

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
Molekulare Zellbiologie

Direktorin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Veränderungen
im Lipoproteinstoffwechsel und dem
Insulinsignalweg durch Diät- induzierte Adipositas
in C57 BL/6- Mäusen**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität
Hamburg**

vorgelegt von

Alexander Beeck

aus Bremen

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg 16.09.2009

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. rer. Nat. Jörg
Heeren

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. rer. Nat.
Ulrike Beisiegel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. med. Martin Merkel

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	2
11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	2
1 EINLEITUNG	3
1.1 LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL.....	4
1.1.1 Lipide.....	4
1.1.2 Exogener Weg.....	5
1.1.3 Endogener Weg.....	7
1.2 INSULINRESISTENZ UND VERÄNDERUNGEN IM LIPOPROTEIN STOFFWECHSEL.....	9
1.2.1 Die Rolle des Insulin im Lipid- und Glukosestoffwechsel.....	9
1.2.2 Veränderungen im menschlichen Lipidstoffwechsel bei Insulinresistenz.....	11
1.2.3 Veränderungen des Lipid- & Lipoproteinstoffwechsels bei Diät Induzierten Adipositas.....	12
1.3 GENEXPRESSION VON PROTEINEN DES LIPOPROTEIN-STOFFWECHSELS BEI DER INSULIN RESISTENZ.....	15
2 ZIEL DER ARBEIT	18
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 MATERIAL.....	19
3.1.1 Geräte.....	19
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.3 Chemikalien, Proteine und Enzyme.....	20
3.1.4 Kits.....	20
3.1.5 Antikörper.....	20
3.1.6 Mäuse.....	21
3.2 METHODEN.....	22
3.2.2 Proteinbestimmung.....	22
3.2.3 Gelfiltration.....	23
3.2.4 Westernblotanalyse.....	24
3.2.5 Statistik.....	26
4 ERGEBNISSE	27

4.1 LIPIDCHARAKTERISTIK UND LIPOPROTEINPROFILE IN PLASMEM VON KONTROLLDIÄT UND HFD GEFÜTTERTEN MÄUSEN.....	27
4.1.1 Plasmalipidcharakteristik von Kontrolldiät und HFD gefütterten Mäusen.....	27
4.1.2 Lipoproteinprofile im Plasma von Kontrolldiät und HFD- gefütterten Mäusen	28
4.2 EXPRESSION WICHTIGER PROTEINE DES INSULINSIGNALING, DES LIPID- UND LIPOPROTEINSTOFFWECHSELS.....	34
5 DISKUSSION	49
6 ZUSAMMENFASSUNG	54
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	55
8 LITERATURVERZEICHNIS	56
9 DANKSAGUNG	62
11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	

1 Einleitung

Der Diabetes mellitus Typ II (T2DM) ist weltweit, und gerade in der westlichen Gesellschaft, eine der häufigsten Stoffwechselstörungen, deren Inzidenz kontinuierlich ansteigt. Schätzungen besagen, dass im Jahre 2020 ca. 250 Millionen Menschen weltweit an T2DM erkrankt sein werden [28, 65]. In den meisten Fällen wird durch hyperkalorische Diäten Adipositas und schließlich eine gestörte Glucosetoleranz und Insulinresistenz indiziert. Häufig tritt T2DM mit Übergewicht, Bluthochdruck und Störungen des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel auf, was dann als metabolisches Syndrom oder auch Wohlstandssyndrom bezeichnet wird. Lipid- und Lipoproteinstoffwechselstörungen, die unter dem T2DM auftreten führen zu pathophysiologischen Veränderungen des Gefäßsystems, der Artherosklerose. Diese Veränderungen können zu koronarer Herzkrankheit oder der arteriellen Verschlusskrankheit führen. Prospektive Studien zeigten, dass Patienten mit T2DM ein 3-4fach höheres Risiko aufweisen an der koronaren Herzkrankheit zu erkranken. Auch die Sterblichkeit während eines Krankenhausaufenthaltes ist bei Patienten mit T2DM um 50% erhöht [20, 77]. Zusammen mit dem vergesellschafteten Bluthochdruck führt dies zu Herz-Kreislaufkrankungen. Diese bilden die häufigsten Ursachen für Krankheits- und Todesfälle in der Bundesrepublik Deutschland.

