SD in nüchternen Zustand. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 9 - 12$.

Da die Adipositas oft mit einem gestörten Glukosestoffwechsel, einer Hyperinsulinaemie und einer Dyslipidaemie einhergeht [69], wurden im folgenden Serumparameter des Glukose- und Lipidmetabolismus untersucht.

3.5.2.2. Glukosemetabolismus

Die Serumparameter des Glukosemetabolismus (Glukose, Proinsulin und Insulin) wurden im Serum der WT und SNTA KO Mäuse nach Gabe einer HFD bzw. SD gemessen. Für die Nüchternwerte wurde den Tieren über Nacht die Nahrung entzogen. Für die postprandialen Untersuchungen wurde den Mäusen über Nacht das Futter entzogen und am Folgetag für 2 h wieder zugegeben. Für beide Versuchsbedingungen wurden die Mäuse zunächst getötet und anschließend das Herzblut für die Serumgewinnung entnommen.

3.5.2.2.1. Glukose

Glukose ist der Energielieferant des Organismus und wird im Blut zu den Zielzellen befördert. Der Glukosewert im Blut steigt nach der Nahrungsaufnahme an und wird durch die Wirkung von Insulin wieder auf seinen basalen Wert zurückgeführt. Im metabolischen Syndrom kommt es zu einer Insulinresistenz, die Aufnahme der Glukose in die Zellen ist gestört, was einen erhöhten Glukosespiegel und eine erhöhte Insulinproduktion zur Folge hat.

Im nüchternen Zustand liegt die Glukosekonzentration im Serum nach Gabe der HFD erhöht vor im Vergleich zu den SD Kontrolltieren, das gilt für beide Genotypen gleichermaßen. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abb. 20 A). Abbildung 20 B zeigt die postprandiale Erhöhung der Glukosekonzentration in WT und SNTA KO Mäusen bei Fütterung einer SD. Die beiden Genotypen unterscheiden sich nicht in ihrer postprandialen Reaktion. Ein anderes Bild ergibt sich bei der postprandialen Untersuchung der Glukosekonzentration der HFD Mäuse: hier steigt nur bei den SNTA KO Mäusen die Glukosekonzentration postprandial an, während dieser Effekt bei den WT Tieren nicht signifikant ist (Abb. 20 C).

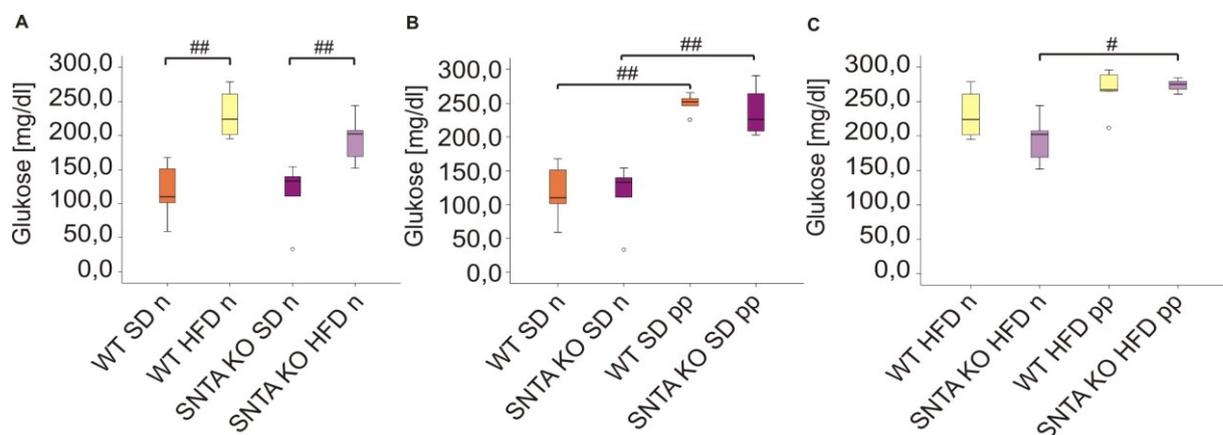


Abb. 20: Glukose (mg/dl) gemessen im Serum von WT und SNTA KO Tieren. (A) Nüchternglukose im Serum beider Genotypen, (B) Postprandiale Glukosekonzentration im Serum beider Genotypen nach SD. (C) Postprandiale Glukosekonzentration im Serum beider Genotypen nach HFD. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$, ### = $p < 0,001$). Tierzahl pro Gruppe $n = 3 - 6$.

3.5.2.2.2. Proinsulin

Proinsulin ist die Vorläuferform des Insulin und wird aus dem Präproinsulin durch Abspaltung der Signalsequenz und der Disulfidbrückenbildung zwischen den A und B

Ketten generiert. Proinsulin selbst hat nur eine geringe Wirkung, aber es sollte nach Erhöhung des Blutzuckerspiegels (postprandial) ansteigen um daraus Insulin zu synthetisieren und den Glukosespiegel im Blut zu senken.

Die Proinsulinkonzentration der nüchternen WT Mäusen nach HFD ist erhöht im Vergleich zu den SD Kontrolltieren, während dieser Effekt bei den SNTA KO Mäusen nicht zu beobachten ist (Abb. 21 A). Die Erhöhung der Proinsulinkonzentration im Serum nach Futtergabe ist, sowohl bei den WT, als auch bei den SNTA KO Tieren nach Fütterung beider Diäten gegeben (Abb. 21 B und C).

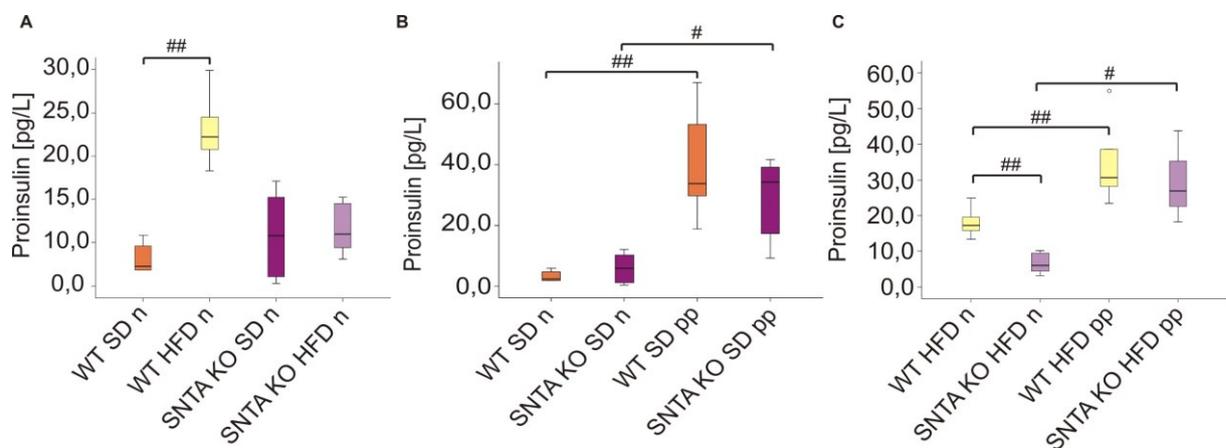


Abb. 21: Proinsulin (pg/L) gemessen im Serum von WT und SNTA KO Tieren. (A) Proinsulin im Serum beider Genotypen nach Gabe beider Diäten in nüchternem Zustand. (B) Postprandiale Proinsulinkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach SD. (C) Postprandiale Proinsulinkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach HFD. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 3 - 6$.

3.5.2.2.3. Insulin

Insulin ist ein in den beta-Zellen des Pankreas synthetisiertes Peptidhormon, dessen Sekretion durch die Glukosekonzentration im Blut bestimmt wird. Insulin wird aus dem oben genannten Proinsulin durch die Abspaltung des sogenannten C-Peptids gebildet. Bei den postprandialen Untersuchungen würde man eine erhöhte Insulinkonzentration im Serum erwarten, da durch die Futteraufnahme eine Erhöhung des Glukosespiegels zu erwarten ist.

Es zeigt sich kein Unterschied in der Insulinkonzentration, weder zwischen den beiden Genotypen, noch zwischen den beiden Diäten (Abb. 22 A). Allerdings steigt die Insulinkonzentration postprandial wie erwartet bei WT und SNTA KO Mäusen bei beiden Diätgaben an (Abb. 22 B und C).

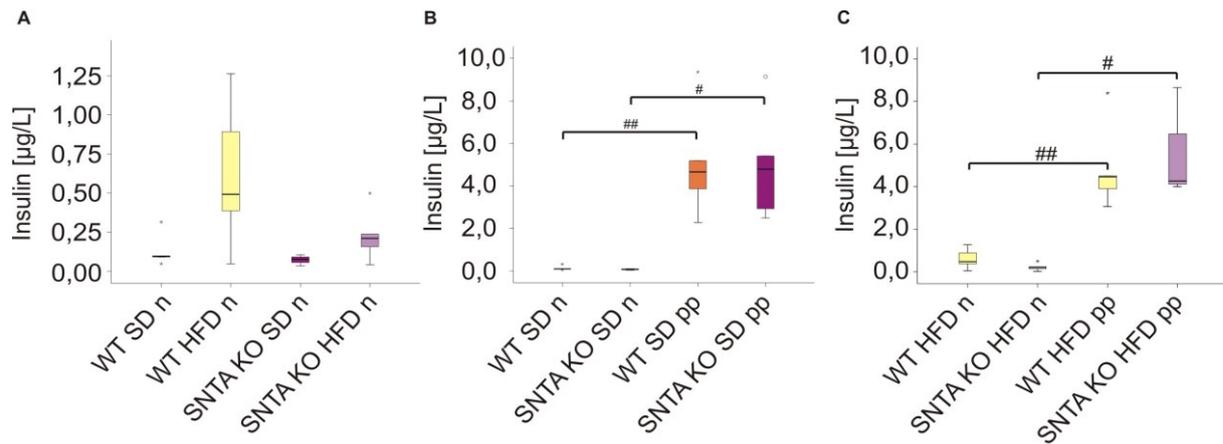


Abb. 22: Insulin ($\mu\text{g/L}$) gemessen im Serum von WT und SNTA KO Tieren. (A) Insulin im Serum beider Genotypen nach Gabe beider Diäten in nüchternem Zustand. (B) Postprandiale Insulinkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach SD. (C) Postprandiale Insulinkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach HFD. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 3 - 6$.

3.5.2.3. Lipidmetabolismus

Cholesterin und Triglyzeride wurden in den Seren von SNTA KO Mäusen und WT Tieren nach 14 wöchiger SD oder HFD Fütterung gemessen. Die Vorgehensweise für die Nüchternwerte und die postprandialen Werte ist dieselbe, wie unter 3.5.2.2 beschrieben.

3.5.2.3.1. Cholesterin

Cholesterin ist ein bedeutender Bestandteil von Zellmembranen, Lipoproteinen und der Galle. Cholesterin wird über Nahrungsfette aufgenommen und gelangt verestert in Chylomikronen verpackt in den Blutkreislauf.

Die Nüchtern-Cholesterinkonzentration ist den WT Mäusen nach HFD im Vergleich mit den Kontrolltieren auf SD nicht verändert, während die Cholesterinkonzentration bei den SNTA KO Tieren nach HFD erhöht vorliegt, verglichen mit den Tieren auf SD (Abb. 23 A). Die postprandialen Untersuchungen nach SD zeigen eine Erhöhung des Cholesterinspiegels nach Fütterung, das gilt, sowohl für WT, als auch für SNTA KO Mäuse (Abb. 23 B). Dieser postprandiale Effekt verschwindet jedoch nach Fütterung einer HFD (Abb. 23 C).

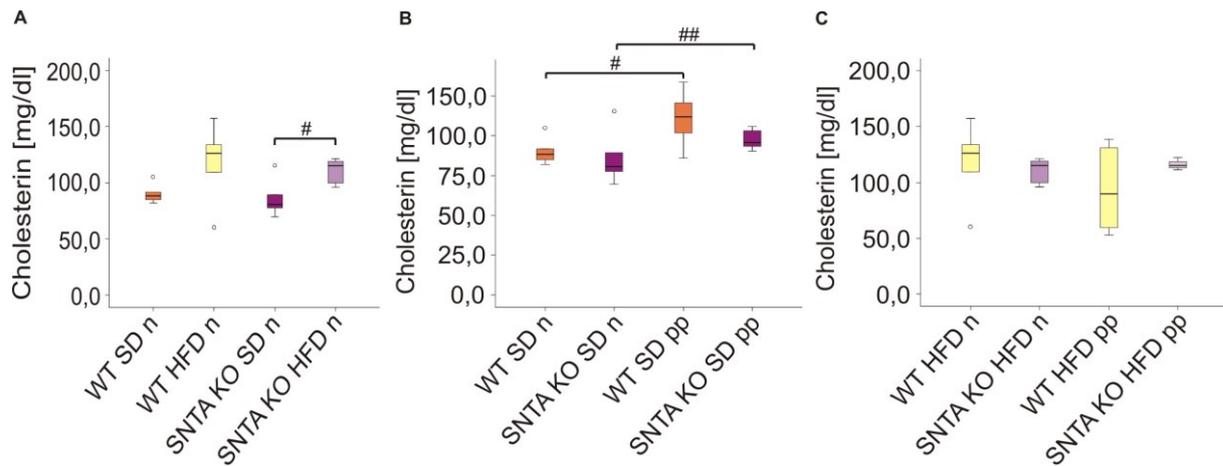


Abb. 23: Cholesterin (mg/dl) gemessen im Serum von WT und SNTA KO Tieren. (A) Cholesterin im Serum beider Genotypen nach Gabe beider Diäten in nüchternem Zustand. (B) Postprandiale Cholesterinkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach SD. (C) Postprandiale Cholesterinkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach HFD. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 3 - 6$.

3.5.2.3.2. Triglyzeride

Auch die Triglyzeride werden über Chylomikronen in den Blutkreislauf überführt. Im Muskel- oder Fettgewebe angelangt werden mittels Lipoproteinlipase freie Fettsäuren aus den Triglyzeriden abgespalten, im Fettgewebe gespeichert oder für den Energiestoffwechsel von glatten und gestreiften Muskeln verwendet.

Der Vergleich der Triglyzeridkonzentration im Serum der WT und SNTA KO Mäuse in nüchternem Zustand nach Gabe beider Diäten zeigt keinerlei Unterschiede auf (Abb. 24 A). Postprandial liegt die Triglyzeridkonzentrationen nach SD Fütterung bei beiden Genotypen erhöht vor im Vergleich zum Nüchternwert (Abb. 24 B). Nach Fütterung der HFD steigt nur der Triglyzeridspiegel der SNTA KO Mäuse postprandial an, was bei den WT Tieren nicht der Fall ist (Abb. 24 C).

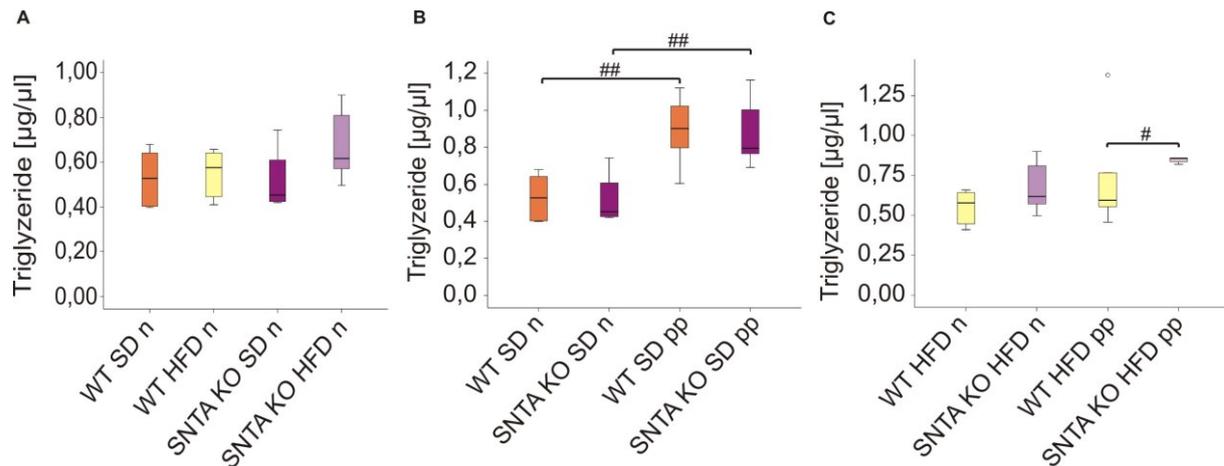


Abb. 24: Triglyzeride ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemessen im Serum von WT und SNTA KO Tieren. (A) Triglyzeride im Serum beider Genotypen nach Gabe beider Diäten in nüchternem Zustand. (B) Postprandiale Triglyzeridkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach SD. (C) Postprandiale Triglyzeridkonzentrationen im Serum beider Genotypen nach HFD. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 3 - 6$.

3.5.2.4. Serumlipidom

Wie bereits erwähnt erfolgte die Aufbereitung und die massenspektrometrische Analyse der Lipidspezies der Seren der über Nacht nüchtern gesetzten WT und SNTA KO Mäuse, sowohl nach SD, als auch nach HFD Fütterung, im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin in Kooperation mit Herrn PD Dr. Gerhard Liebisch. Vergleicht man die verschiedenen Lipidspezies zwischen den verschiedenen Genotypen und den verschiedenen Diäten, ergeben sich bei Phosphatidylcholin (Abb. 25 A) keine Unterschiede, während das Lysophosphatidylcholin (Abb. 25 B) in den SNTA KO Tieren nach SD, im Vergleich mit den zugehörigen WT Tieren, erniedrigt vorliegt. Das Sphingomyelin (Abb. 25 C) hingegen liegt nach Fütterung der HFD im Vergleich zu den SD Tieren sowohl bei SNTA KO als auch bei den WT Mäusen erhöht vor. Sowohl für das freie Cholesterin (Abb. 25 D) und die Cholesterinester (Abb. 25 E), als auch für Phosphatidylinositol (Abb. 25 F) ergibt sich eine signifikante Erhöhung nach HFD Gabe in den Seren der SNTA KO Tiere im Vergleich zu den SNTA KO Mäusen auf SD, während dieser Effekt bei den WT Tieren nicht zu beobachten ist.