Die molekularen Mechanismen, die zu Störungen des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels bei der Entwicklung der Insulinresistenz führen, sind weitestgehend unbekannt. Um molekulare Ursachen der Entstehung der Insulinresistenz in den verschiedenen, daran beteiligten Organen wie Leber, Fett- und Muskelgewebe zu untersuchen, können die Untersuchungen nur im Tiermodell durchgeführt werden. Das für die Charakterisierung des Stoffwechsels gewählte Mausmodell C57BL/6 wird zur Untersuchung der übergewichtsinduzierten Insulinresistenz in vielen Forschungsgebieten verwendet, besonders aber in der Diabetes- und Arterioskleroseforschung. Dieser Mausstamm ist besonders geeignet, da die Tiere durch eine „Hochfettdiät“ (HFD) Übergewicht und Insulinresistenz entwickeln. Das Diät induzierte Adipositas („*Diet Induced Obesity*“ (DIO))

Mausmodell kommt somit der durch Überernährung hervorgerufenen, menschlichen Insulinresistenz recht nahe. Bislang sind Veränderungen im Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel in diesem Modell nur unzureichend charakterisiert.

1.1 Lipoproteinstoffwechsel

1.1.1 Lipide

Die Großzahl der Lipide der menschlichen Diät besteht aus Triglyzeriden (TG) und Cholesterin, sie sind lebenswichtig für eine Vielzahl von zellulären Prozessen im gesamten menschlichen Körper.

Fettsäuren, komplexiert in Triglyzeriden, können entweder im Fettgewebe gespeichert, oder als Energiequelle für das periphere Gewebe wie zum Beispiel in Herz- und Skelettmuskel verwendet werden. Daher sind Fettsäuren die wichtigsten Energieträger der Nahrung und stellen so die bedeutendste Energiereserve dar. Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil der Gallensäuren und essentiell für die Synthese von Zellmembranen, Steroidhormonen und Vitamin D. Als Hauptbestandteil von Membranen dienen Lipide der mechanischen und elektrischen Isolierung der Zelle und ermöglicht so den Aufbau eines elektrischen Membranpotentials.

Lipide werden mit der Lymphe und dem Blut durch den menschlichen Körper transportiert. Da Lipide lipophile Substanzen sind, die im Wasser nicht oder nur schlecht löslich sind, müssen sie im Plasma in Form von Lipoproteinkomplexen transportiert werden. Diese Lipoproteinkomplexe bestehen aus Lipiden und Transportproteinen, den Apolipoproteinen. Den lipophilen Kern dieser Komplexe bilden die apolaren Cholesterinester und Triglyceride, sowie andere lipidlösliche Substanzen (z.B. Vitamine). Die Hülle besteht aus amphiphilen Phospholipiden, freiem Cholesterin und den Apolipoproteinen. Die wichtigsten Lipoproteine können in fünf Gruppen unterteilt werden. Die klassische Einteilung erfolgt nach ihrer Dichte. Man unterteilt die folgenden Hauptgruppen: Chylomikronen, Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL), Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL), Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (HDL). Apolipoproteine haben spezielle Funktionen bei der Entstehung, dem Transport und dem Metabolismus der Lipoproteine. Mit Ausnahme

von Apolipoprotein A (Apo-A) sind sie amphiphatische Proteine mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen, die sowohl Lipidbindung als auch Wasserlöslichkeit vermitteln können [35, 47]. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über verschiedene Charakteristika der Lipoproteine. Der Stoffwechsel der Lipoproteine verläuft über drei verschiedene Wege; einen exogenen Weg, einen endogenen Weg und den so genannten reversen Cholesterintransport.

	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Herkunft	Dünndarm	Leber	VLDL	VLDL/IDL	Leber & Dünndarm
Durchmesser (nm)	75 - 1200	30 - 80	25 - 35	18 - 25	5 - 12
Dichte (g/ml)	< 0.96	0.96-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210
Zusammensetzung (%)					
Triglyzeride	88	56	29	13	15
Cholesterin	4	23	42	58	40
Protein	1.0 - 2.0	6.0 - 10.0	11	21	45 - 55
Apolipoproteine					
Apo-A1, -A2, -A4	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
Apo-B48	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Apo-B100	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
Apo-C1,-C2, -C3	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Apo-E	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

Tabelle 1: Zusammensetzung der humanen Plasmalipoproteine

1.1.2 Exogener Weg

Der exogene Weg beschreibt die Resorption von Nahrungslipiden aus dem Dünndarmlumen. Unter den Lipidbestandteilen der Nahrung entfällt der größte Anteil auf die Triglyzeride (TG). Daneben enthält die Nahrung Phospholipide, Sphingolipide, freies und verestertes Cholesterin, freie Fettsäuren und lipidlösliche Vitamine.

Die Verdauung der Triglyzeride beginnt im Magen. Nach Emulgation werden sie durch Magen- und Pankreaslipasen in Di- und Monoglyzeride sowie freie Fettsäuren gespalten. Diese Spaltprodukte werden in Form

gemischter Mizellen emulgiert und in die Dünndarmschleimhaut resorbiert. Nach Resorption werden sie in den Enterocyten zu Triglyzeriden zusammengesetzt und mit Apo B48 in Chylomikronen eingebaut. Diese Chylomikronen bestehen im Kern aus revereesterten Triglyzeriden, Cholesterinestern sowie anderen lipidlöslichen Substanzen wie z.B. Vitaminen [49]. Sie werden von einer Hülle umgeben die aus Phospholipiden und Apolipoproteinen besteht. Der Apolipoproteinanteil naszierender, d.h. neu synthetisierter, Chylomikronen besteht aus Apo-AI, -AII, -AIV, und Apo-B48.

Nach Sekretion in die Lymphe gelangen die Chylomikronen durch den Ductus thoracicus, unter Umgehung des enterohepatischen Kreislaufs, in die Blutbahn. Hier nehmen sie die von den HDL bereitgestellten Apolipoproteine Apo-CII, -CIII und Apo-E auf und geben Apo-AI und Apo-AII ab [30]. Apo-CII ist ein wichtiger Kofaktor der endothelialen Lipoproteinlipase (LPL), die vor allem im Fett- und Muskelgewebe den Triglyzeridanteil im Kern der Chylomikronen spaltet. Auf diese Weise entstehen freie Fettsäuren die in die Gewebe aufgenommen werden und hier als Energielieferant dienen. Während der Lipolyse nehmen die Chylomikronen immer mehr Apo-E von den HDL auf und geben im Gegenzug immer mehr Apo-AI, -AIV und Apo-C an die HDL ab. Das Ergebnis dieser Umbauprozesse sind die so genannten Chylomikronen – Remnants, die im Vergleich zu Chylomikronen vermehrt Cholesterin und Apo-E enthalten. Die Chylomikronen – Remnants werden schnell Apo-E vermittelt in die Leber aufgenommen und so aus der Blutzirkulation entfernt [3, 4]. Apo-E vermittelt einerseits die Bindung an den LDL-Rezeptor (LDL-R), andererseits ermöglicht es ihre Aufnahme über das LDL-Rezeptor- related Protein 1 (LRP1) [3, 5, 36, 37, 40, 59]. Bei dieser rezeptorvermittelten Aufnahme spielt auch die LPL als Interaktionspartner oder Liegand eine wichtige Rolle, welche unabhängig von ihrer enzymatischen Funktion ist [2, 25, 38, 50]. In den Hepatozyten unterliegt ein Teil der Oberflächenkomponenten z.B. Apo E und LPL einem Recyclingzyklus, während der hydrophobe Kern dem lysosomalen Abbau zugeführt wird [23, 24].

1.1.3 Endogener Weg

Der endogene Weg versorgt die peripheren Gewebe im gefasteten Zustand mit Triglyzeriden zur Energiegewinnung und mit Cholesterin. Der endogene Weg beginnt mit der Synthese von VLDL in der Leber. Nach ihrer Synthese in der Leberzelle, wo Apo B100 zunächst im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermittelt durch das Mikrosomale transportprotein (MTP) mit Lipiden beladen werden [7]. Diese lipidierten VLDL verschmelzen mit Lipidtröpfchen der Zelle und werden als VLDL sekretiert. Ein VLDL – Partikel enthält immer nur ein Apo-B100 Molekül. Eine Steigerung der TG-Sekretion wird daher vor allem über die Produktion größerer lipidreicherer VLDL erreicht [15].

Die neu synthetisierten VLDL enthalten Apo-B100, Apo-E und einen geringen Anteil Apo-C. Während ihrer Zirkulation durch den menschlichen Kreislauf nehmen die VLDL immer größere Mengen an Apo-E und Apo-C von den HDL auf [18]. Die Apo-C haben zwei Funktionen: 1. Sie hemmen die frühzeitige Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber. 2. Apo-CII aktiviert die LPL [75].

Durch die katalytische Aktivität der LPL werden ca.90% der Triglyzeride in den VLDL hydrolysiert. Dabei wird ein großer Teil der Apo-C und ein Teil des freien Cholesterins auf die HDL-Fraktion zurück übertragen [57]. Das freie Cholesterin wird in den HDL durch die LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase) verestert und kann später auf Apo-B enthaltende Lipoproteine übertragen werden. Die Hydrolyse der TG lässt die relativ kleinen VLDL-Remnants, reich an Cholesterinestern und Apo-E, und die kleineren und dichten IDL-Partikel zurück. Die VLDL-Remnants können entweder über den LDL-Rezeptor wieder in die Leber aufgenommen werden oder sie können zu LDL- Partikel umgebaut werden. An beiden Stoffwechselwegen sind Apo-E und Apo-B100 beteiligt. VLDL-Remnants haben auf Grund ihres Apo-E Anteils eine höhere Affinität zum LDL-Rezeptor als die LDL selbst. VLDL, VLDL-Remnants und LDL besitzen Apo-B100, die Affinität zum LDL-R ist jedoch unterschiedlich. VLDL bindet kaum an den LDL-R, eine Ursache hierfür liegt wohl in der Tatsache dass die LDL-R Bindungsdomäne des Apo-B100, bei den VLDL, durch Apo-CII blockiert ist. Erst während der Hydrolyse der TG durch die LPL und der Übertragung des Apo-C auf die HDL wird die Bindungsdomäne „befreit“

und die Affinität zum LDL-R nimmt zu. VLDL-Remnants die nicht von der Leber aufgenommen werden, werden zu LDL umgewandelt. Dabei verlieren sie ihr Apo-E und nehmen, vermittelt durch das CETP (Cholesterin-ester-Transferprotein), Cholesterinester aus den HDL auf. Die LDL enthalten als einziges Lipoprotein Apo-B100.