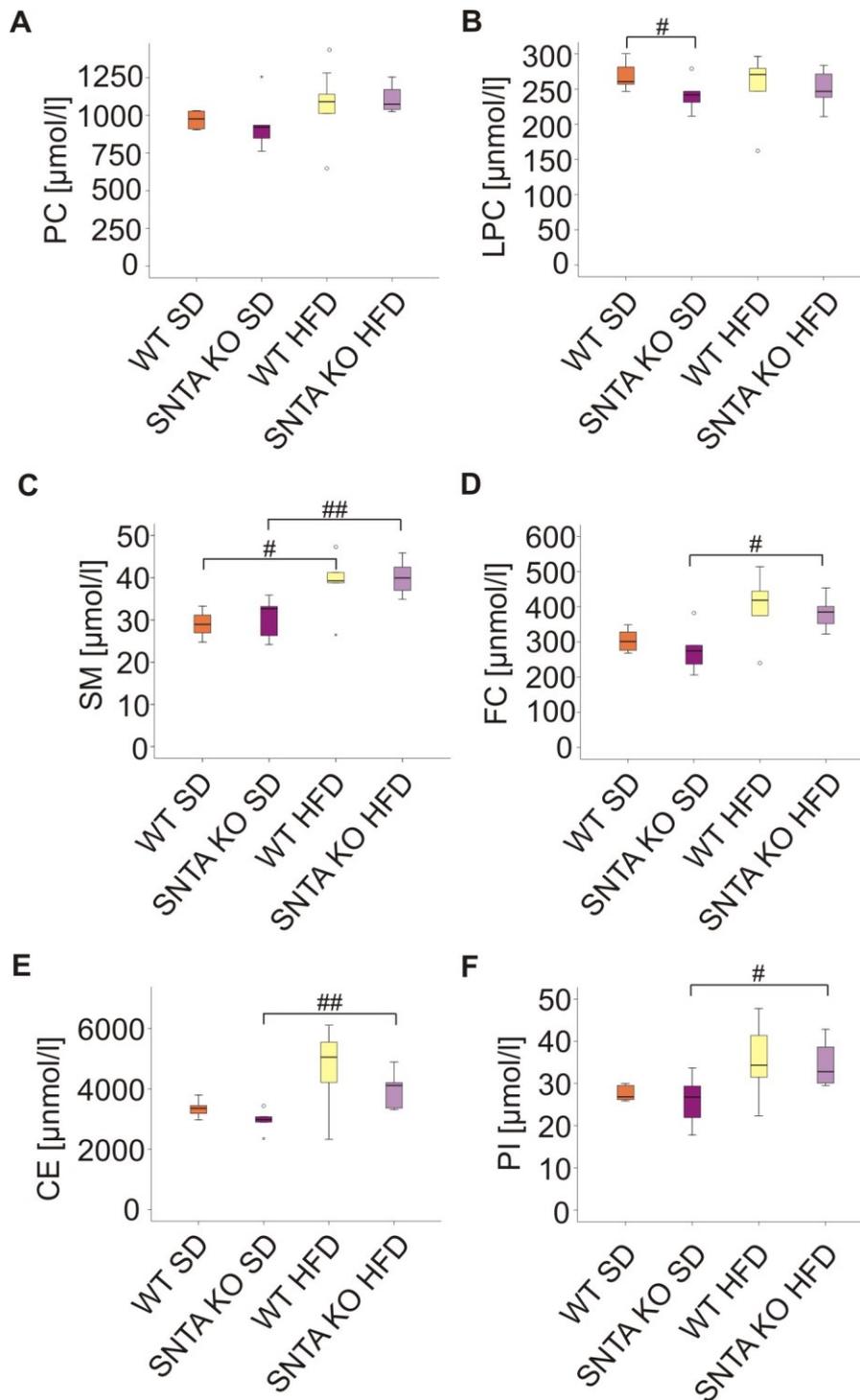


Abb. 25: Serumlipidom der über Nacht nüchtern gesetzten WT und SNTA KO Mäuse nach 14 Wochen SD oder HFD Fütterung. Bestimmt wurden Phosphatidylcholin (PC) (A), Lysophosphatidylcholin (LPC) (B), Sphingomyelin (SM) (C), freies Cholesterin (FC) (D), Cholesterinester (CE) (E) und Phosphatidylinositol (PI) (F). (A-F) wurden in Kooperation mit Herrn PD Dr. Liebisch bestimmt. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5 - 6$.

3.5.3. Analyse der Fettdepots

Für die Analyse der Fettdepots wurden das epididymale, das subkutane und das perirenale Fettgewebe sorgfältig herauspräpariert, gewogen, für Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die histologischen Untersuchungen zunächst in Formaldehyd und anschließend in Paraffin fixiert.

3.5.3.1. Gewicht

In Abbildung 26 sind die Gewichte der verschiedenen Fettdepots normalisiert auf das Körpergewicht der Tiere dargestellt. Das epididymale Fettgewebe nimmt nach HFD in beiden Genotypen mit Fütterung der HFD deutlich an Gewicht zu im Vergleich zu der Fütterung mit SD. Allerdings ist das epididymale Fettgewebe in den SNTA KO auf SD im Gewicht erniedrigt, dieser Unterschied verliert sich aber mit Fütterung der HFD (Abb. 26 A). Auch für das subkutane Fettgewebsdepot gilt eine starke Gewichtserhöhung nach HFD Fütterung im Vergleich zur Gabe von SD. Jedoch ist das Gewicht dieses Fettdepots in den SNTA KO nach SD-Gabe erniedrigt im Vergleich zu den WT Mäusen und das selbe gilt für das Gewicht nach Fütterung der HFD (Abb. 26 B). Dasselbe Bild ergibt sich für das perirenale Fettgewebe: die Fettdepots der SNTA KO Mäuse sind nach Fütterung beider Diäten deutlich geringer im Gewicht als die der vergleichbaren WT Tiere (Abb. 26 C).

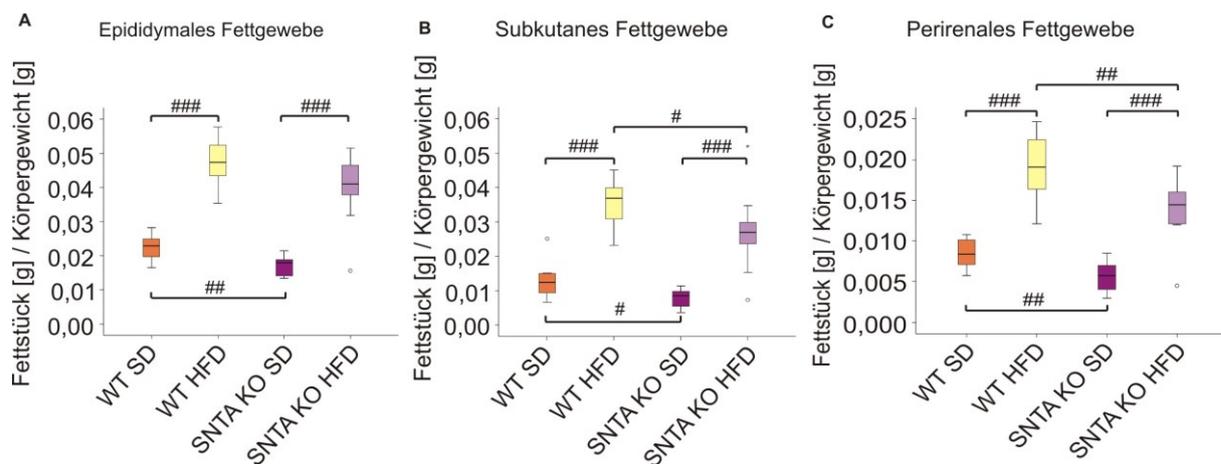


Abb. 26: Gewichte der epididymalen (A), subkutanen (B) und perirenal (C) Fettdepots der WT und SNTA KO Mäuse nach HFD bzw. SD normalisiert auf das Körpergewicht. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$, ### = $p < 0,001$). Tierzahl pro Gruppe $n = 9 - 12$.

3.5.3.2. Histologie

Für die Beurteilung etwaiger Unterschiede in der Zellzahl oder der Adipozytengröße wurde vom epididymalen und subkutanen Fettdepot von jedem Tier (WT, SNTA KO; HFD, SD) ein H&E gefärbter Schnitt angefertigt und in einer Fläche von 0,03 mm² die Anzahl der Adipozyten gezählt und deren Fläche vermessen. Abbildung 27 A zeigt die Anzahl der Adipozyten von WT und SNTA KO Mäuse nach HFD bzw. SD Fütterung, wobei sich eine Erniedrigung der Zellzahl nach HFD für beide Genotypen ergab im Vergleich mit den SD Kontrolltieren. Außerdem besitzen die SNTA KO Tiere sowohl nach SD als auch nach HFD Fütterung eine signifikant erhöhte Anzahl an Adipozyten. In Abbildung 27 B wurde die Anzahl der Adipozyten im subkutanen Fettgewebe ermittelt und auch hier sieht man eine starke Verringerung der Zellzahl nach Fütterung der HFD. Allerdings ist die Adipozytenzahl der SNTA KO Tiere nur nach Fütterung der HFD und nicht nach SD signifikant erhöht im Vergleich zu den WT Tieren.

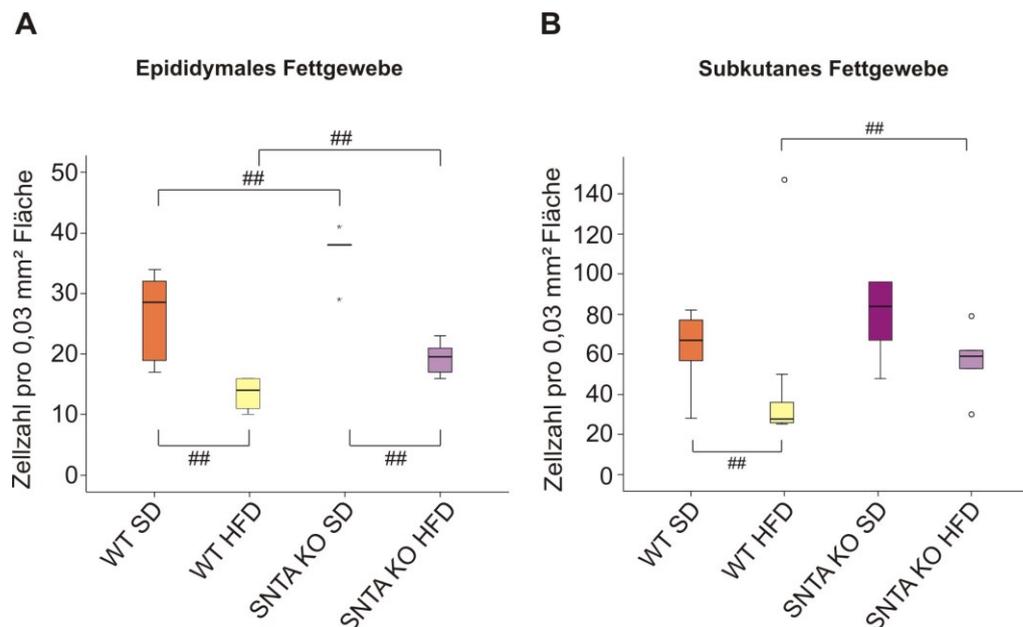


Abb. 27: Anzahl der Adipozyten im epididymalen (A) und subkutanen (B) Fettgewebe von WT und SNTA KO Tieren nach HFD bzw. SD jeweils bezogen auf eine Fläche von 0,03 mm². (## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5 - 6$.

Im Anschluss an die Ermittlung der Zellzahl wurde auch die Verteilungen der Adipozytengröße in den verschiedenen Fettdepots nach der Fütterung der Diäten untersucht. In Abbildung 28 A sieht man, dass im epididymalen Fettgewebe nach SD prozentual in den SNTA KO Mäuse vermehrt kleinere bzw. in den WT Tieren vermehrt

größere Adipozyten vorliegen. Diesen Unterschied kann man auch optisch in Abbildung 28 B auf den Referenzfotos der H&E gefärbten Schnitte erkennen.

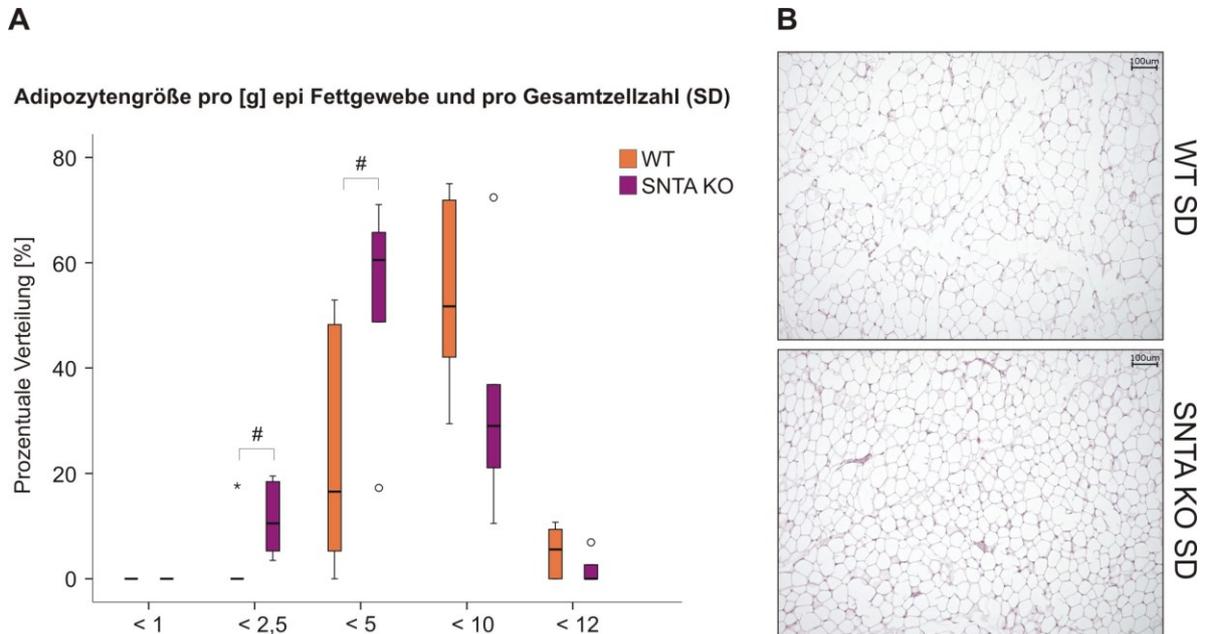


Abb. 28: Histologische Untersuchung des epididymalen Fettgewebes von WT und SNTA KO Mäusen nach SD: (A) Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten normalisiert auf das Gewicht des Fettgewebes und die Gesamtzellzahl / 0,03 mm² Fläche. (B) Repräsentative Fotos der dazugehörigen H&E Färbung. (# = $p < 0,05$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5 - 6$.

Dieselbe Untersuchung wurde für das epididymale Fettgewebe auch nach Fütterung der HFD durchgeführt. Prozentual liegen in den WT Mäusen größere Adipozyten vor als in den STNA KO Tieren (Abb. 29 A), was auch auf den Referenzfotos in Abbildung 29 B deutlich zu erkennen ist.

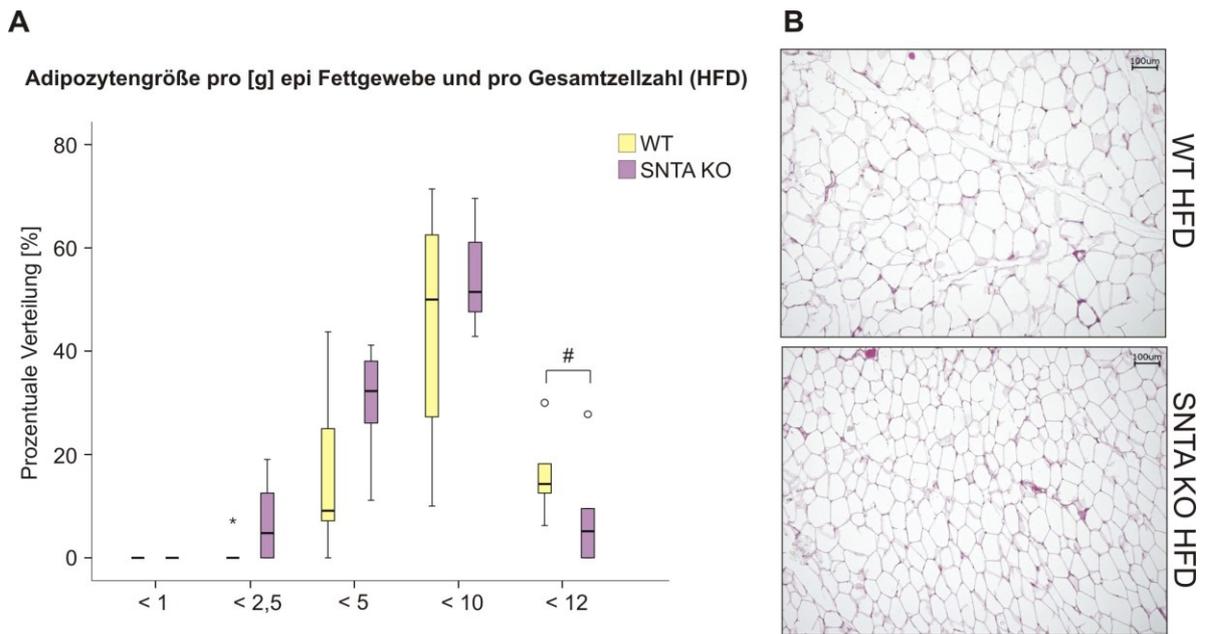


Abb. 29: Histologische Untersuchung des epididymalen Fettgewebes von WT und SNTA KO Mäusen nach HFD: (A) Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten normalisiert auf das Gewicht des Fettgewebes und die Gesamtzellzahl / 0,03 mm² Fläche. (B) Repräsentative Fotos der dazugehörigen H&E Färbung. (# = p < 0,05). Tierzahl pro Gruppe n = 5 – 6.

Auch im subkutanen Fettgewebe wurde die prozentuale Verteilung der Adipozytengrößen zwischen WT und SNTA KO Mäusen verglichen. Allerdings zeigt sich hier in der Adipozytengröße in den Tieren auf SD kein Unterschied zwischen den WT und den SNTA KO Mäusen, allenfalls ist ein leichter Trend zu mehr kleinen Adipozyten auszumachen (Abb. 30 A). Jedoch ist nach Fütterung der HFD der Unterschied zwischen WT und SNTA KO Mäusen gravierend. Die SNTA KO Mäuse haben deutlich weniger große und dafür viel mehr kleine Adipozyten (Abb. 31 A). Optisch wird dies auch in den H&E gefärbten Schnitten in den Abbildungen 30 B (SD) und 31 B (HFD) sichtbar.

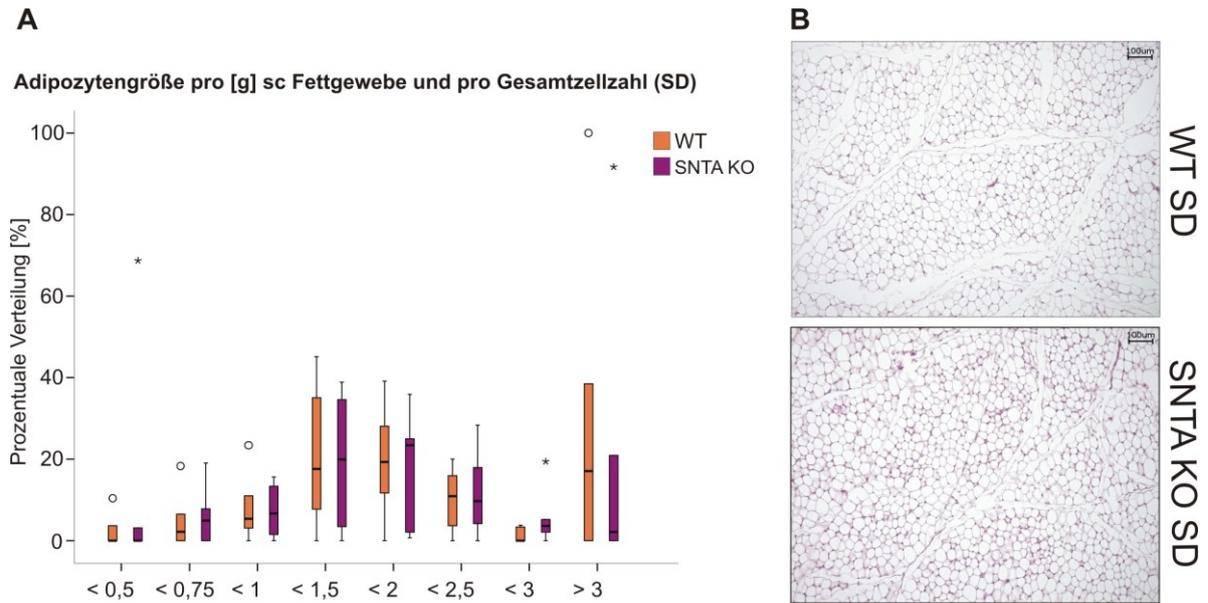


Abb. 30: Histologische Untersuchung des subkutanen Fettgewebes von WT und SNTA KO Mäusen nach SD: (A) Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten normalisiert auf das Gewicht des Fettgewebes und die Gesamtzellzahl / 0,03 mm² Fläche. (B) Repräsentative Fotos der dazugehörigen H&E Färbung. Tierzahl pro Gruppe n = 5 – 6.