Die zelluläre Aufnahme von LDL erfolgt in erster Linie Apo-B/E –vermittelt über rezeptorvermittelte Endozytose durch den LDL-Rezeptor. Die Leber trägt die „Hauptrolle“ im Metabolismus der LDL. Neben der Synthese der LDL reguliert sie, über die Expression des LDL-R, deren Katabolismus. Etwa zwei Drittel der LDL werden rezeptorvermittelt verstoffwechselt. Der Großteil wird von Leber, Nebennieren und Gonaden metabolisiert, sie benötigen das Cholesterin der LDL für die Synthese von Membranen, Steroidhormonen und Vitamin D. Die Skelettmuskulatur und das Neurogewebe decken ihren Cholesterinbedarf hingegen hauptsächlich durch Eigensynthese.

Die Expression der LDL-R unterliegt zahlreicher Faktoren. So sinkt z.B. die LDL-R Dichte bei cholesterinreicher Diät, was dann zu erhöhten LDL Konzentrationen im Plasma führt [33, 34]. Schilddrüsenhormone, Östrogene in hohen Dosen und Insulin sind Faktoren, die die Expression des LDL-Rezeptors stimulieren. Glukokortikoide verringern die Expression. Etwa ein Drittel des LDL wird LDL-R unabhängig verstoffwechselt [46, 79]. Dieser Anteil des LDL-Katabolismus wird unter dem Begriff „Scavenger pathway“ zusammen geführt. Im Gegensatz zum LDL-R vermittelten Abbau der LDL, ist der Scavenger pathway nicht durch den Cholesteringehalt der Zelle reguliert. Im Gegensatz zum LDL-R unterliegen Scavenger Rezeptoren keiner negativen Feedback-Regulation durch den zellulären Cholesteringehalt. Daher kann Cholesterin über Scavenger- Rezeptoren praktisch ungebremst in die Zellen gelangen. Scavenger Rezeptoren werden vor allem von Makrophagen und anderen Zellen des RHS (Retikulo-Histiozytäres-System) exprimiert. Hier ist eine wichtige Ursache für die Entwicklung der Artherosklerose zu finden. Da die Expression der Scavenger Rezeptoren nicht durch den intrazellulären Cholesteringehalt der Makrophagen beeinflusst ist, können sie zu so genannten Schaumzellen transformieren. Diese Schaumzellen bilden die Grundlage der artherosklerotischen Plaques, die durch ihre

gefäßschädigende Wirkung zu Gefäßwandschäden und zur Thrombenbildung führen[39].

Die Leber ist das einzige Organ über das Cholesterin, entweder direkt oder nach Transformation in Gallensäuren, ausgeschieden werden kann. Daher muss das Cholesterin von der Peripherie zur Leber transportiert werden. In diesem, als „reversen“ Cholesterintransport, bezeichneten Stoffwechselweg nehmen die HDL eine Schlüsselstellung ein. Freies Cholesterin aus den Membranen peripherer Gewebe wird auf HDL übertragen und dort mit Hilfe der LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase) verestert. Diese cholesterinbeladenen HDL reichern nun Apo-E an. Die Cholesterinabgabe der HDL verläuft auf verschiedenen Wegen. Zum einen wird lipidreiche HDL durch die Aktivität des CETP [8, 16, 27, 42], des Phospholipid-Transferproteins (PLTP) [32, 76], der endothelialen Lipase (EL) [9, 31] und der HL [1] wieder in lipidarme HDL umgewandelt. Daher wird Cholesterin auf Triglyceridreiche Lipoproteine übertragen, die dann von der Leber aufgenommen werden [12, 72]. Außerdem können hepatische oder extrahepatische Zellen Cholesterinester der HDL auch ohne gleichzeitige Endozytose selektiv aufnehmen. In diesem Mechanismus ist der Scavenger – Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) involviert [39, 57, 58, 74].

1.2 Insulinresistenz und Veränderungen im Lipoprotein Stoffwechsel

1.2.1 Die Rolle des Insulin im Lipid- und Glukosestoffwechsel

Das Hormon Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas synthetisiert. Erhöhte Blutglukosewerte führen zur Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas. Die Hauptaufgabe des Insulin liegt in der Aufrechterhaltung des Blutzuckergleichgewichts. Insulin spielt jedoch auch eine große Rolle im Lipidmetabolismus und bei der Proteinbiosynthese. Die insulinempfindlichen Gewebe wie, Fett-, Leber- und Muskelgewebe exprimieren Insulinrezeptoren in der Zellmembran und bewirken so die Aufnahme von Glukose in die Zellen von Fett- und Muskelgewebe. Nachdem Insulin an den Insulin Rezeptor bindet wird eine Kaskade in

Gang gesetzt die als „Insulin signalling“ bezeichnet wird. Nachdem Insulin an den Rezeptor bindet kommt es zu einer Autophosphorylierung eines Tyrosinrestes des Insulin Rezeptors wodurch Tyrosinreste der Insulin Rezeptor Substrate (IRS-1 und -2) phosphoryliert werden. Dies bewirkt die Translokation von intracellulären Vesikeln in die Zellmembran. Diese Vesikel sind mit Glukose-Transportern (GLUT 4) gefüllt, die dann in die Zellmembran von Adipocyten und Muskelzellen eingebaut werden.

Es gibt eine Vielzahl von Glukose-Transportern von denen der Glukose-Transporter Typ 2 (GLUT2) und der Glukose-Transporter Typ 4 (GLUT4) die größte Rolle spielen. GLUT4 wird in erster Linie vom Fett- und Muskelgewebe exprimiert. GLUT4 ist im Gegensatz zum GLUT2 insulinabhängig. GLUT2 wird vor allem von Leber- und Pankreasgewebe exprimiert, seine Aktivität ist nicht insulinabhängig [63].

Im Gewebe führt das Insulin Signalling zur Aufnahme von Glukose, zur Bildung von Triglyzeriden und langfristig zu einer gesteigerten Synthese von Proteinen. Im Fettgewebe spielt Insulin eine zentrale Rolle bei der de novo Lipogenese. Über die insulinabhängige Glukoseaufnahme in die Zelle kann vermehrt Glyzerol-3-Phosphat gebildet werden. Glyzerol-3-Phosphat bildet die Vorstufe für die Synthese von Triglyzeriden. Außerdem wird die lipolytische Aktivität der Hormon Sensitiven Lipase (HSL) durch Insulin gehemmt. Auf diese Weise führt die Anwesenheit von Insulin im Fettgewebe zu einer Zunahme der de novo Lipogenese.

Im Glukose- und Lipidstoffwechsel der Leber spielt Insulin ebenfalls eine wichtige Rolle. Erhöhte Plasmaglukosewerte führen zu erhöhten Plasmainsulinwerten. Beide zusammen, Glukose und Insulin, beeinflussen den Glukosestoffwechsel der Leber. Ein Schlüsselenzym des Glukosestoffwechsels ist die Glukokinase, sie katalysiert die Umsetzung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat. Während Glukose die Aktivität der Glukokinase steigert, steigert Insulin ihre Transkription. Beides bewirkt eine Aktivitätszunahme der Glukokinase und somit eine Zunahme der Glukoseaufnahme in die Leber. Da Glukose -6-Phosphat die Leberzelle nicht verlassen kann muss es durch die Glukose-6-phosphatase zu Glukose dephosphoryliert werden. Dieses Enzym wird jedoch durch Insulin gehemmt, was zur Akkumulation von Glukose-6-phosphat in der Leberzelle zur Folge hat.

Die erhöhten Glukose-6-phosphat-Konzentrationen führen zu einer Steigerung der Triglyzeridsynthese und Lipogenese und darüber zu vermehrter Produktion und Sekretion von VLDL aus der Leber.

1.2.2 Veränderungen im menschlichen Lipidstoffwechsel bei Insulinresistenz

Die Veränderungen im Lipidstoffwechsel bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II (T2DM) spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Artherosklerose. Bei diesen Veränderungen handelt es sich sowohl um quantitative als auch um qualitative Veränderungen der Lipoproteine [55, 73]. Vor allem die erhöhte Serumkonzentration von VLDL-Triglyzeriden und die Abnahme der HDL-Konzentration im Serum sind von Bedeutung für die Pathogenese der Artherosklerose. Die Ursache für die erhöhten VLDL-Spiegel ist eine Kombination aus gesteigerter VLDL-Synthese in der Leber auf der einen Seite und einer reduzierten Abbaurrate von VLDL und LDL auf der anderen Seite. Ein Grund für die exzessive VLDL-Synthese in der Leber ist der beim T2DM Patienten vorliegende Hyperinsulinismus . Ein Grund für den verminderten Katabolismus der VLDL –Triglyzeride scheint im Muskelgewebe zu liegen. Auf Grund der Insulinresistenz der Muskelzellen wird der Signalweg nicht adequat stimuliert. Dieses Defizit führt zu verringerter Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) im Muskelgewebe und so zu einer Abnahme der lipolytischen Aktivität. Auch in ihrer Zusammensetzung sind die VLDL erheblich verändert. Neben einem deutlich erhöhten Anteil an Triglyzeriden und Phospholipiden weisen die VLDL auch erhöhte Konzentrationen Apo- B, bei reduzierten Konzentrationen von Apo-C auf. Die Folge der qualitativen Veränderungen ist ein verstärkter Abbau dieser VLDL über den Scavenger pathway [14]. Der LDL – Metabolismus wird beim T2DM nur wenig beeinflusst. In Abhängigkeit von der Qualität der Diabeteseinstellung und der aktuellen Triglyzeridspiegel haben die LDL einen erhöhten Anteil an Triglyzeriden und Cholesterin. Die Überladung der LDL mit Triglyzeriden führt zu einer Abnahme der *small dense* LDL (sdLDL) Rezeptorbindungsfähigkeit [44, 48]. Außerdem kann LDL, bei langfristiger Stoffwechselentgleisung, zu