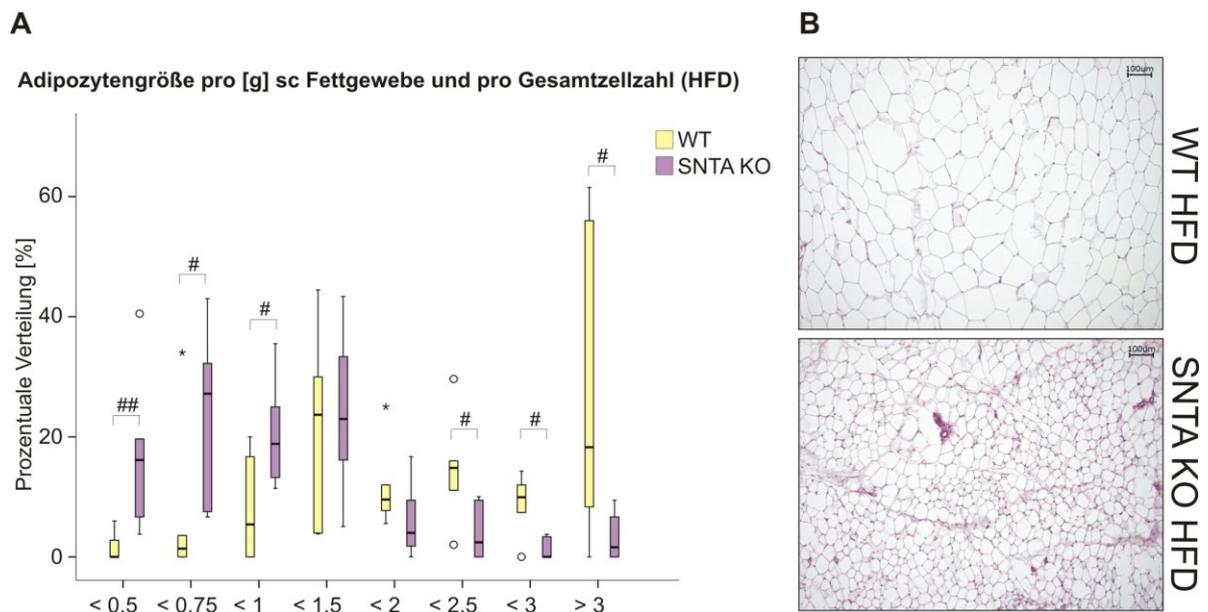


Abb. 31: Histologische Untersuchung des subkutanen Fettgewebes von WT und SNTA KO Mäusen nach HFD: (A) Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten normalisiert auf das Gewicht des Fettgewebes und die Gesamtzellzahl / 0,03 mm² Fläche. (B) Repräsentative Fotos der dazugehörigen H&E Färbung. (# = p < 0,05, ## = p < 0,01). Tierzahl pro Gruppe n = 5 – 6.

3.5.3.3. Analysen auf Proteinebene

Im Folgenden wurde die Auswirkung der SNTA Defizienz auf die Proteinexpression der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) nach Fütterung einer Standard- bzw. einer Hochfettdiät untersucht. Die AMPK ist sowohl im Lipid- als auch im Glukosestoffwechsel involviert und wird z.B. durch Umweltstress oder körperliche Aktivität aktiviert. Um den erhöhten ATP-Bedarf zu gewährleisten werden mittels AMPK anabole, energieverbrauchende Systeme heruntergefahren, während katabole Systeme aktiviert werden. Ein erhöhter Grundumsatz könnte die kleineren Adipozyten in den SNTA KO Mäusen erklären.

In Abbildung 32 sind die repräsentativen Ausschnitte der jeweiligen Immunoblots der verschiedenen Fettgewebe aufgeführt. Allerdings hat das Fehlen von SNTA keinerlei Auswirkung auf die AMPK-Proteinexpression im epididymalen Fettgewebe, weder nach SD (A) noch nach HFD (B) Fütterung. Selbiges gilt für das subkutane (C und D) und das perirenale (E und F) Fettgewebe.

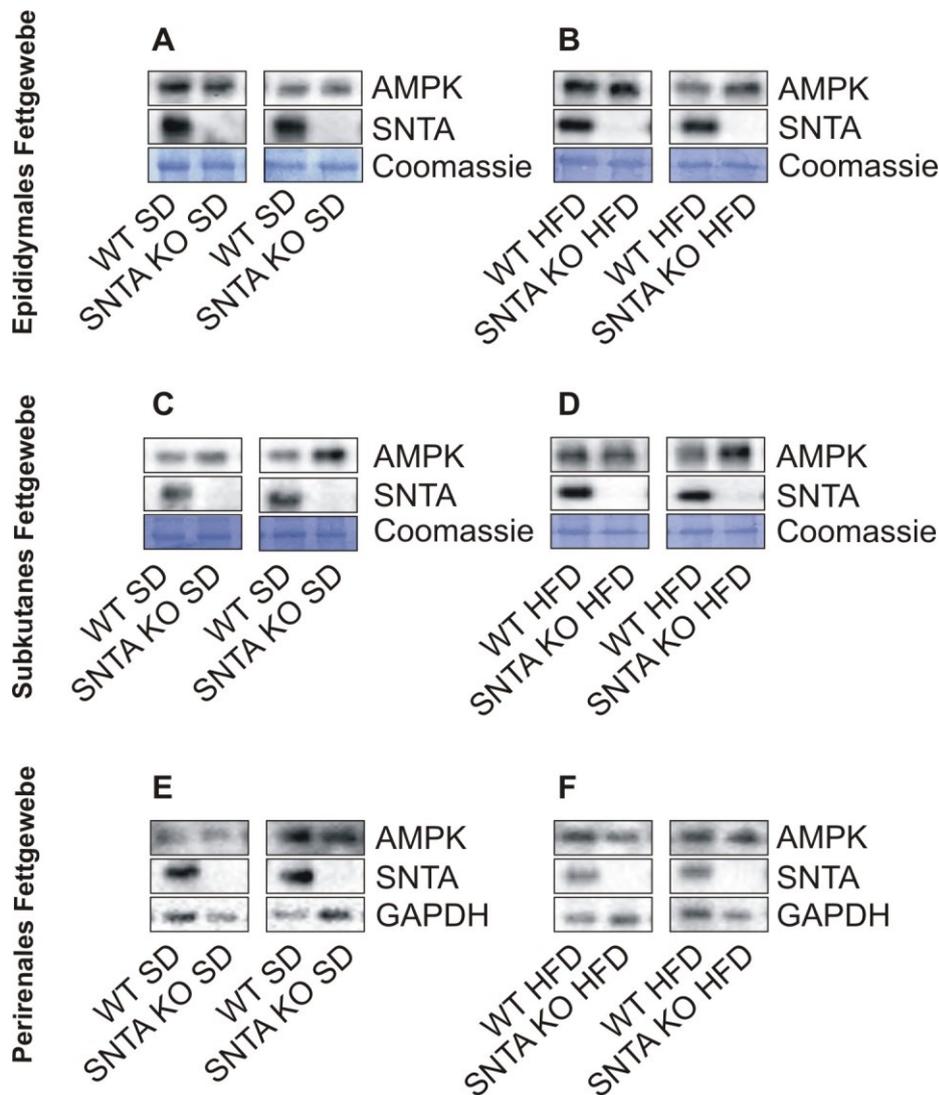


Abb. 32: Immunoblot Analyse von AMPK und SNTA im epididymalen Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach 14 Wochen Standarddiät (A) oder Hochfettdiät (B), im subkutanen Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach Standarddiät (C) oder Hochfettdiät (D) und im perirenal Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach Fütterung einer Standard- (E) oder Hochfettdiät (F). Als Beladungskontrolle diente die Coomassiefärbung der PVDF-Membran. Tierzahl pro Gruppe $n = 4 - 6$.

Es wurde auch die Proteinexpression der Lipasen HSL und ATGL in den verschiedenen Fettgeweben der SNTA KO und der WT Mäuse nach SD bzw. HFD untersucht, da eine erhöhte Lipaseaktivität die kleineren Adipozyten erklären könnte. Die Proteinexpression von HSL im epididymalen Fettgewebe ist durch den knock-out von SNTA erniedrigt solange die Tiere mit einer SD gefüttert werden (Abb. 33 A) ($p < 0,01$ nach Vermessung des Immunoblots und Normalisierung auf die Coomassiefärbung), durch die HFD Fütterung verschwindet dieser Effekt (Abb. 33 B). Die Proteinexpression von ATGL hingegen ist im epididymalen Fettgewebe weder nach SD (Abb. 33 A) noch nach HFD Gabe (Abb. 33 B) durch die SNTA Defizienz verändert. Im subkutanen Fettgewebe sind HSL und ATGL in

ihrer Proteinexpression in den SNTA KO Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren gleichermaßen unverändert nach SD (Abb. 33 C) und HFD (Abb. 33 D) Fütterung. Auch im perirenal Fettgewebe lassen sich keine Unterschiede in der Proteinexpression von HSL zwischen den beiden Genotypen, egal bei welcher Diätgabe, feststellen (Abb. 33 E und F).

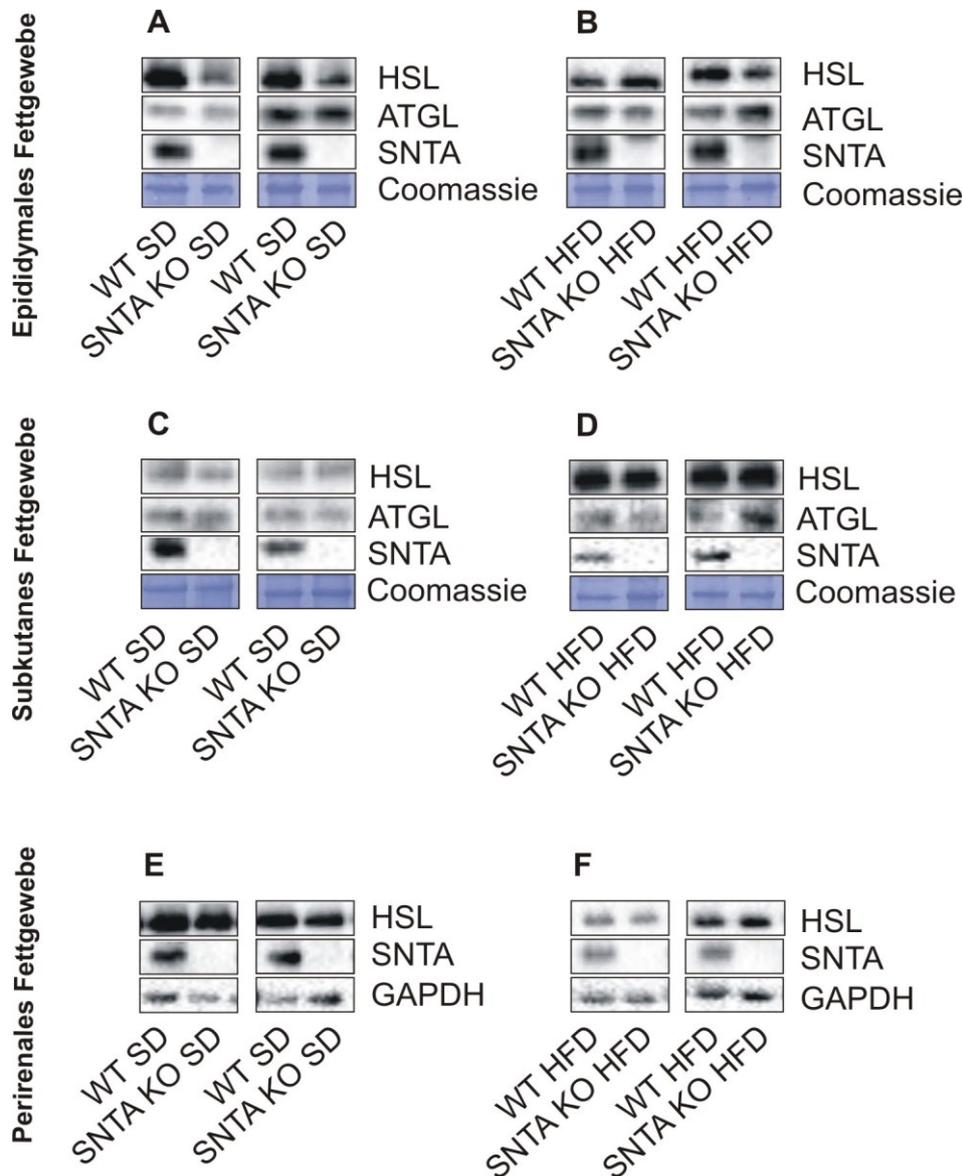


Abb. 33: Immunoblot Analyse von HSL, ATGL und SNTA im epididymalen Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach 14 Wochen Standarddiät (A) oder Hochfett-diät (B), im subkutanen Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach Standarddiät (C) oder Hochfett-diät (D) und im perirenal Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach Fütterung einer Standard- (E) oder Hochfett-diät (F). Als Beladungskontrolle dient die Coomassiefärbung der PVDF-Membran (A-D) bzw. GAPDH (E-F). Tierzahl pro Gruppe $n = 4 - 6$.

Als nächstes wurden die Proteinexpression von SCD1 und Caveolin-1 untersucht. Die Veränderung der SCD1 Proteinexpression wurde schon *in vitro* nach SNTA knock-down

festgestellt und sollte nun auch *in vivo* untersucht werden. SCD1 ist das Hauptenzym, das die Umwandlung von Palmitoyl-CoA und Stearoyl-CoA in Palmitoleoyl-CoA und Oleoyl-CoA katalysiert. Des Weiteren wurde bei SCD1 knock-out Mäusen reduziertes Körperfett festgestellt [35]. Betrachtet man zunächst SCD1 im epididymalen Fettgewebe so ist dessen Proteinexpression in den SNTA KO Tieren nach SD Fütterung im Vergleich zu den WT Tieren erniedrigt (Abb. 34 A) ($p < 0,01$, nach statistischer Auswertung der Vermessung des Western Blots und der Normalisierung auf GAPDH). Nach Fütterung der HFD ist dieser Effekt statistisch nicht mehr signifikant und kann nur als Trend angegeben werden ($p = 0,065$ nach Vermessung des Immunoblots und Normalisierung auf GAPDH).

Caveolin ist Hauptbestandteil der sogenannten Caveolae und bildet Hetero- und Homooligomere, die mit Cholesterin und anderen Lipiden interagieren [70]. Im epididymalen Fettgewebe ist Caveolin-1 in seiner Proteinexpression im Vergleich zwischen den beiden Genotypen und den beiden Diäten unverändert. Im subkutanen Fettgewebe sind sowohl SCD1 (Abb. 34 C) als auch Caveolin-1 (Abb. 34 D) nach SD Fütterung in ihrer Proteinexpression durch den SNTA knock-out Tieren unverändert, dasselbe gilt bei der Fütterung der HFD (Abb. 34 E). Auch im perirenal Fettgewebe sind sowohl SCD1 als auch Caveolin-1 (Abb. 34 F) nach SD Fütterung in ihrer Proteinexpression durch den SNTA knock-out unverändert. Bei der Fütterung der HFD zeigt sich ein Trend für eine verringerte SCD1 Proteinexpression im perirenal Fettgewebe der SNTA KO Tiere ($p = 0,052$ nach Vermessung des Immunoblots und Normalisierung auf GAPDH), während die Proteinexpression von Caveolin-1 unverändert ist (Abb. 34 G).

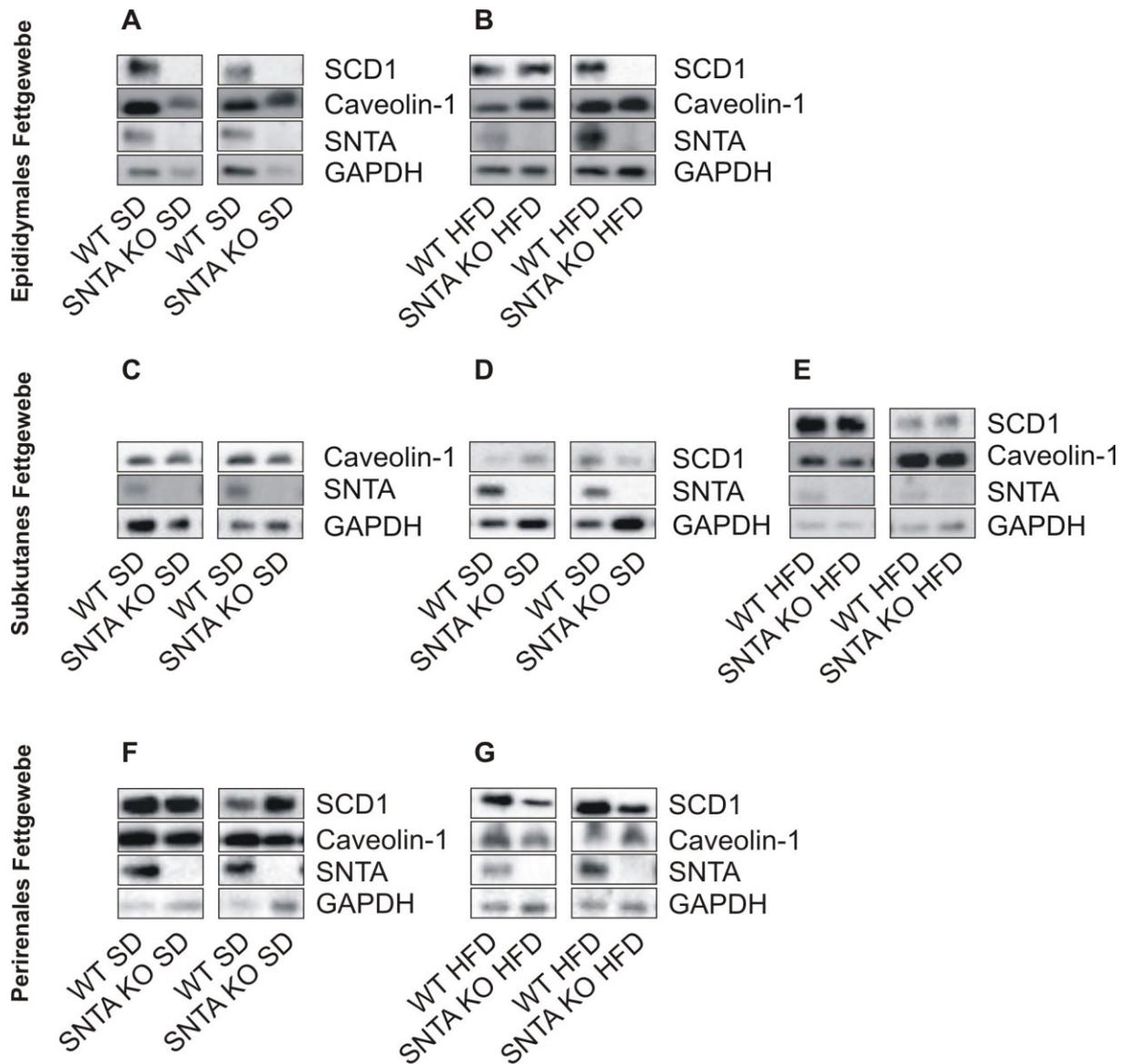


Abb. 34: Immunoblot Analyse von SCD1, Caveolin-1 und SNTA im epididymalen Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach 14 Wochen Standarddiät (A) oder Hochfett-diät (B), im subkutanen Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach Standarddiät (C-D) oder Hochfett-diät (E) und im perirenal Fettgewebe von SNTA KO und WT Tieren nach Fütterung einer Standard- (F) oder Hochfett-diät (G). Als Beladungskontrolle wird GAPDH heran gezogen. Tierzahl pro Gruppe n = 4 - 6.