einem gewissen Prozentsatz nichtenzymatisch glukosyliert werden, was wiederum den Abbau der LDL verlängert. Das dies nicht zu einer deutlichen Zunahme der LDL führt, liegt daran dass der Großteil der VLDL nicht über LDL sondern über den Scavenger pathway metabolisiert wird. Die Ursache für die niedrigen HDL-Plasmaspiegel liegt wohl sowohl am gesteigerten Abbau, als auch an einer verminderten Synthese der HDL.

1.2.3 Veränderungen des Lipid- & Lipoproteinstoffwechsels bei Diät Induzierten Adipositas

Im Jahr 1988 publizierte R.S. Surwit die Entwicklung einer, dem menschlichen Typ 2 Diabetes mellitus sehr ähnlichen, Stoffwechselstörung bei C57BL/6 Mäusen [69]. Diese Tiere wurden mit einer hochkalorischen Diät gefüttert, die 60% Fett enthielt (Hochfettdiät). Nachdem die C57BL/6 Mäuse über mehrere Wochen mit dieser Hochfettdiät (HFD) gefüttert wurden, entwickelten die Tiere Fettleibigkeit die als Diät Induzierte Adipositas (*DIO*) bezeichnet wird. Außerdem zeigten sich Veränderungen im Glukose, Insulin und Fettstoffwechsel. Die *DIO* Mäuse wiesen die Anzeichen einer eindeutigen Insulinresistenz auf, mit einer Hyperglykämie und einer Hyperinsulinämie in der Ruhephase, nüchtern Glukosespiegeln im Plasma von über 200mg/l und Insulinspiegeln im Blut von über 150 μ U/ml. Da die Tiere diese Stoffwechselentgleisung erst nach mehreren Wochen HFD zeigten, konnte ein alleiniger akuter Effekt der HFD ausgeschlossen werden. Surwit vermutete daher, dass genetische Faktoren der C57BL/6 Mäuse den T2DM induzierten wenn das Tier fettleibig wurde [11, 69, 70].

C57BL/6 Mäuse, die als Kontrollgruppe normale Nahrung bekamen, entwickelten keine Fettleibigkeit und keine Insulinresistenz. Damit erwies sich das C57BL/6 Mausmodell als außerordentlich nützlich für die Erforschung der Stoffwechselprozesse und die Entwicklung der Arteriosklerose beim Vorliegen einer Insulinresistenz.

Der Lipidstoffwechsel der Nagetiere unterscheidet sich von dem der Menschen. Nagetiere werden als HDL-Tiere bezeichnet. Das bedeutet, dass das PLasmacholesterin der Tiere hauptsächlich in der HDL- Fraktion transportiert wird, wohingegen es beim Menschen vor allem in VLDL und

LDL transportiert wird. *DIO* Mäuse zeigen im Vergleich zu Kontrolldiät gefütterten Tieren charakteristische Unterschiede im Fettstoffwechsel.

Schreyer et al. untersuchte die Veränderungen im Lipoprotein-stoffwechsel bei C57BL/6 Mäusen die über 12-14 Wochen mit HFD oder Kontrolldiät gefüttert wurden. Bevor das Plasma der Tiere gewonnen wurde, wurden die Tiere für vier Stunden gefastet. Neben einer 2-fachen Erhöhung des Körpergewichts zeigten *DIO* Tiere vor allem Veränderungen im Cholesterinstoffwechsel. *DIO* Tiere wiesen im gefasteten Zustand eine 3-fache Erhöhung der Gesamtcholesterin-konzentration auf, während die Triglyzeridkonzentration des Plasmas unverändert blieb - siehe Tabelle 2. Auch die Lipoproteinkonzentrationen veränderten sich. So verursachte die HFD bei C57BL/6 Mäusen einen 2-fachen Anstieg sowohl der HDL- als auch der VLDL/LDL- Konzentration, das Verhältnis von HDL- zu VLDL/LDL- Lipoproteinen blieb dabei konstant [61].