3.5.3.4. Entzündungsreaktion im Fettgewebe

Da man davon ausgeht, dass eine Adipositas zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Fettgewebe und somit zur Ausbildung des metabolischen Syndroms führt, sollte die Entzündungsreaktion in den WT und den SNTA KO Mäusen, die über weniger Körperfett verfügen, untersucht werden. Für die Untersuchung der Entzündungsreaktion im Fettgewebe wurden in etwa gleich große Fettgewebstücke aus den epididymalen und subkutanen Fettdepots der WT und SNTA KO Mäuse (SD und HFD) *in vitro* kultiviert und

mittels LPS-Stimulation eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Als Entzündungsmarker diente Interleukin-6 (IL-6), das mittels ELISA in den Fettgewebsüberständen gemessen wurde. In Abbildung 35 A ist die IL-6 Konzentration, normalisiert auf die Proteinkonzentration und die durchschnittliche Zellzahl der Fettgewebsstückchen, basal und nach LPS-Stimulation in den Überständen der WT und SNTA KO Gewebe nach Gabe beider Diäten im epididymalen Fettgewebe dargestellt, wobei man deutlich den Effekt von LPS auf IL-6 erkennen kann. Allerdings besteht in der basalen IL-6 Konzentration kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen noch den beiden Diäten. Betrachtet man die induzierte IL-6 Konzentration so besteht zwischen den beiden Genotypen nach SD Fütterung kein Unterschied, allerdings reagieren nach Fütterung der HFD die SNTA KO Mäuse weniger sensitiv auf die LPS-Stimulation mit einer niedrigeren IL-6 Freisetzung.

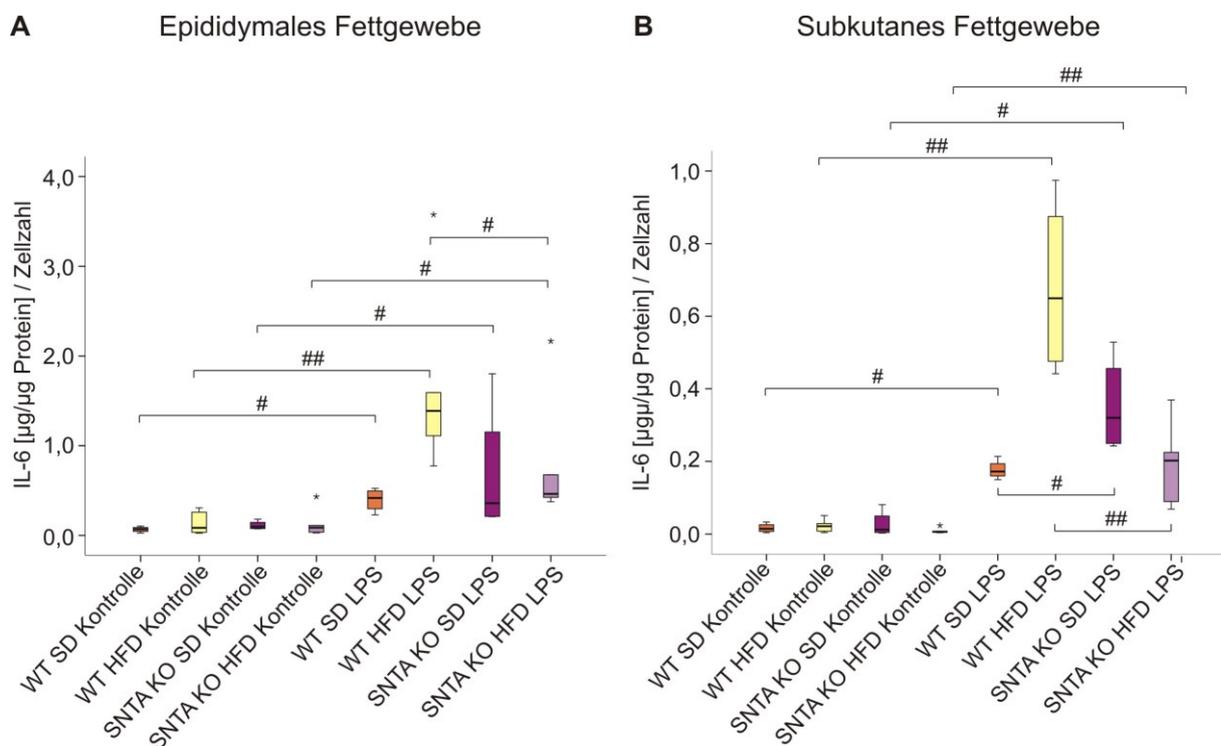


Abb. 35: IL-6 im Fettgewebe von WT und SNTA KO Tieren nach HFD bzw. SD. Basales und LPS-induziertes IL-6 normalisiert auf die Proteinkonzentration und die Zellzahl / 0,03mm² Fläche im epididymalen (A) und subkutanen (B) Fettgewebe. (# = p < 0,05, ## = p < 0,01). Tierzahl pro Gruppe n = 4 – 6.

Dieselbe Untersuchung bezüglich der Entzündungsreaktion wurde auch im subkutanen Fettgewebe durchgeführt. Abbildung 35 B zeigt die basale und die LPS induzierte IL-6 Konzentration in den Überständen. Das Gewebe der SNTA KO Tiere reagiert nach Fütterung der SD mit einer höheren IL-6 Ausschüttung auf die LPS Stimulation, während nach Gabe der HFD das subkutane Fettgewebe der SNTA KO Mäuse weniger sensitiv und

mit einer geringeren IL-6 Freisetzung auf die induzierte Entzündungsreaktion reagiert als das bei den entsprechenden WT Tiere der Fall ist.

3.5.4. Analyse der Leber

Da es bei der Adipositas nicht nur zur Fetteinlagerung in den dafür vorgesehenen Fettgeweben kommt, sondern auch in und um andere Organe, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Leber hinsichtlich der Ausbildung einer Fettleber nach HFD Fütterung untersucht.

3.5.4.1. Gewicht

Zunächst wurde nach dem Herauspräparieren die Leber gewogen und optisch begutachtet. Bei der rein optischen äußerlichen Untersuchung konnte schon festgestellt werden, dass die Lebern der SNTA KO Tiere nach HFD eine deutlich schönere rote Farbe hatten (so wie die Tiere, die eine SD bekommen hatten) als die WT Tiere nach HFD, deren Lebern eher hell und bräunlich aussahen, was schon für eine Verfettung sprach. In Abbildung 36 ist das Lebergewicht normalisiert auf das Körpergewicht dargestellt und es fällt auf, dass die Lebern der SNTA KO Mäuse nach HFD deutlich leichter sind als die der entsprechenden WT Tiere.

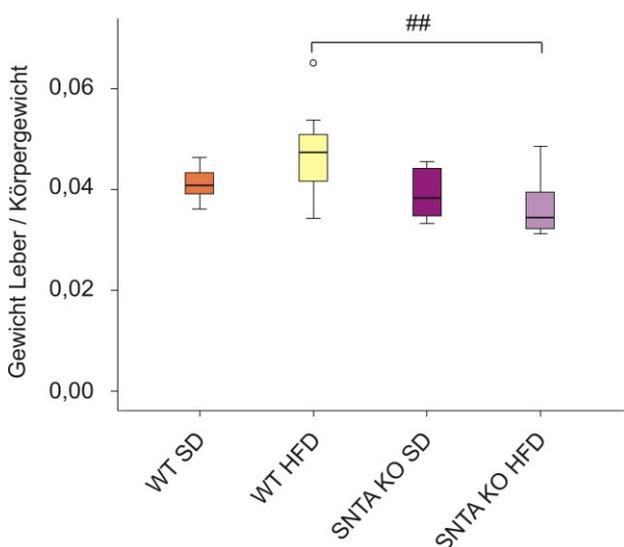


Abb. 36: Gewichte der Leber normalisiert auf das jeweilige Körpergewicht der WT und SNTA KO Mäuse nach HFD bzw. SD. (## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 9 - 12$.

3.5.4.2. Histologie

Histologisch betrachtet bestätigt sich der anfängliche Verdacht, dass sich Fett in die Lebern der WT Tiere nach der Fütterung der HFD eingelagert hat. Dies ist bei den entsprechenden SNTA KO Mäusen nicht der Fall. Das ganze ist sehr schön in den repräsentativen Mikroskop Aufnahmen der H&E gefärbten Leberschnitte in Abbildung 37 zu sehen. Während sich die beiden Genotypen nach Fütterung der SD histologisch nicht unterscheiden, sehen die Lebern der SNTA KO Tiere nach Gabe der HFD genauso aus wie nach SD-Gabe, während bei den WT Tieren die Fetteinlagerung als helle, fast weiße Areale deutlich sichtbar sind.

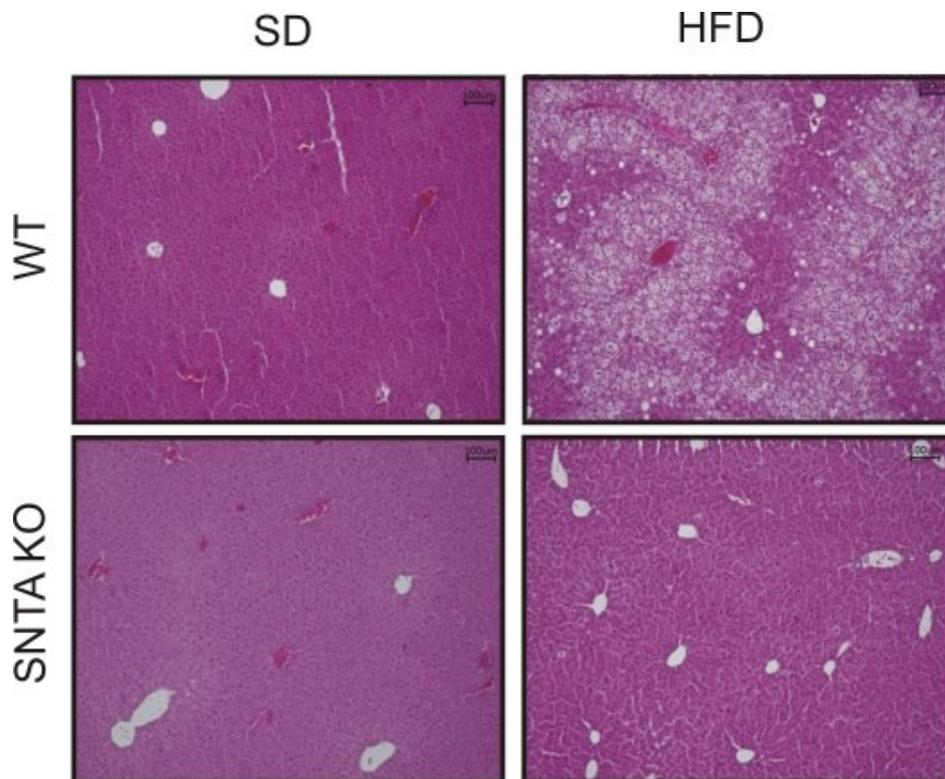


Abb. 37: Repräsentative Fotos der H&E gefärbten Lebern der WT und SNTA KO Mäuse nach HFD bzw. SD.

3.5.4.3. Analysen auf Proteinebene

Nachfolgend wurde die Proteinexpression von AMPK in den SNTA KO und WT Mäusen nach SD und HFD untersucht. Wie in Abbildung 38 zu sehen ist die Proteinexpression von AMPK sowohl nach SD (A) als auch nach HFD (B) Fütterung in den SNTA KO Mäusen unverändert im Vergleich mit den WT Tieren.

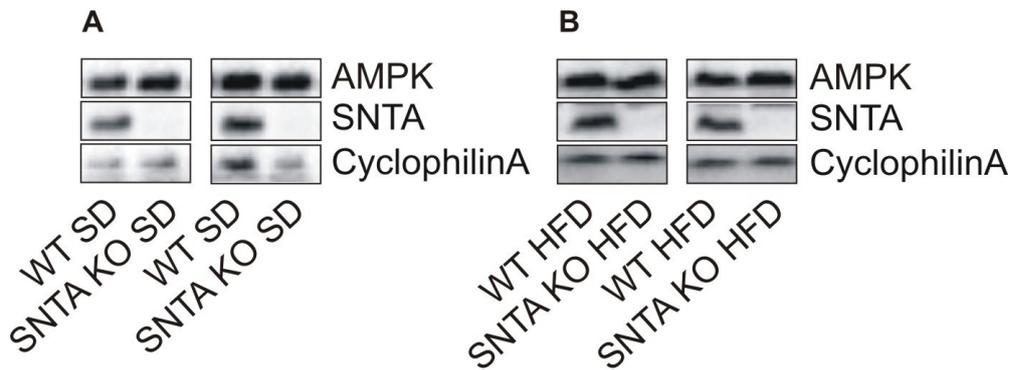


Abb. 38: Immunoblot Analyse von AMPK und SNTA im Lebergewebe von SNTA KO und WT Tieren nach 14 Wochen Standarddiät (A) oder Hochfettdiät (B). Für die Beladungskontrolle wird CyclophilinA verwendet. Tierzahl pro Gruppe n = 6.

Chemerin ist ein Adipokin, das in der Adipositas erhöht im Serum und Fettgewebe vorliegt. Man weiß auch, dass es in der Leber exprimiert wird und in der Nicht alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) induziert wird, allerdings auf mRNA und nicht auf Proteinebene [71]. Da die SNTA KO Mäuse im Gegensatz zu den WT Tieren keinerlei Fett in der Leber einlagern, sollte die Chemerin Proteinexpression in den beiden Genotypen überprüft werden.

Betrachtet man Chemerin in seiner Proteinexpression, ist diese durch den SNTA knock-out unverändert zu den WT Tieren, egal ob diese mit einer SD (Abb. 39 A) oder einer HFD (Abb. 39 B) gefüttert wurden.

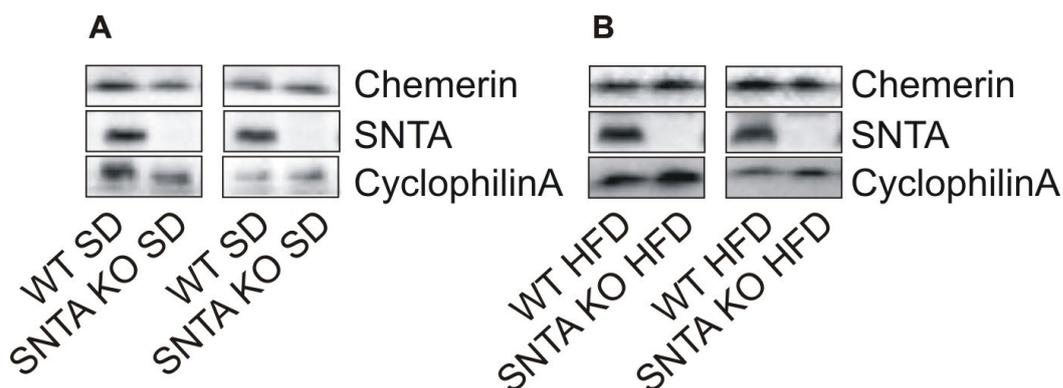


Abb. 39: Immunoblot Analyse von Chemerin und SNTA im Lebergewebe von SNTA KO und WT Tieren nach 14 Wochen Standarddiät (A) oder Hochfettdiät (B). Als Beladungskontrolle dient CyclophilinA. Tierzahl pro Gruppe n = 6.

Im Folgenden wurde die Proteinexpression von FAS und Scavenger- receptor B1 (SR-BI) untersucht. Die Fatty acid synthase (FAS) spielt eine wichtige Rolle in der Synthese langkettiger Fettsäuren. FAS generiert in der Leber Lipide, die zu metabolisch aktiven

Gewebe transportiert werden oder im Fettgewebe eingelagert werden [72]. SR-BI wird hauptsächlich in der Leber und steroidogenen Geweben exprimiert und ist für die Cholesterinaufnahme in die Leber verantwortlich [73]. Auch hier stellt man fest, dass beide Proteine in ihrer Expression durch die SNTA Defizienz nicht verändert werden. Das gilt sowohl für die Tiere, die eine SD (Abb. 40 A) erhalten haben als auch für Tiere auf HFD (Abb. 40 B).

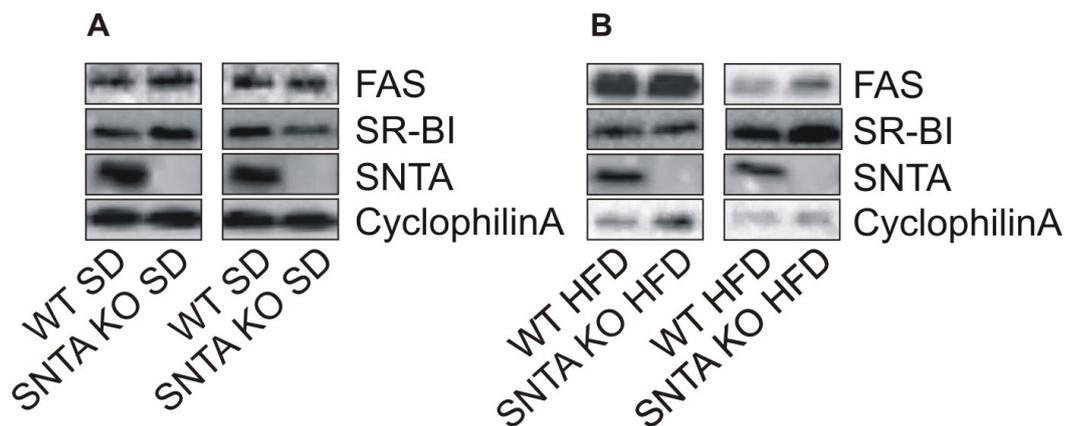


Abb. 40: Immunoblot Analyse von FAS, SR-BI und SNTA im Lebergewebe von SNTA KO und WT Tieren nach 14 wöchiger Standarddiät (A) oder Hochfettdiät (B). Als Beladungskontrolle wird CyclophilinA verwendet. Tierzahl pro Gruppe $n = 6$.

Wie schon im Fettgewebe sollte auch in der Leber die Proteinexpression von SCD1 und Caveolin-1 untersucht werden. Die Immunoblot Analyse ergab eine erhöhte Proteinexpression von SCD1 ($p < 0,01$ nach statistischer Auswertung der Vermessung und Normalisierung des Western Blots auf CyclophilinA). Eine statistisch signifikante Auswertung von Caveolin-1 war wegen geringer Tierzahl und hoher Streuung der Werte nicht möglich. Die entsprechenden Immunoblots der WT und SNTA KO Tiere nach SD Fütterung sind in Abb. 41 A gezeigt und HFD Gabe in Abb. 41 B dargestellt.

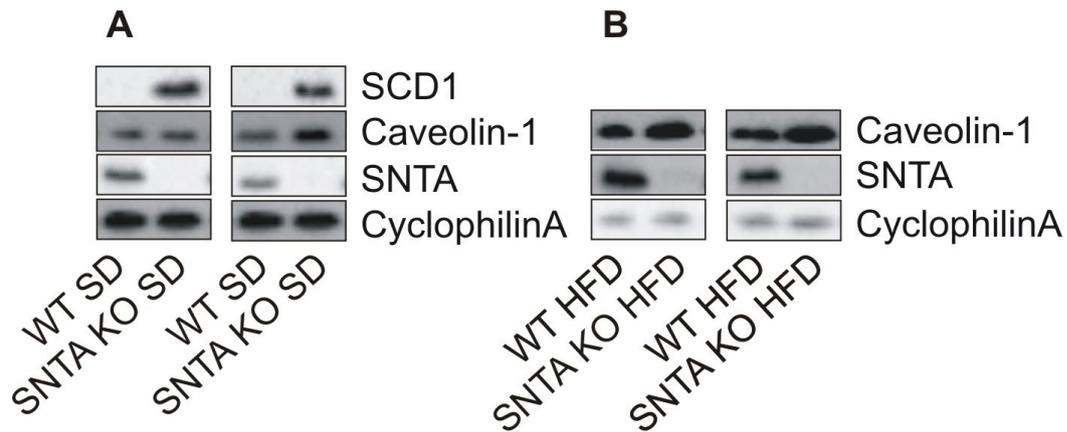


Abb. 41: Immunoblot Analyse von SCD1, Caveolin-1 und SNTA im Lebergewebe von SNTA KO und WT Tieren nach 14 Wochen Standarddiät (A) oder Hochfettdiät (B). CyclophilinA dient als Ladungskontrolle. Tierzahl pro Gruppe n = 4 - 6.