Diät	Gesamt Cholesterin (mg/dl)	HDL- Cholesterin (mg/dl)	Gesamt Triglyceride (mg/dl)	Glukose (mg/dl)	Insulin (ng/ml)
Chow	69	42	29	167	0,72
HFD	185	108	19	182	1.81

Tabelle 2: Plasma gefastet (4h) Lipid-, Glukose- und Insulinkonzentration bei C57BL/6 Mäusen die mit Kontrolldiät oder HFD gefüttert wurden.

Die Mäuse wurden für 14-16 Wochen mit der spezifischen Diät gefüttert und vor der Gewinnung des Plasmas für 4 Std. gefastet. TC: Gesamt Cholesterin, TG: Triglyzeride. Quelle: S. A. Schreyer et al. [61].

Hayek et al. konnte zeigen, dass Mäuse die mit HFD gefüttert wurden, erhöhte HDL-Cholesterinkonzentrationen aufwiesen. Ursächlich dafür ist einerseits eine gesteigerte Syntheserate und andererseits eine verringerte Abbaurate des HDL-Cholesterins [22]. Die HFD führt über eine erhöhte Syntheserate des Apolipoprotein A-I, durch vermehrte Aktivierung der LCAT, zu einer Erhöhung der Konzentration cholesterinreicher HDL im Plasma. Es entstehen so deutlich größere HDL-Lipoproteine. Es wird vermutet, dass auf Grund der Größe der HDL der Katabolismus verzögert ist [67].

Neuere Studien lassen außerdem vermuten, dass die Ursachen der Dyslipidämien bei insulinresistenten *DIO* Tieren vor allem in einem veränderten Stoffwechsel des Fettgewebes zu finden sind. Ein

Schlüsselenzym im Fettstoffwechsel des Fettgewebes ist die Hormon sensitive Lipase (HSL). Die HSL katalysiert die Hydrolyse von Tri-, Di-, und Monoglyzeriden zu freie Fettsäuren (FFA) und Glycerol, diese werden dann ins Plasma abgegeben und vor allem vom Lebergewebe verstoffwechselt. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität der HSL durch Insulin gehemmt, was postprandial einen Abfall der Plasmakonzentration an freien Fettsäuren und Glycerol zur Folge hat. Bei Insulin Resistenten Tieren zeigen sich jedoch erhöhte FFA-Werte im Plasma. Ob die Erhöhung der FFA im Plasma insulinresistenter *DIO* Tiere einerseits durch die Insulin Resistenz des Fettgewebes oder andererseits durch die relative Zunahme des Fettgewebes hervorgerufen wird, ist nicht eindeutig bewiesen [51]. Untersuchungen an HFD-gefütterten HSL „Knock-out“ Mäusen zeigten, dass diese Tiere resistent gegenüber der Entwicklung der Diät Induzierte Adipositas waren. Sie zeigten außerdem eine deutlich geringere Freisetzung von FFA ins Plasma. Die „knock-out“ Mäuse waren um ca. 20% leichter, wiesen eine deutliche Verringerung der Hydrolyse von Triglyzeriden und Cholesterinestern im Fettgewebe auf und zeigten eine starke Abnahme des subkutanen Fettgewebes bei einem um ca. 42% verringerten Gehalt an Triglyzeriden [21]. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Aktivität der Hormon sensitiven Lipase bei der Entwicklung der *DIO* bei der Insulin Resistenz eine Schlüsselrolle spielt. Die, durch die erhöhte Aktivität der HSL bei der Insulin Resistenz, vermehrt freigesetzten FFA werden von der Leber aufgenommen, wo sie zu einer vermehrten Synthese von VLDL Apolipoproteinen führen. Diese VLDL gelangen dann vermehrt in die Zirkulation.

Ein weiteres Schlüsselenzym, das für die Veränderungen im Lipoproteinhaushalt bei *DIO* Tieren verantwortlich zu sein scheint, ist die Lipoprotein Lipase (LPL). Die LPL katalysiert die Spaltung von VLDL & Chylomikronen. Die dabei freigesetzten Fettsäuren werden von Fett- und Lebergewebe aufgenommen und zur Triglyzeridbiosynthese verwendet. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität der LPL durch Insulin im Muskelgewebe supprimiert, während sie im Fettgewebe durch Insulin gesteigert wird. Bei Versuchen an *DIO* Ratten konnte Picard Veränderungen der Aktivität der LPL bei der Insulinresistenz nachweisen. Die Tiere wurden über mehrere Wochen mit HFD, eine Kontrollgruppe mit