3.5.4.4. Analysen auf RNA-Ebene

Im Folgenden wurden die mRNA Expressionen von Chemerin (Abb. 42 A), Galectin 3 (Abb. 42 B) und Interleukin 8 (CXCL8) (Abb. 42 C) im Lebergewebe der WT und SNTA KO Mäuse sowohl nach SD als auch nach HFD Fütterung untersucht. Chemerin, Galectin 3 und Interleukin 8 sind an der Entzündungsreaktion beteiligt [20, 71, 74]. Man würde erwarten, dass mit zunehmender Verfettung der Leber auch deren Entzündung zunimmt. Diese Vermutung wird auch durch Abbildung 42 bestätigt, da die mRNA Expression der 3 oben genannten Gene in den WT Tieren nach Hochfettdiät erhöht vorliegt im Vergleich zu den WT Tieren nach SD. Dieser Effekt ist bei den SNTA KO Tieren nicht zu beobachten, da deren Lebern nach Fütterung der HFD nicht verfettet waren. Galectin 3 liegt sogar in den SNTA KO Tieren sowohl auf SD als auch auf HFD im Vergleich mit den WT Tieren erniedrigt vor.

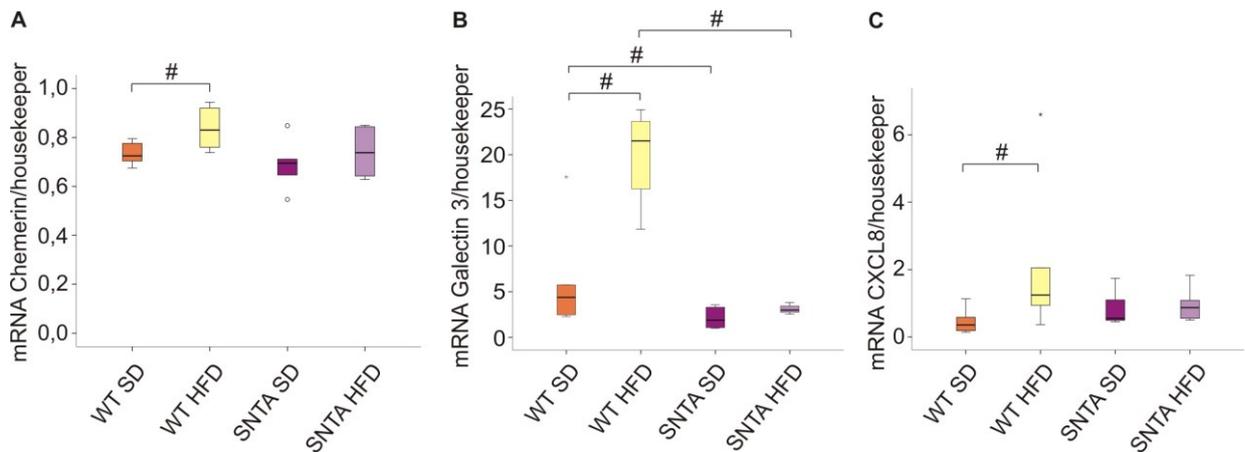


Abb. 42: mRNA Expression von Chemerin (A), Galectin 3 (B) und CXCL8 (C) in der Leber von WT und SNTA KO Tieren sowohl auf Standard als auch auf Hochfettdiät normalisiert auf einen sog. Housekeeper (hier der Mittelwert aus der mRNA Expression von 18S rRNA und GAPDH). (# = $p < 0,05$). Tierzahl pro Gruppe $n = 4 - 6$.

Als nächstes wurde die mRNA Expression von zwei Genen, die an der Gallensäuresynthese beteiligt sind, nämlich die Cholesterin-7- α -hydroxylase (Cyp7a1) und die Sterol-27-hydroxylase (Cyp27a1), untersucht. Aber wie in Abbildung 43 zu sehen ist ergeben sich keine veränderten Regulationen der mRNA Expression der beiden Hydroxylasen, weder auf Grund der verschiedenen Diäten noch auf Grund der verschiedenen Genotypen.

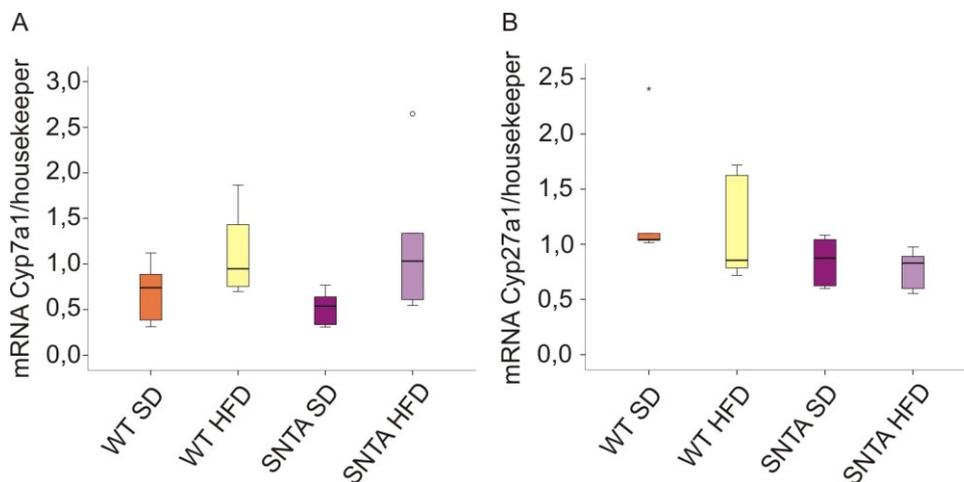


Abb. 43: mRNA Expression von Cyp7a1 (A) und Cyp27a1 (B) in der Leber von WT und SNTA KO Tieren sowohl auf Standard als auch auf Hochfettdiät normalisiert auf einen sog. Housekeeper (hier der Mittelwert aus der mRNA Expression von 18S rRNA und GAPDH). Tierzahl pro Gruppe $n = 6$.

Es wurde auch die mRNA Expression von SCD1 untersucht. Hier konnte, im Gegensatz zu der beobachteten Regulation auf Proteinebene, kein Unterschied zwischen WT und SNTA KO Mäusen festgestellt werden.

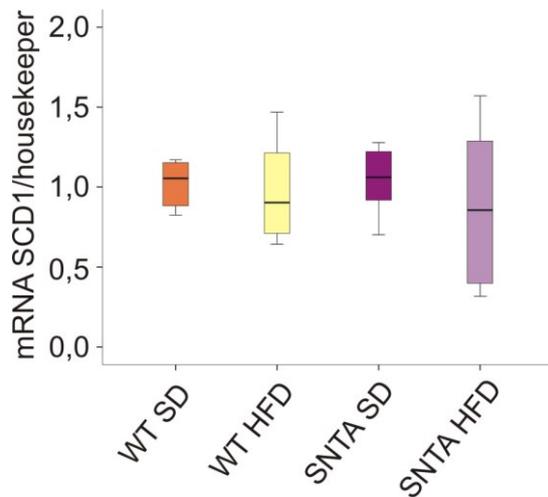


Abb. 44: mRNA Expression von SCD1 in der Leber von WT und SNTA KO Tieren sowohl auf Standard als auch auf Hochfettdiät normalisiert auf einen sog. Housekeeper (hier der Mittelwert aus der mRNA Expression von 18S rRNA und GAPDH). Tierzahl pro Gruppe $n = 6$.

3.5.4.5. Leberlipidom

Wie bereits beim Serumlipidom erwähnt, erfolgte auch die Aufbereitung und die massenspektrometrische Analyse der Lipidspezies der Lebern der über Nacht nüchtern gesetzten WT und SNTA KO Mäuse, sowohl nach SD als auch nach HFD Fütterung, im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin in Kooperation mit Herrn PD Dr. Gerhard Liebisch.

Betrachtet man die Triglyzeride (Abb. 45 A) genauer, stellt man fest, dass diese in den Lebern der WT Tiere nach Hochfettdiät stark erhöht vorliegen im Vergleich zu den WT Tieren nach SD. Dieses Ergebnis ist bei den SNTA KO Mäusen nicht zu sehen. Vielmehr ist die Triglyzeridmenge in den Lebern der SNTA KO Mäusen nach HFD Fütterung signifikant niedriger, als in denen der vergleichbaren WT Tiere. Die Untersuchungen des Phosphatidylcholins (Abb. 45 B), des Ceramids (Abb. 45 E) und des Phosphatidylserins (Abb. 45 H) ergeben eine niedrigere Konzentration nach Fütterung der HFD, allerdings nur bei den WT Tieren. Die PC Menge in den Lebern der SNTA KO Mäuse nach HFD ist erhöht im Vergleich zu den WT Tieren nach HFD. Für die Lysophosphatidylcholinkonzentration (Abb. 45 C) ergeben sich keinerlei Unterschiede. Das Sphingomyelin (Abb. 45 D), das freie Cholesterin (Abb. 45 F) und das Phosphatidylethanolamin (Abb. 45 I) liegen in den STNA KO Mäusen nach HFD Fütterung in den Lebern in erhöhter Konzentration vor, vergleicht man diese mit den WT Tieren nach

HFD Gabe. Sphingomyelin, freies Cholesterin und Phosphatidylethanolamin liegen nach HFD Gabe in den Lebern der SNTA KO Mäuse erhöht vor verglichen mit den WT Mäusen nach HFD Fütterung, während die Cholesterinester (Abb. 45 G) in den Lebern der SNTA KO Mäuse nach HFD Fütterung in niedrigerer Konzentration vorliegen als in den WT Tieren nach HFD Fütterung. Betrachtet man die Phosphatidylethanolamin basierten Plasmalogene (Abb. 45 J), liegen diese nur in den WT Mäusen nach HFD Fütterung verglichen mit den SD gefütterten WT Mäusen in erhöhter Konzentration vor, was bei den SNTA KO Mäusen nicht zu beobachten ist.

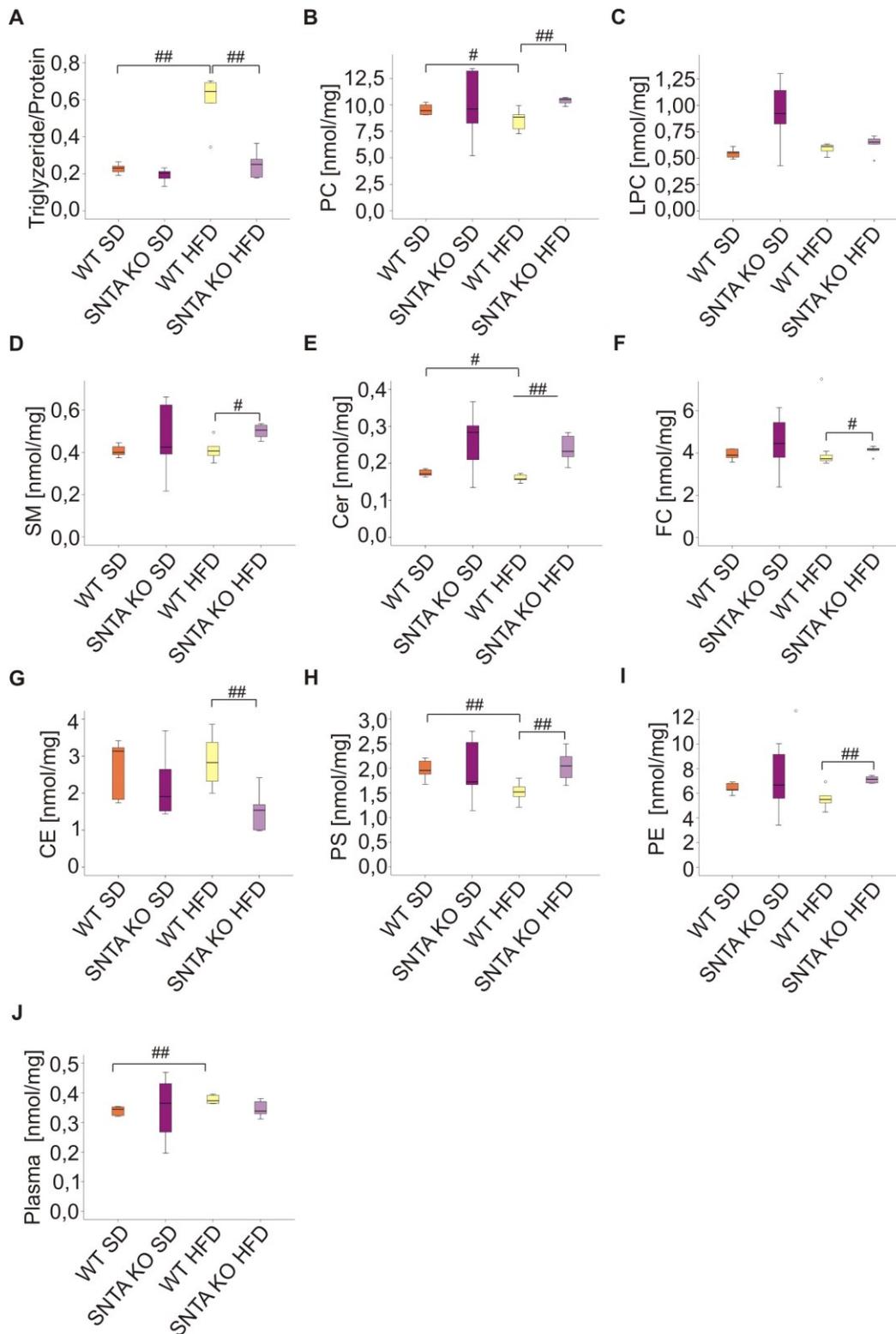


Abb. 45: Leberlipidom der über Nacht nüchtern gesetzten WT und SNTA KO Mäuse nach 14 Wochen SD oder HFD Fütterung. Hierbei wurden Triglyzeride (A), Phosphatidylcholin (B), Lysophosphatidylcholin (C), Sphingomyelin (D), Ceramid (E), freies Cholesterin (F), Cholesterinester (G), Phosphatidylserin (PS) (H), Phosphatidylethanolamin (PE) (I) und PE-basierte Plasmalogene (Plasma) (J) bestimmt. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5 - 6$.

3.6. SNTA in der Adipositas

Da durch das Fehlen von SNTA Veränderungen im Lipidmetabolismus und in der Lipidspeicherung auftreten, sollte nun die Expression von SNTA sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Ebene im genetischen Adipositasmodell der Leptin defizienten ob/ob Mäuse untersucht werden.

3.6.1. SNTA und SCD1 im Fettgewebe von ob/ob Mäusen

Untersucht man die Expression von SNTA in ob/ob Mäusen auf Proteinebene via Immunoblot, ergibt sich für das epididymale Fettgewebe kein Unterschied zwischen den ob/ob und WT Mäusen (Abb 46 A und B).

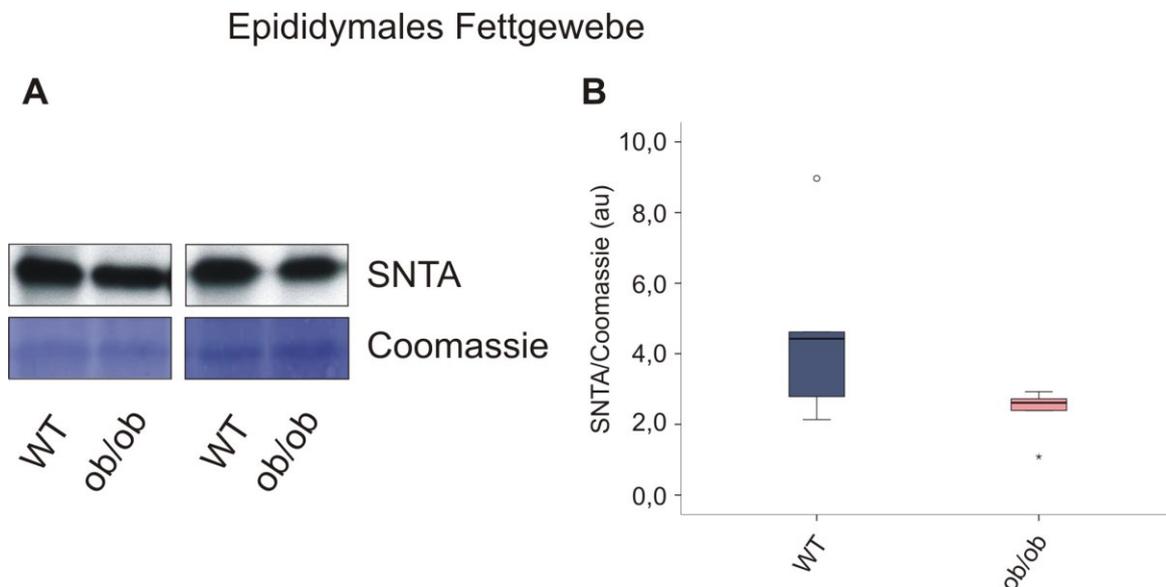


Abb. 46: Western Blot Analyse von SNTA im epididymalen Fettgewebe von WT und ob/ob Mäusen. (A) Repräsentative Ausschnitte aus dem Immunoblot und dessen Vermessung (B), wobei die Coomassie-Färbung der Membran als Housekeeper dient. Tierzahl pro Gruppe $n = 5$.

Führt man dieselbe Untersuchung im subkutanen Fettgewebe durch, erkennt man eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression von SNTA in den ob/ob Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren, wobei die bildliche Immunoblotdarstellung (Abb. 47 A) durch deren statistische Auswertung (Abb. 47 B) bestätigt wird.

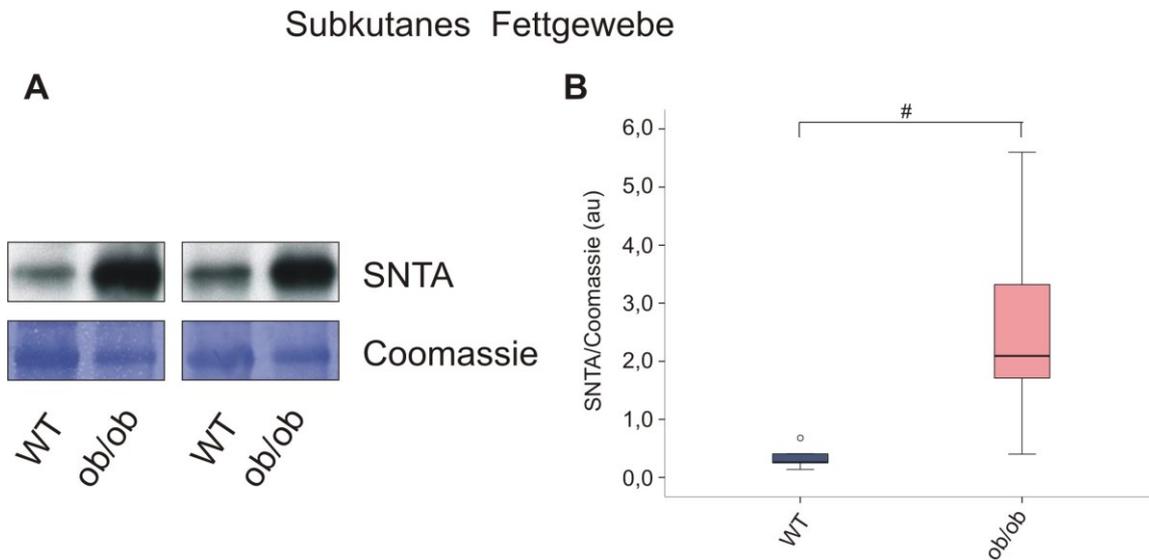


Abb. 47: Western Blot Analyse von SNTA im subkutanen Fettgewebe von WT und ob/ob Mäusen. (A) Repräsentative Ausschnitte aus dem Immunoblot und dessen Vermessung (B), wobei die Coomassie-Färbung der Membran als Housekeeper dient. (# = $p < 0,05$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5$.

Betrachtet man nun aber die mRNA Expression von SNTA, ist diese in den ob/ob Mäusen sowohl im epididymalen (Abb. 48 A), als auch im subkutanen Fettgewebe (Abb. 48 B) erhöht.

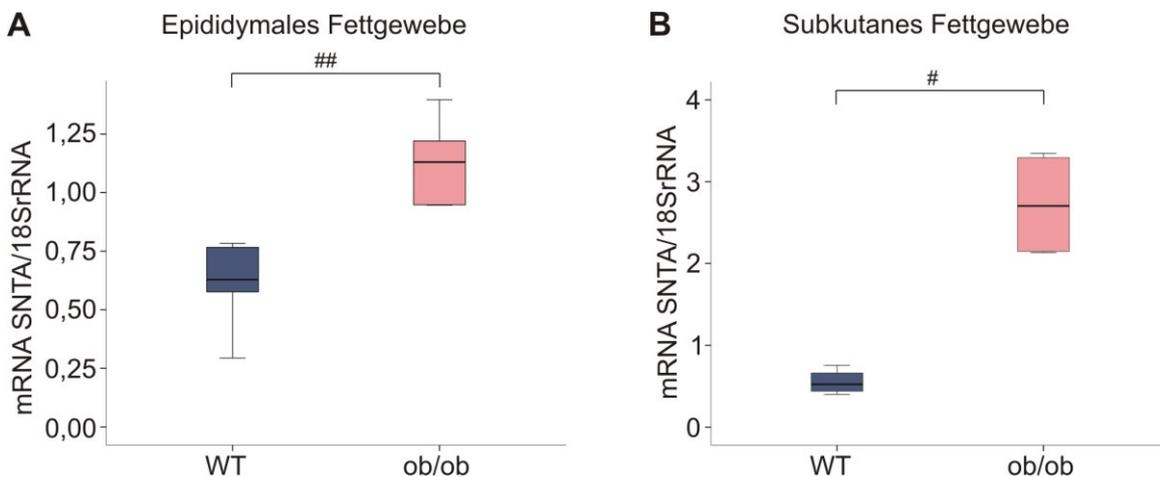


Abb. 48: mRNA Expression von SNTA im epididymalen (A) und subkutanen Fettgewebe (B) von WT und ob/ob Mäusen normalisiert auf die mRNA Expression der 18S rRNA. (# = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5$.

Die SCD1 mRNA Expression weist hingegen keine Veränderung durch die Adipositas auf, wenn man WT und ob/ob Mäuse vergleicht. Dies gilt sowohl für das epididymale (Abb. 49 A) als auch für das subkutane Fettgewebe (Abb. 49 B).

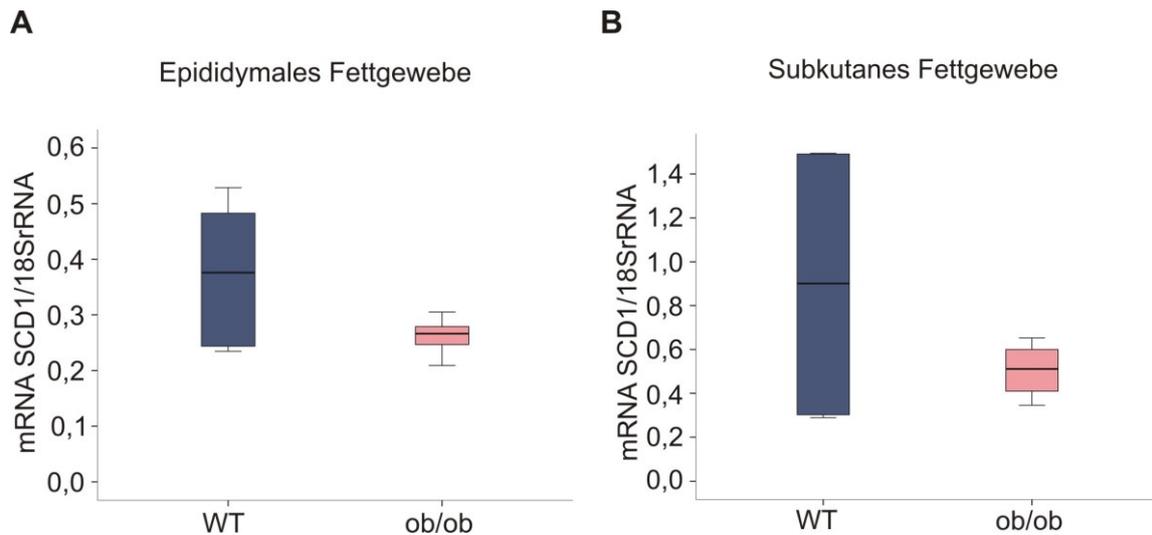


Abb. 49: mRNA Expression von SCD1 im epididymalen (A) und subkutanen Fettgewebe (B) von WT und ob/ob Mäusen normalisiert auf die mRNA Expression der 18S rRNA. Tierzahl pro Gruppe n = 5.

3.6.2. SNTA und SCD1 in der Leber von ob/ob Mäusen

Untersucht man die Auswirkung der genetisch bedingten Adipositas auf die Leber und dort auf die Proteinexpression von SNTA und SCD1, stellt man fest, dass diese in der Leber der ob/ob Mäuse keinen Einfluss auf die Expression von SNTA hat aber eine erhöhte Expression von SCD1 zur Folge hat. Das wird bildlich durch die Ausschnitte aus dem Immunoblot (Abb. 50 A) und statistisch durch dessen Vermessung (Abb. 50 B und C) verdeutlicht.

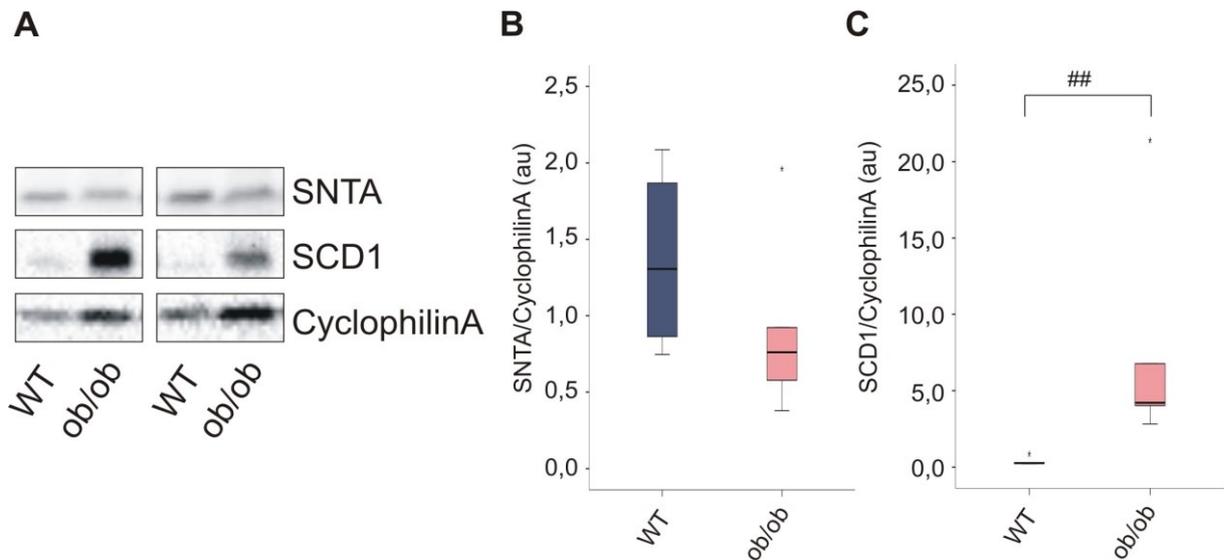


Abb.50: Western Blot Analyse von SNTA und SCD1 im Lebergewebe von WT und ob/ob Mäusen. (A) Repräsentative Ausschnitte aus dem Immunoblot und die Vermessung des Immunoblots (B und C), wobei CyclophilinA als Ladungskontrolle fungiert. (## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5$.

Dieses Ergebnis wird auch auf mRNA Ebene bestätigt. Die mRNA Expression von SCD1 ist im Lebergewebe der ob/ob Mäuse im Vergleich mit den WT Tieren signifikant erhöht (Abb. 51 B), während sich die ob/ob Mäuse in ihrer SNTA mRNA Expression nicht von den WT Tieren unterscheiden (Abb. 51 A).

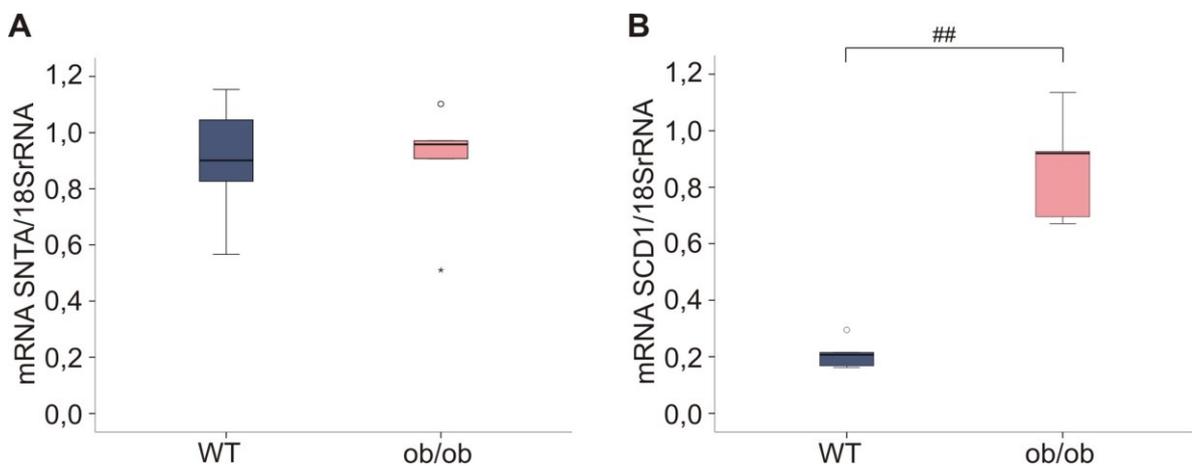


Abb. 51: mRNA Expression von SNTA (A) und SCD1 (B) normalisiert auf 18S rRNA im Lebergewebe von WT und ob/ob Mäusen. (## = $p < 0,01$). Tierzahl pro Gruppe $n = 5$.

4. Diskussion

4.1. Die Rolle von SNTA für die Funktionalität von Adipozyten

Spätestens seit der Entdeckung von Leptin, welches primär von Adipozyten freigesetzt wird und die Nahrungsaufnahme kontrolliert, weiß man, dass die Adipozyten eine zentrale Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen haben [75]. Das Fettgewebe besteht neben den Adipozyten auch aus der stroma-vaskulären Fraktion, welche Präadipozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten beinhaltet. Die Präadipozyten stammen von multipotenten mesenchymalen Stammzellen ab, die dafür sorgen, dass für die Dauer des ganzen Lebens Fettzellen gebildet werden können. Steht dem Körper überschüssige Energie zur Verfügung, wird diese in den Adipozyten als Triglyzeride gespeichert. Dazu wird das Volumen der vorhandenen Adipozyten vergrößert (Hypertrophie) und / oder neue, zusätzliche Adipozyten gebildet (Hyperplasie) [9, 76]. Die Hypertrophie hat oft eine erhöhte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zur Folge, durch die Immunzellen in das WAT rekrutiert werden und eine leichte chronische Entzündung verursachen [9]. Welche metabolischen Auswirkungen mit der Adipositas einhergehen ist jedoch nicht nur durch die Größe und Zusammensetzung des Fettgewebes bestimmt. Hier spielen nach neueren Untersuchungen Proteine der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle. So geht die „gesunde Adipositas“ mit einem adäquaten Remodeling der extrazellulären Matrix einher, während bei der mit metabolischen Erkrankungen assoziierten Fettleibigkeit eine WAT Fibrose beobachtet wird [77]. Diese und weitere Ergebnisse zeigen, dass strukturelle Proteine des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix die Funktion von Adipozyten bestimmen und möglicherweise neue Ansatzpunkte für Therapien sind. Für PPARgamma Agonisten wurde gezeigt, dass diese bestimmte Komponenten der extrazellulären Matrix verändern und dadurch eventuell eine Expansion der Adipozyten ohne fibrotische und entzündliche Veränderungen ermöglichen [78, 79].

SNTA ist ein Adapterprotein welches über Utrophin / Dystrophin mit dem Actinzytoskelett verbunden ist. Des Weiteren stellt es eine Verbindung des Zellinneren mit Proteinen der extrazellulären Matrix her. Es ist auch bekannt, dass SNTA die Proliferation reguliert [44]. Da eigene Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass SNTA im Fettgewebe und Adipozyten exprimiert ist war es Ziel dieser Arbeit die Rolle von SNTA in Adipozyten zu klären. Da weltweit der Anteil an übergewichtigen / adipösen Personen ansteigt [80] und erfahrungsgemäß eine längerfristige Gewichtsreduktion nicht realistisch ist müssen andere

Strategien entwickelt werden um metabolische Erkrankungen zu behandeln. Eine Möglichkeit ist alle an der Adipogenese beteiligten Prozesse im Detail zu klären um hier neue therapeutische Ansätze zu finden, die eine gesunde Expansion der Adipozyten bzw. die Rekrutierung neuer Adipozyten ermöglichen. In dieser Arbeit konnten *in vitro* Daten zeigen, dass der knock-down von SNTA in den teilungsfähigen 3T3-L1 Präadipozyten eine erhöhte Proliferation zur Folge hat. Differenziert man diese Zellen zu reifen Adipozyten bilden sich viele kleine Fetttropfen aus; sehr große Lipidtropfen, wie man sie in den Kontrollen sieht, werden nicht gebildet. Die Messung der Triglyzeride im Zelllysate zeigt eine verminderte Menge in den Adipozyten mit SNTA knock-down.

In vivo besteht ein weißer Adipozyt vor allem aus einem einzigen Fetttropfen, so dass die Größe der Lipidvakuole die Größe der Zelle vorgibt. Aufgrund der *in-vitro* Ergebnisse könnte man erwarten, dass die SNTA knock-out Mäuse mehr und kleinere Adipozyten ausbilden.

Für das epididymale Fettgewebe trifft dies auch zu. Dieses Fettdepot ist nach Fütterung der Hochfettdiät in den SNTA defizienten Mäusen genauso schwer wie in den WT Tieren. Die Anzahl kleiner Fettzellen ist erhöht wobei sich große Adipozyten weniger häufig finden. Auch nach Fütterung der SD liegen im epididymalen WAT der knock-out Mäuse vermehrt kleine Adipozyten vor. Entsprechend ist die Zellzahl im epididymalen Fettgewebe in den SNTA knock-out Mäusen signifikant höher als in den WT Mäusen. Da die Zellzahl pro Fläche in der HFD im Vergleich zur SD sowohl bei den WT als auch bei den SNTA defizienten Mäusen um ca. 50 % abnimmt wird in beiden Genotypen die vermehrte Ablagerung von Triglyzeriden über eine Zunahme des Volumens erzielt.

Im subkutanen WAT stellt sich der Fall anders dar; dieses Fettdepot hat sowohl nach SD als auch nach HFD Fütterung in den SNTA defizienten Mäusen ein geringeres Gewicht im Vergleich zu den WT Tieren, unterscheidet sich aber nur nach HFD Fütterung in seiner Zellzahl und in der Adipozytenverteilung vom WT. Nach HFD Fütterung ist die Zellzahl in den SNTA knock-out Mäusen erhöht. Es finden sich vor allem kleine Adipozyten, wohingegen große Zellen kaum vorhanden sind. Das ist insofern erstaunlich, da die Arbeitsgruppe um Prof. Scherer davon ausgeht, dass das subkutane WAT nur durch Hypertrophie und nicht durch Hyperplasie expandiert. Daher bewirkt das Fehlen von SNTA im subkutanen Fett eine verringerte Hypertrophie. Die Zellzahl pro Fläche in der HFD im Vergleich zur SD verringert sich im WT um ca. 50 %, bei den SNTA defizienten Mäusen um ca. 25 %.

Weiterhin wurde in den 3T3-L1 Adipozyten festgestellt, dass die kleineren Lipidtropfen weder durch eine Störung des Insulinsignalweges, noch durch eine erhöhte Lipasenaktivität

(basal und induziert) verursacht werden. Auf Proteinebene konnte nur eine Verringerung der SCD1 Expression nachgewiesen werden, was eventuell die erniedrigten Triglyzeridkonzentration, nicht aber die gleichbleibenden Cholesterinspiegel, erklärt. Auch konnte in den Mäusen als Ursache für die kleinere Adipozytengröße eine erhöhte Lipaseaktivität (HSL, ATGL) ausgeschlossen werden. So ist die HSL im epididymalen Fettgewebe auf SD tendenziell eher verringert. Die Triglyzeride sind im Serum der gefasteten Mäuse ebenfalls nicht verändert.

Allerdings konnte in den SNTA knock-out Mäusen eine Veränderung in der SCD1 Proteinexpression festgestellt werden. Die verminderte bzw. der Trend zur verminderten SCD1 Proteinexpression in den intraabdominalen Fettgeweben und die unveränderte SCD1 Proteinexpression im subkutanen Fettgewebe der SNTA knock-out Mäuse könnte durch die unterschiedliche Entwicklung der Fettgewebe im Organismus und / oder die verminderte Ausprägung des subkutanen Fettdepots in den SNTA knock-out Mäusen erklärt werden. Garcia-Serrano et al. konnten zeigen, dass sich die Protein- und die mRNA-Expression von SCD1 in gesunden Probanden und morbid adipösen Patienten im viszeralen Fettgewebe vom subkutanen Fettgewebe unterscheidet. Im viszeralen WAT ist die Expression höher als im subkutanen Fettgewebe. In den morbid adipösen Patienten war die SCD1 mRNA Expression in beiden Fettdepots verringert, während die Proteinexpression erhöht war. Garcia-Serrano et al. postulieren weiter, dass SCD1 in den beiden Fettgeweben unterschiedlich reguliert wird und, dass die Proteinmenge nicht von der mRNA Menge sondern auch von der Stabilität des Proteins abhängt [42]. Daher könnten Fettdepot spezifische Eigenschaften die unterschiedlichen Auswirkungen der SNTA Defizienz für die Expression der SCD1 erklären. Wie bereits erwähnt, ist das Fettgewebe ein endokrines Organ, das verschiedene Adipokine freisetzt. In schlanken Individuen sezerniert das WAT vor allem anti-inflammatorische Adipokine wie Adiponektin, TGF β (transforming growth factor beta), die Interleukine IL-10, IL-4 und IL-13, IL-1Ra (IL-1 receptor agonist) und APERLIN. In adipösen Patienten verändert sich das Sekretionsmuster und es werden hauptsächlich pro-inflammatorische Faktoren wie TNF α (tumor necrosis factor alpha), IL-6, Leptin, Resistin, Visfatin, Angiotensin II, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) und PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) freigesetzt [8]. MCP-1 rekrutiert mehr Makrophagen in das Fettgewebe was dazu beiträgt, den Entzündungsstatus des WATs zu erhöhen. Trotz der mangelnden Fähigkeit der SNTA knock-out Mäuse hypertrophe Adipozyten auszubilden, ist der in der Gewebekultur induzierte Entzündungsstatus nach Fütterung der SD im epididymalen Fettgewebe gleich dem der WT

Mäuse und im subkutanen Fettgewebe reagieren die SNTA KO Mäuse nach Gabe der SD auf die induzierte Entzündungsreaktion mit einer höheren IL-6 Ausschüttung. Nach HFD Fütterung hingegen reagieren die SNTA KO Mäuse sowohl im epididymalen als auch im subkutanen Fettgewebe auf dieselbe Induktion schwächer als die WT Tiere. Die schwächere Reaktion nach Fütterung der HFD in den SNTA knock-out Mäusen lässt sich z.T. auf die nicht vorhanden hypertrophen Adipozyten zurückführen, welche entweder selbst diese pro-inflammatorischen Zytokine sezernieren oder deren Freisetzung in Immunzellen fördern.

Betrachtet man die SNTA knock-out Mäuse insgesamt, nehmen diese wie die WT Tiere nach Fütterung der HFD im Vergleich zu den mit SD gefütterten Tieren signifikant an Gewicht zu. Es besteht kein Gewichtsunterschied zwischen den beiden Genotypen, weder nach 14 wöchiger SD noch nach HFD Fütterung. Auch ist die Futterraufnahme in allen Gruppen die gleiche. Allerdings wird nach Herbeiführen einer Diät induzierten Adipositas bei den SNTA knock-out Tieren weniger Fett im subkutanen und im perirenal Fettgewebe eingelagert. Die Untersuchung des Adipositasmarkers Chemerin, das hauptsächlich in Adipozyten gebildet und von diesen sezerniert wird und in adipösen Individuen im Serum erhöht vorliegt im Vergleich zu normalgewichtigen Personen [81], zeigt, dass in den WT Tieren nach HFD Fütterung das Serumchemerin stark erhöht vorliegt, was bei den SNTA knock-out Mäusen nicht der Fall ist. Dieser niedrigere Chemerinspiegel könnte durch die geringere Größe der Fettdepots und die kleineren Adipozyten erklärt werden.

Die verringerte Speicherung der Triglyzeride im Fettgewebe könnte folgende Ursachen haben: 1) Die Knock-out Tiere haben einen erhöhten Grundumsatz bzw. bewegen sich mehr. Leider konnten wir diese Messungen auf Grund fehlender Ausstattung nicht durchführen. Bisher wurde auch jedoch keine veränderte physische Aktivität der SNTA KO Mäuse beschrieben [45]. 2) Das Fett wird in anderen Geweben abgelagert. Dies kann zumindest für die Leber ausgeschlossen werden. Hier wird auf HFD sogar weniger Fett eingelagert als in den WT Tieren.

Die Analyse des Serumlipidoms ergibt, dass beide Genotypen nach HFD Fütterung lediglich eine Hypercholesterinämie ausbilden. Dieser Effekt ist bei den Knock-out Tieren signifikant, wobei in den WT Mäusen ein Trend zu erkennen ist. Eine Hypertriglyzeridämie entwickelt sich nicht. Nach Fütterung der SD steigen sowohl das Cholesterin als auch die Triglyzeride postprandial an. Dieser Effekt besteht nach der HFD Fütterung nicht mehr. Parameter wie freies Cholesterin, Cholesterinester und Phosphatidylinositol liegen zwar in den SNTA knock-out Mäusen auf HFD im Vergleich zu diesen Mäusen auf SD erhöht vor, weisen aber keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit dem WT auf. Das Phosphatidylcholin

bleibt gänzlich unverändert, sowohl zwischen den Diäten als auch zwischen den Genotypen. Sphingomyelin steigt nach Fütterung der HFD in beiden Genotypen gleichermaßen an, was an der bereits an HFD gefütterten Mäusen gezeigten Erhöhung von Sphingomyelin 18:0 und 18:1 liegen könnte [25]. Der einzige Unterschied zeigt sich im niedrigeren Lysophosphatidylcholinpiegel der SNTA knock-out Mäuse nach SD Fütterung im Vergleich zum WT, wobei nach HFD Fütterung dieser Unterschied verschwindet. Diese Daten des Serumlipidoms weisen darauf hin, dass die SNTA knock-out Mäuse keine beeindruckenden Veränderungen zeigen. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob kleine Unterschiede in den Konzentrationen verschiedener Fette wie Lysophosphatidylcholin physiologisch relevant sind.

Betrachtet man die Serumparameter des Glukosemetabolismus bilden beide Genotypen in der induzierten Adipositas die erwartete Hyperglykämie aus. Aber nur in den WT Mäusen steigt auch gleichzeitig die Proinsulinproduktion an und es zeigt sich ein Trend zur erhöhten Insulinproduktion, der wegen der großen Streuung der Daten nicht signifikant wird. Somit scheinen die SNTA knock-out Mäuse vor einer Überbeanspruchung der pankreatischen beta-Zellen trotz Hyperglykämie geschützt zu sein, da die dauerhaft erhöhte Insulinproduktion ausbleibt. Die postprandialen Untersuchungen zeigen, dass nach SD Fütterung bei beiden Genotypen wie erwartet der Glukose-, der Proinsulin- und der Insulinpiegel ansteigt. Nach HFD Fütterung steigt auch bei beiden Genotypen der Proinsulin- und der Insulinpiegel postprandial an. Allerdings liegt nur bei den SNTA knock-out Mäusen der Glukosespiegel postprandial signifikant erhöht vor, was sich aber durch die größere Streuung der Messwerte in den WT Tieren erklärt.

4.2. Mögliche Interaktion von SNTA und SCD1

Stearoyl Coenzym A Desaturase 1 (SCD1) ist ein Enzym im endoplasmatischen Reticulum und katalysiert die endogene Biosynthese von MUFAs aus *de novo* synthetisierten oder mit der Nahrung aufgenommenen SFAs [82, 83]. Die bevorzugten Substrate der SCD1 sind Palmitinsäure und Stearinsäure. Der erhöhte Konsum von SFA reichen Nahrungsmitteln ist mittlerweile charakteristisch für die westliche Ernährungsweise und ist assoziiert mit einem dramatischen Anstieg von kardiovaskulären Erkrankungen und Adipositas [83]. Der Promotor der SCD1 beinhaltet mehrere putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression der SCD1 sowohl negativ als auch positiv regulieren. Die SCD1 ist im weißen und braunen Fettgewebe von Mäusen auf SD bereits sehr hoch exprimiert. Die mRNA steigt

in der Leber, im Herzen und im Muskel nach einer Kohlenhydrat reichen Diät drastisch an. Zusätzlich können Diäten, die reich an SFAs oder MUFAs sind, die SCD1 Expression erhöhen, wenn auch zu einem geringeren Ausmaß als die lipogene Diät. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die SCD1 Expression durch SREBP1 via dem SRE Element im Promotor induziert wird. Die Aktivierung von LXR (evtl. zusammen mit SREBP1c) und PPARs, die wiederum mit LXR interagieren, regulieren die SCD1 Expression. Sun et al. konnten außerdem zeigen, dass die SCD1 den ABCA1 gesteuerten Cholesterin-Efflux inhibiert, die Membranorganisation verändert und einen spezifischen Pool an Membrancholesterinen vermindert [84]. Die in-vivo Bedeutung der SCD1 ist jedoch nicht geklärt, da verschiedene SCD1 knock-out Tiermodelle (Ganzkörper, Leber spezifischer, Fettgewebe spezifischer knock-out) diskrepante Aussagen lieferten.

Das Fehlen von SNTA bewirkt zumindest in-vitro eine verminderte SCD1 Expression der reifen Adipozyten. Dies zeigt sich in-vivo nur im epididymalen Fett der mit SD ernährten Mäuse. In den anderen Fettgeweben zeigt sich bestenfalls ein Trend. In der Leber ist die SCD1 sogar erhöht. Welche Mechanismen nun die differentielle Expression der SCD1 in den verschiedenen Geweben bewirken ist unklar. Zumindest ist eine direkte Interaktion von SNTA und SCD1 auszuschließen, da sich letzteres im ER und ersteres im Zytoplasma befindet.

4.3. Die Rolle von SNTA in der hepatischen Lipidspeicherung

Eine Fettleber ist durch eine vermehrte Speicherung von Triglyzeriden in den Hepatozyten charakterisiert, die in Fetttropfen gespeichert werden. Veränderungen in einigen der Hauptlipidklassen wurden in der steatotischen Leber bereits beschrieben. Die Histologie und das erhöhte Gewicht der Leber zeigte, wie zu erwarten war, eine Verfettung der Leber nach 14 wöchiger HFD, allerdings nur in den WT und nicht in den SNTA KO Tieren. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die erhöhten hepatischen Triglyzeride in den WT Tieren, während diese in SNTA KO Mäusen nach der HFD nicht erhöht vorliegen, sondern auf dem Level der SD gefütterten Tiere bleiben [85]. Das freie Cholesterin und die Gesamt-Cholesterinester sind nicht erhöht, was mit den bereits publizierten Daten von Puri et al. übereinstimmt, in denen die Lipidzusammensetzung von humanen Fettlebern untersucht wurde [31, 85]. Allerdings weisen die SNTA KO Mäuse nach HFD Fütterung erhöhtes freies Cholesterin und erniedrigte Cholesterinester im Vergleich zu den WT Mäusen auf HFD auf. Dies zeigt, dass die hepatische Veresterung von Cholesterin über die ACAT (Cholesteryl acyltransferase) gestört ist. Eines der zentralen Proteine des HDL-Metabolismus, SR-BI, ist unverändert. SR-BI

vermittelt die Aufnahme von HDL-Cholesterin in die Leber [73]. Ist dessen Funktion gestört, zeigt sich ein erhöhtes Serumcholesterin, ein vermindertes hepatisches Cholesterin und eine gestörte Synthese von Gallensäuren. Da alle diese Parameter in den SNTA defizienten Mäusen normal sind scheint die SR-BI Aktivität nicht beeinträchtigt zu sein.

Des Weiteren wurden in den Fettlebern der WT Mäuse verringerte Phosphatidylcholin Level ermittelt. Dies findet sich auch in humanen steatotischen Lebern. Phosphatidylethanolamin N-methyltransferase (PEMT) katalysiert die Methylierung von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin. Da Phosphatidylethanolamin tendenziell eher verringert ist und in der humanen Fettleber sogar signifikant erniedrigt ist scheint die Aktivität der PEMT das erniedrigte PC nicht zu erklären [86]. Die Lysophosphatidylkonzentrationen sind nicht erhöht, was gegen eine vermehrte Umwandlung von Phosphatidylcholin durch Phospholipase A2 spricht. Das deutet darauf hin, dass die Phosphatidylcholin Synthese aus Cholin, der Hauptquelle für hepatisches Phosphatidylcholin, gestört ist. Ether-gekoppelte Lipide, die den Einbau von Cholin in Glycerophospholide inhibieren, und Plasmalogene sind in der Fettleber der WT Tiere erhöht und limitieren möglicherweise die Phosphatidylcholinsynthese [86], während das bei den SNTA KO Mäusen nicht der Fall ist. Erhöhte hepatische Level von Ether-gekoppeltem Phosphatidylcholin stammen möglicherweise aus der vermehrten Synthese oder der beeinträchtigten hepatischen Freisetzung in die Zirkulation, was zu den verminderten Serumspiegeln in der Adipositas passt [86]. Niedriges hepatisches Phosphatidylcholin beeinträchtigt die Freisetzung von VLDL und unterstützt die Lebersteatose. Phosphatidylserin Synthase 1 und 2 katalysieren die Bildung von Phosphatidylserin aus Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin. Phosphatidylserin liegt in den Fettlebern der Wildtyp Tiere reduziert vor, was auf die SNTA KO Mäuse nicht zutrifft; beides stimmt aber mit den bereits erwähnten Ergebnissen zu den Ausgangsstoffen überein. Phosphatidylserin ist in der humanen Fettleber unverändert und weitere Studien müssten zeigen, ob ein niedriger Phosphatidylserin Spiegel nur charakteristisch für die Fettleber beim Nager ist [86].

Diese mit der Verfettung der Leber assoziierten Lipidveränderungen finden sich in den SNTA KO Mäusen auf HFD nicht. Somit ist sowohl Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin als auch Phosphatidylethanolamin in den Lebern der SNTA KO Mäuse nach HFD Gabe im Vergleich zu den WT Tieren erhöht.

Sphingomyelin und Ceramid sind in der steatotischen Leber unverändert. In der Literatur findet man sowohl erniedrigte als auch erhöhte Ceramid Spiegel in der Leber von Nagern, die mit einer HFD gefüttert wurden. Diese inkonsistenten Daten schließen letztendlich eine

Assoziation zwischen der hepatischen Triglyzerid Akkumulation und erhöhten Ceramid Spiegeln aus [85]. Erstaunlicherweise ist Sphingomyelin und Ceramid in der nicht steatotischen Leber der SNTA Mäuse nach HFD Fütterung im Vergleich zu den WT Tieren auf HFD erhöht. Dies zeigt, dass der Metabolismus dieser Lipide in den SNTA Mäusen verändert ist. Im Serum ist keines dieser Lipide im Vergleich zu den WT Tieren verändert, so dass wahrscheinlich die Synthese oder der Abbau in der Leber verändert ist.

Da sich aus der NAFLD eine NASH entwickeln kann, die wiederum durch eine chronische Entzündung charakterisiert ist [20], wurden in den Mäusen auch Entzündungsmarker wie Chemerin [71], Galectin 3 [87] und CXCL8 [74] untersucht, welche in ihrer mRNA Expression in den WT Tieren nach HFD Fütterung erhöht vorlagen. Dies ist bei den SNTA KO Mäusen nicht der Fall.

Die Ergebnisse bzgl. des Leberlipidoms, der histologischen Schnitte und der Entzündungsmarker lassen darauf schließen, dass die SNTA KO Mäuse vor einer HFD induzierten NAFLD geschützt sind. Die Proteinexpression von FAS, die Lipide in der Leber generiert, welche zu metabolisch aktiven Geweben transportiert oder im Fettgewebe eingelagert werden [72], noch die von SR-BI, der hauptsächlich in der Leber exprimiert wird und für die Cholesterinaufnahme in die Leber verantwortlich ist [73], ist nicht verändert. Unverändert liegen auch Caveolin-1, das Hauptbestandteil der sogenannten Caveolae ist und Hetero- und Homooligomere bildet, die mit Cholesterin und anderen Lipiden interagieren [70], und AMPK, die sowohl im Lipid- als auch im Glukosestoffwechsel involviert ist und z.B. durch Umweltstress oder körperliche Aktivität aktiviert wird [88], in ihrer Proteinexpression vor. Es kann somit eine verringerte Fettsäuresynthese, eine verringerte Cholesterinaufnahme und ein erhöhter Grundumsatz als Ursache für die Nichteinlagerung diätischer Lipide weitgehend ausgeschlossen werden. Auch die für die Gallensäurebildung wichtigen Enzyme Cyp7a1 und Cyp27a1 zeigen keinen Unterschied in ihrer mRNA Expression, wodurch auch eine mögliche erhöhte Ausscheidung von Cholesterin über die Galle entfällt. Einzig die SCD1, welche die Synthese von einfach ungesättigten Fettsäuren katalysiert und durch Glukose, Fruktose, gesättigte Fettsäuren, Insulin und die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c und LXR induziert und durch Leptin und PUFAs gehemmt wird [34], liegt in ihrer Proteinexpression in der Leber der SNTA KO Tiere erhöht vor, was allerdings nicht durch eine vermehrte mRNA Expression erklärt wird.

4.4. SNTA in der Adipositas

Die Adipositas ist ein zunehmendes weltweites Problem, das in den letzten 30 Jahren stark an Bedeutung gewonnen hat. Es hat sich herausgestellt, dass eine übermäßige Fettleibigkeit der Risikofaktor für metabolische Erkrankungen wie Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes, Bluthochdruck, NAFLD usw. ist. Da das Fehlen von SNTA zur Bildung kleiner Adipozyten führt, sollte die Ausbildung hypertropher Adipozyten mit einer erhöhten SNTA Expression einhergehen. Im Tiermodell für Adipositas (ob/ob Mäuse) zeigt sich tatsächlich, dass SNTA im subkutanen Fettgewebe sowohl in seiner Protein- als auch in seiner mRNA-Expression erhöht vorliegt. Im epididymalen Fettgewebe hingegen ist zwar die mRNA-Expression erhöht, es konnte aber bzgl. der Proteinexpression kein Unterschied festgestellt werden. Wie bereits erwähnt expandiert das epididymale Fettgewebe sowohl durch Hyperplasie als auch durch Hypertrophie, während das subkutane Fettgewebe vermutlich nur durch Hypertrophie expandiert [7]. Somit scheint SNTA an der Fettgewebsexpansion durch Hypertrophie beteiligt zu sein. Unter gesunden Bedingungen werden die Veränderungen in der Architektur des weißen Fettgewebes und der extrazellulären Matrix (ECM) mit der Umänderung der Adipozytengröße koordiniert um mehr Lipide speichern zu können. In Gegensatz dazu führt eine exzessive Energieaufnahme zusammen mit der gleichzeitigen Entwicklung hypertropher Adipozyten zu einer Belastung auf Grund der Anpassung der ECM und der daraus resultierenden Konsequenzen wie Entzündung und Insulinresistenz. In adipösen Individuen wurde festgestellt, dass die Expression ECM-zugehöriger Gene im Fettgewebe erhöht ist. Zu diesen Genen gehören Zelladhäsionsmoleküle und ECM Rezeptor-interagierende Proteine [77]. Im Muskel konnte für SNTA bereits nachgewiesen werden, dass dieses über den DAPC eine Verbindung zwischen ECM und dem internen Zellsignalapparat und dem Zytoskelett darstellt [44]. Daraus könnte man schließen, dass SNTA wichtige Moleküle für die Anpassung der ECM und somit für die Vergrößerung der Adipozyten an ihre Zielorte transportiert.

Trotz der massiven Ausbildung einer Fettleber konnte keine veränderte Expression von SNTA im Lebergewebe der ob/ob Mäuse festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass SNTA primär das Fettgewebe beeinflusst und dadurch sekundär die Ausprägung einer Fettleber verhindert wird. Denkbar ist auch, dass sich die Lokalisation und / oder Interaktionspartner von SNTA in der verfetteten Leber ändern wohingegen die Gesamtproteinmenge gleich bleibt. Diese Fragestellungen können nur im Zellkulturmodell bzw. in Tieren mit einer Leberspezifischen SNTA Defizienz geklärt werden. Die erhöhte

SCD1 Expression in den Lebern der ob/ob Mäuse deckt sich mit schon bekannten Ergebnissen, die zeigen, dass Mausmodelle für Adipositas, die erhöhte Level an SCD1-Expression aufweisen, eine Lebersteatose und Insulinresistenz ausbilden, was bei den ob/ob Mäusen der Fall ist [89].

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von alpha Syntrophin (SNTA) für die Funktionalität von Adipozyten und in der Adipositas untersucht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass SNTA ein Bestandteil des Dystrophin Komplexes im Skelettmuskel ist und bisher publizierte Daten beschäftigen sich fast ausschließlich mit dieser Thematik. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass SNTA auch im Fettgewebe und in der Adipozytenzelllinie 3T3-L1 exprimiert wird. Die *in vitro* Untersuchungen an der 3T3-L1 Zelllinie, die über einen Zeitraum von neun Tagen von Präadipozyten zu reifen Adipozyten differenziert wird, ergeben, dass SNTA eine entscheidende Rolle für die Lipidspeicherung in den reifen Adipozyten hat. und die Proliferation der Präadipozyten reguliert. Der knock-down von SNTA in den Präadipozyten bewirkt eine erhöhte Proliferation der Fibroblasten. Eine niedrige Expression von SNTA während der Adipogenese verhindert die Ausbildung grosser Lipidtropfen, so dass die Triglyzeride nur in kleinen Lipidvakuolen gespeichert werden. Es ist weder der Differenzierungsgrad, die Insulinsignaltransduktion noch die Lipolyse im Vergleich zu den Kontroll-behandelten Zellen verändert. Des Weiteren ist die Expression von SCD1 nach dem knock-down von SNTA erniedrigt. Da die SCD1 im endoplasmatischen Retikulum und SNTA im Zytoplasma lokalisiert ist kann dies nicht durch eine direkte Proteininteraktion erklärt werden.

SNTA knock-out Mäuse lagern weniger Lipide in den subkutanen und perirenenal Fettdepots nach Fütterung einer Hochfettdiät ein und sind vor einer nicht alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) geschützt. Die metabolische Charakterisierung der SNTA knock-out Mäuse ergibt keine wesentlichen Unterschiede in der Zusammensetzung des Serumlipidoms oder in der Entzündungsreaktion. SNTA knock-out Mäuse sind nicht vor einer Adipositas abhängigen Hyperglykämie geschützt. Allerdings wird – anders als in den Wildtyp Tieren - der Glukosespiegel nicht durch eine vermehrte Synthese von Proinsulin in den pankreatischen beta Zellen konstant gehalten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SNTA eine wichtige Rolle für die Morphologie und die Expansion des Fettgewebes spielt. Nach einer Diät induzierten Adipositas expandieren die Fettdepots der SNTA knock-out Mäuse hauptsächlich über Hyperplasie und nicht, wie man erwarten würde, über Hypertrophie. Dementsprechend finden sich mehr und kleinere Zellen in den verschiedenen Fettdepots. Die ob/ob Mäusen stellen ein genetisches Adipositasmodell dar, da diese Mäuse Leptin defizient sind, weswegen sie kein Sättigungsgefühl entwickeln und somit rasch an Gewicht zunehmen. Man weiß von diesen Mäusen auch, dass sie

hypertrophe Adipozyten ausbilden. In den hypertrophen Adipozyten des subkutanen Fettgewebes ist die Expression von SNTA sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene signifikant erhöht. Wie schon in den *in vitro* Versuchen gezeigt ist auch im Fettgewebe und in der Leber der SNTA knock-out Mäuse die Expression von SCD1 verändert. Welche Mechanismen daran beteiligt sind, ist noch unklar, da eine direkte Interaktion ausgeschlossen werden kann und verschiedene in der Literatur beschriebene SCD1 knock-out Tiermodelle diskrepante Ergebnisse liefern.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass eine SNTA Defizienz mit einer verminderten Fettmasse, kleineren Adipozyten und einer vornehmlich hyperplastischen Expansion des Fettgewebes in der Adipositas einhergeht. Dies scheint ein direkter Effekt in den Adipozyten zu sein. Diese Tiere bilden weder eine hepatische Steatose noch eine Hyperinsulinämie aus, was sich wahrscheinlich durch die verbesserte Funktion des Fettgewebes erklären lässt.

6. Publikationen und Kongressbeiträge

6.1. Publikationen

6.1.1. Erstautorenschaften

Eisinger K, Krautbauer S, Hebel T, Schmitz G, Aslanidis C, Liebisch G, Buechler C. Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes. *Exp Mol Pathol*. 2014 May 14. [Epub ahead of print]

Eisinger K, Liebisch G, Schmitz G, Aslanidis C, Krautbauer S, Buechler C.: Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *Int J Mol Sci*. 2014 Feb 20;15(2):2991-3002..

Eisinger K, Krautbauer S, Wiest R, Karrasch T, Hader Y, Scherer MN, Farkas S, Aslanidis C, Buechler C.: Portal vein omentin is increased in patients with liver cirrhosis but is not associated with complications of portal hypertension. *Eur J Clin Invest*. 2013 Sep;43(9):926-32.

Eisinger K, Bauer S, Schäffler A, Walter R, Neumann E, Buechler C, Müller-Ladner U, Frommer KW.: Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):90-6.

6.1.2. Koautorenschaften

Krautbauer S, **Eisinger K**, Hader Y, Neumeier M, Buechler C.: Manganese superoxide dismutase knock-down in 3T3-L1 preadipocytes impairs subsequent adipogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2014 Apr 17. [Epub ahead of print]

Krautbauer S, **Eisinger** K, Neumeier M, Hader Y, Buettner R, Schmid PM, Aslanidis C, Buechler C.: Free fatty acids, lipopolysaccharide and IL-1 α induce adipocyte manganese superoxide dismutase which is increased in visceral adipose tissues of obese rodents. *PLoS One*. 2014 Jan 24;9(1):e86866. eCollection 2014.

Krautbauer S, **Eisinger** K, Lupke M, Wanninger J, Ruemmele P, Hader Y, Weiss TS, Buechler C.: Manganese superoxide dismutase is reduced in the liver of male but not female humans and rodents with non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Mol Pathol*. 2013 Dec;95(3):330-5.

Krautbauer S, Neumeier M, **Eisinger** K, Hader Y, Dada A, Schmitz G, Aslanidis C, Buechler C.: LDL but not HDL increases adiponectin release of primary human adipocytes. *Exp Mol Pathol*. 2013 Dec;95(3):325-9..

Buechler C, **Eisinger** K, Krautbauer S.: Diagnostic and prognostic potential of the macrophage specific receptor CD163 in inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2013 Dec;12(6):391-402.

Krautbauer S, Wanninger J, **Eisinger** K, Hader Y, Beck M, Kopp A, Schmid A, Weiss TS, Dorn C, Buechler C.: Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver. *Exp Mol Pathol*. 2013 Oct;95(2):199-205.

Neumeier M, Krautbauer S, Schmidhofer S, Hader Y, **Eisinger** K, Eggenhofer E, Froehner SC, Adams ME, Mages W, Buechler C.: Adiponectin receptor 1 C-terminus interacts with PDZ-domain proteins such as syntrophins. *Exp Mol Pathol*. 2013 Oct;95(2):180-6..

Bauer S, **Eisinger** K, Wiest R, Karrasch T, Scherer MN, Farkas S, Aslanidis C, Buechler C. Connective tissue growth factor level is increased in patients with liver cirrhosis but is not associated with complications or extent of liver injury. *Regul Pept*. 2012 Nov 10;179(1-3):10-4.

Bauer S, Bala M, Kopp A, **Eisinger** K, Schmid A, Schneider S, Neumeier M, Buechler C.: Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo. *Eur J Clin Invest*. 2012 Nov;42(11):1213-20.

Wanninger J, Liebisch G, Schmitz G, Bauer S, **Eisinger** K, Neumeier M, Ouchi N, Walsh K, Buechler C.: Lipidomic analysis of the liver identifies changes of major and minor lipid species in adiponectin deficient mice. *Exp Mol Pathol.* 2013 Apr;94(2):412-7.

Wanninger J, Bauer S, **Eisinger** K, Weiss TS, Walter R, Hellerbrand C, Schäffler A, Higuchi A, Walsh K, Buechler C.: Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Feb 26;349(2):248-54. doi: 10.1016/j.mce.2011.10.032. Epub 2011 Nov 18. Erratum in: *Mol Cell Endocrinol.* 2012 May 15;355(1):190.

Walter R, Wanninger J, Bauer S, **Eisinger** K, Neumeier M, Weiss TS, Amann T, Hellerbrand C, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C.: Adiponectin reduces connective tissue growth factor in human hepatocytes which is already induced in non-fibrotic non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol.* 2011 Dec;91(3):740-4..

Neumeier M, Bauer S, Brühl H, **Eisinger** K, Kopp A, Abke S, Walter R, Schäffler A, Buechler C.: Adiponectin stimulates release of CCL2, -3, -4 and -5 while the surface abundance of CCR2 and -5 is simultaneously reduced in primary human monocytes. *Cytokine.* 2011 Dec;56(3):573-80.

Wanninger J, Walter R, Bauer S, **Eisinger** K, Schäffler A, Dorn C, Weiss TS, Hellerbrand C, Buechler C.: MMP-9 activity is increased by adiponectin in primary human hepatocytes but even negatively correlates with serum adiponectin in a rodent model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol.* 2011 Oct;91(2):603-7.

Wanninger J, Neumeier M, Bauer S, Weiss TS, **Eisinger** K, Walter R, Dorn C, Hellerbrand C, Schäffler A, Buechler C.: Adiponectin induces the transforming growth factor decoy receptor BAMBI in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2011 May 6;585(9):1338-44.

Wanninger J, Wiest R, Bauer S, Neumeier M, **Eisinger** K, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Buechler C.: Portal levels of latent transforming growth factor- β are related to liver function in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Mar;23(3):218-23.

6.2. Kongressbeiträge**6.2.1. Vorträge**

Kristina Eisinger, Sabrina Krautbauer, Yvonne Hader, Christa Buechler

Metabolic characterisation of alpha-Syntrophin knock-out mice (SNTA -/-)

Summer school of the Biomedicine section, Regen, Deutschland 08. - 09.11.2013

6.2.2. Poster

Kristina Eisinger, Sabrina Krautbauer, Markus Neumeier, Yvonne Hader, Roland Buettner, Peter M. Schmid, Charalampos Aslanidis, Christa Buechler

Free fatty acids induce adipocyte manganese superoxide dismutase which is increased in adipose tissues of obese rodents

2nd International Conference on Immunometabolism, Rhodos, Griechenland 15. - 20.09.2013

Kristina Eisinger, Sabrina Bauer, Markus Neumeier, Sandra Schmidhofer, Marvin E. Adams, Stanley C. Froehner, Christa Buechler

A lack of alpha syntrophin leads to altered lipid storage in liver and protects from fibrosis

35th Meeting of the European Lipoprotein Club, Tutzing, Deutschland 10. - 13.09.2012

Kristina Eisinger, Sabrina Bauer, Markus Neumeier, Sandra Schmidhofer, Roland Walter, Marvin E. Adams, Stanley C. Froehner, Andreas Schäffler, Christa Buechler

Alpha syntrophin deficient mice are protected from high fat diet mediated obesity

72nd Meeting of the American Diabetes Association, Philadelphia, USA 08. - 12.06.2012

Kristina Eisinger, Sabrina Bauer, Markus Neumeier, Sandra Schmidhofer, Roland Walter, Marvin E. Adams, Stanley C. Froehner, Andreas Schäffler, Christa Buechler

Alpha syntrophin deficient mice are protected from high fat diet mediated obesity

Summer School of the Biomedicine section, Regen, Deutschland 04. - 05.11.2011

7. Literaturverzeichnis

1. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Obesity and the regulation of energy balance*. Cell, 2001. **104**(4): p. 531-43.
2. Park, K.W., D.S. Halperin, and P. Tontonoz, *Before they were fat: adipocyte progenitors*. Cell Metab, 2008. **8**(6): p. 454-7.
3. Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
4. Timmons, J.A., et al., *Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4401-6.
5. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(4): p. 332-41.
6. Item, F. and D. Konrad, *Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited*. Obes Rev, 2012. **13 Suppl 2**: p. 30-9.
7. Wang, Q.A., et al., *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1338-44.
8. Makki, K., P. Froguel, and I. Wolowczuk, *Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines*. ISRN Inflamm, 2013. **2013**: p. 139239.
9. Yao, L., et al., *Roles of the Chemokine System in Development of Obesity, Insulin Resistance, and Cardiovascular Disease*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 181450.
10. Aron-Wisnewsky, J., et al., *Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(11): p. 4619-23.
11. Suganami, T., et al., *Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 84-91.
12. Cusi, K., *Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications*. Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 711-725 e6.
13. Zambo, V., et al., *Lipotoxicity in the liver*. World J Hepatol, 2013. **5**(10): p. 550-557.
14. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. J Lipid Res, 2009. **50**(10): p. 1955-66.
15. Zhang, X.Q., et al., *Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(7): p. 1768-76.
16. Schwenger, K.J. and J.P. Allard, *Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(7): p. 1712-23.
17. Preiss, D. and N. Sattar, *Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations*. Clin Sci (Lond), 2008. **115**(5): p. 141-50.
18. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, *Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(23): p. 2801-11.
19. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
20. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology, 2010. **52**(5): p. 1836-46.

21. Ganz, M. and G. Szabo, *Immune and inflammatory pathways in NASH*. *Hepatology*, 2013. **7**(Suppl 2): p. 771-781.
22. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. *Liver Int*, 2006. **26**(10): p. 1175-86.
23. Li, M., et al., *Analytical methods in lipidomics and their applications*. *Anal Chem*, 2014. **86**(1): p. 161-75.
24. Quehenberger, O., et al., *Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma*. *J Lipid Res*, 2010. **51**(11): p. 3299-305.
25. Barber, M.N., et al., *Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41456.
26. Pietilainen, K.H., et al., *Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects--a monozygotic twin study*. *PLoS One*, 2007. **2**(2): p. e218.
27. Kim, J.Y., et al., *Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS)*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(9): p. 4368-75.
28. Donovan, E.L., et al., *Lipidomic analysis of human plasma reveals ether-linked lipids that are elevated in morbidly obese humans compared to lean*. *Diabetol Metab Syndr*, 2013. **5**(1): p. 24.
29. Haus, J.M., et al., *Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance*. *Diabetes*, 2009. **58**(2): p. 337-43.
30. Kim, H.J., et al., *Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(2): p. 722-31.
31. Puri, P., et al., *A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2007. **46**(4): p. 1081-90.
32. An, Y., et al., *High-fat diet induces dynamic metabolic alterations in multiple biological matrices of rats*. *J Proteome Res*, 2013. **12**(8): p. 3755-68.
33. Kurek, K., et al., *Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease*. *Liver Int*, 2013.
34. Sampath, H. and J.M. Ntambi, *The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation*. *Ann N Y Acad Sci*, 2011. **1243**: p. 47-53.
35. Ntambi, J.M., et al., *Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(17): p. 11482-6.
36. Miyazaki, M., et al., *Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis*. *Cell Metab*, 2007. **6**(6): p. 484-96.
37. Flowers, M.T., et al., *Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(8): p. 1646-53.
38. Hyun, C.K., et al., *Adipose-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase 1 up-regulates the glucose transporter GLUT1 in adipose tissue*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **399**(4): p. 480-6.
39. Kim, E., et al., *Inhibition of stearoyl-CoA desaturase1 activates AMPK and exhibits beneficial lipid metabolic effects in vitro*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **672**(1-3): p. 38-44.
40. Liu, X., M.S. Strable, and J.M. Ntambi, *Stearoyl CoA desaturase 1: role in cellular inflammation and stress*. *Adv Nutr*, 2011. **2**(1): p. 15-22.
41. Fernandez Gianotti, T., et al., *Fatty liver is associated with transcriptional downregulation of stearoyl-CoA desaturase and impaired protein dimerization*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e76912.

42. Garcia-Serrano, S., et al., *Stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with insulin resistance in morbidly obese subjects*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 273-80.
43. Adams, M.E., et al., *Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25859-65.
44. Bhat, H.F., M.E. Adams, and F.A. Khanday, *Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(14): p. 2533-54.
45. Adams, M.E., et al., *Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin*. J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1385-98.
46. Adams, M.E., K.N. Anderson, and S.C. Froehner, *The alpha-syntrophin PH and PDZ domains scaffold acetylcholine receptors, utrophin, and neuronal nitric oxide synthase at the neuromuscular junction*. J Neurosci, 2010. **30**(33): p. 11004-10.
47. Kim, M.J., et al., *Alpha-syntrophin modulates myogenin expression in differentiating myoblasts*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15355.
48. Adams, M.E., et al., *Structural abnormalities at neuromuscular synapses lacking multiple syntrophin isoforms*. J Neurosci, 2004. **24**(46): p. 10302-9.
49. Hosaka, Y., et al., *Alpha1-syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1097-107.
50. Oak, S.A., et al., *Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling*. Biochemistry, 2001. **40**(37): p. 11270-8.
51. Zhou, Y.W., et al., *Laminin-alpha1 globular domains 3 and 4 induce heterotrimeric G protein binding to alpha-syntrophin's PDZ domain and alter intracellular Ca²⁺ in muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(2): p. C377-88.
52. Okumura, A., K. Nagai, and N. Okumura, *Interaction of alpha1-syntrophin with multiple isoforms of heterotrimeric G protein alpha subunits*. FEBS J, 2008. **275**(1): p. 22-33.
53. Munehira, Y., et al., *Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15091-5.
54. Lyssand, J.S., et al., *Blood pressure is regulated by an alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18792-800.
55. Wang, C.C., M.L. Goalstone, and B. Draznin, *Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology*. Diabetes, 2004. **53**(11): p. 2735-40.
56. Woldt, E., et al., *Differential signaling by adaptor molecules LRP1 and ShcA regulates adipogenesis by the insulin-like growth factor-1 receptor*. J Biol Chem, 2011. **286**(19): p. 16775-82.
57. Kishi, K., et al., *Gq-coupled receptors transmit the signal for GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26561-8.
58. Tanoue, A., et al., *Role of the alpha1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension*. Hypertension, 2002. **40**(1): p. 101-6.
59. Collins, S., W. Cao, and J. Robidoux, *Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2123-31.
60. de Haan, W., et al., *ABCA1 in adipocytes regulates adipose tissue lipid content, glucose tolerance, and insulin sensitivity*. J Lipid Res, 2014. **55**(3): p. 516-23.
61. Wu, G., et al., *alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2008. **1**(3): p. 193-201.
62. Cheng, J., et al., *Alpha1-syntrophin mutations identified in sudden infant death syndrome cause an increase in late cardiac sodium current*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009. **2**(6): p. 667-76.

63. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
64. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. Biotechnology, 1992. **24**: p. 145-9.
65. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
66. Rubin, C.S., et al., *Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells*. J Biol Chem, 1978. **253**(20): p. 7570-8.
67. Spiegelman, B.M., M. Frank, and H. Green, *Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development*. J Biol Chem, 1983. **258**(16): p. 10083-9.
68. Sledzinski, T., et al., *The increase of serum chemerin concentration is mainly associated with the increase of body mass index in obese, non-diabetic subjects*. J Endocrinol Invest, 2013. **36**(6): p. 428-34.
69. Rask-Madsen, C. and C.R. Kahn, *Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2052-9.
70. Smart, E.J., et al., *Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7289-304.
71. Krautbauer, S., et al., *Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver*. Exp Mol Pathol, 2013. **95**(2): p. 199-205.
72. Katsurada, A., et al., *Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver*. Eur J Biochem, 1990. **190**(2): p. 427-33.
73. Connelly, M.A., *SR-BI-mediated HDL cholesteryl ester delivery in the adrenal gland*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **300**(1-2): p. 83-8.
74. Mehta, R., et al., *Expression of inflammation-related genes is altered in gastric tissue of patients with advanced stages of NAFLD*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 684237.
75. Waki, H. and P. Tontonoz, *Endocrine functions of adipose tissue*. Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 31-56.
76. Arner, E., et al., *Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 105-9.
77. Lackey, D.E., et al., *Contributions of adipose tissue architectural and tensile properties toward defining healthy and unhealthy obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **306**(3): p. E233-46.
78. Peng, Y., et al., *Troglitazone inhibits synthesis of transforming growth factor-beta1 and reduces matrix production in human peritoneal mesothelial cells*. Nephrology (Carlton), 2006. **11**(6): p. 516-23.
79. Marchesi, C. and E.L. Schiffrin, *Peroxisome proliferator-activated receptors and the vascular system: beyond their metabolic effects*. J Am Soc Hypertens, 2008. **2**(4): p. 227-38.
80. Tomas, E., et al., *Glucagon-like peptide-1(9-36)amide metabolite inhibits weight gain and attenuates diabetes and hepatic steatosis in diet-induced obese mice*. Diabetes Obes Metab, 2011. **13**(1): p. 26-33.
81. Bauer, S., et al., *Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo*. Eur J Clin Invest, 2012. **42**(11): p. 1213-20.

-
82. Paton, C.M. and J.M. Ntambi, *Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E28-37.
 83. Merino, D.M., D.W. Ma, and D.M. Mutch, *Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease*. Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 63.
 84. Sun, Y., et al., *Stearyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5813-20.
 85. Eisinger, K., et al., *Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes*. Exp Mol Pathol, 2014.
 86. Eisinger, K., et al., *Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes*. Exp Mol Pathol, 2014. **97**(1): p. 37-43.
 87. Traber, P.G. and E. Zomer, *Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83481.
 88. Hardie, D.G., *AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease*. J Intern Med, 2014.
 89. Mauvoisin, D. and C. Mounier, *Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression*. Biochimie, 2011. **93**(1): p. 78-86.