normaler Kontrolldiät gefüttert, woraufhin sich bei der HFD-Gruppe *DIO* einstellte. Diese Tiere zeigten postprandial eine um 70% höhere Triglyzeridkonzentration im Plasma, wobei das Zeitintervall des Auftretens der TG nach Nahrungsaufnahme in beiden Gruppen gleich war. Man vermutete daher eine Abnahme des Katabolismus der TG im Plasma der *DIO* Ratten. Die Untersuchung der LPL zeigte eine normale Aktivität der LPL im Muskelgewebe aber eine Aktivitätsabnahme der LPL im Fettgewebe der Tiere. Während die LPL der Kontrolldiät Tiere um das 2-4-fache stieg, konnte bei *DIO* Tieren nur eine Zunahme der Aktivität um ca. 30% nachgewiesen werden. Diese Versuche zeigten, dass in den *DIO*-Ratten die Insulinresistenz einen LPL-Mangel im Fettgewebe verursachte. Dies führte zur Abnahme des TG Abbaus im Fettgewebe und so zu erhöhten postprandialen TG Konzentrationen [54]. Weiterhin konnte in *DIO* Ratten eine Abnahme des VLDL-Rezeptors im Muskel- und Fettgewebe nachgewiesen werden [6]. Dies scheint eine weitere Ursache für den reduzierten TG Katabolismus bei insulinresistenten *DIO* Tieren zu sein.

Zusammenfassend ist zu vermuten das sich die Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel bei *DIO* Mäusen einerseits durch die vermehrte Synthese TG-reicher Lipoproteine in der Leber, bei erhöhtem Angebot an freien Fettsäuren, und andererseits durch die Abnahme des Chylomikronen- und VLDL Abbaus in Muskel- und Fettgewebe, erklären. Da *DIO* Mäuse im Gegensatz zu *DIO* Ratten nicht mit einer Erhöhung der Plasma Triglyzeridkonzentration bei HFD reagieren, ist es nicht möglich, die Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel bei *DIO* Mäusen und Ratten direkt zu vergleichen.

1.3 Genexpression von Proteinen des Lipoproteinstoffwechsels bei der Insulin Resistenz

Das Insulin Einfluss auf den Lipidhaushalt nimmt, wird durch die charakteristischen Veränderungen im Lipid- und Lipoproteinhaushalt bei Patienten mit Insulinresistenz und T2DM deutlich. Wie und wo aber nimmt Insulin Einfluss auf den Lipidstoffwechsel?

Die charakteristischen Veränderungen sind in erster Linie eine deutliche Zunahme der VLDL- und eine Abnahme der HDL- Lipoproteinfraktion. Eine Ursache für die Hypertriglyzeridämie bei T2DM Patienten ist die Überproduktion von VLDL-Triglyzeriden, dafür scheinen einerseits ein Überangebot an Lipiden in den Hepatozyten und andererseits eine Resistenz der Hepatozyten gegenüber Insulin verantwortlich zu sein [45, 55, 56]. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese und Sekretion der VLDL-Triglyzeride maßgeblich durch den Apo-B Metabolismus in der Leber beeinflusst ist und das erhöhte Plasmatriglyzeridspiegel zu vermehrter Sekretion von Apo-B aus der Leberzelle führen [19, 52]. Dies konnte durch Ergebnisse aus dem Tierversuch bestätigt werden, dort stieg der Apo-B Spiegel nach i.v. Gabe einer triglyzeridhaltigen Lösung deutlich an [78]. Neben dem Triglyzeridspiegel scheint auch Insulin direkt Auswirkungen auf den Apo-B Metabolismus zu haben. Ergebnisse aus Tierversuchen, der Zellkultur und dem Menschen zeigten, dass Insulin über eine Zunahme des Apo-B Abbaus die Sekretion und Speicherung von VLDL-Triglyzeriden hemmt [53, 71]. Es ist zu vermuten, dass Insulin über zwei Wege den Abbau von Apo-B fördert. Einerseits aktiviert Insulin die P-1-3 Kinase die am Abbau des Apo-B beteiligt ist [66, 71]. Außerdem senken Insulin und hohe Glukosespiegel den mRNA Spiegel des MTP (microsomal triglycerid transfer Protein), das für die Lipidierung und die Sekretion des Apo-B in der Leberzelle notwendig ist [43]. Untersuchungen an T2DM Patienten zeigten, dass bei hepatischer Insulinresistenz die VLDL-Produktion und die Apo B100 Synthese durch Insulin nicht beeinflusst wird [41, 45].

Eine weitere Ursache für die Zunahme der VLDL-Triglyzerid Spiegel bei T2DM Patienten liegt in einer Steigerung der Lipogenese der Leber [26, 62]. Eines der Schlüsselenzyme der hepatischen Lipogenese ist das *sterol response element binding protein isoform 1c* (SREBP-1c), das Horton et al. als das, für die Regulation der de novo Lipogenese in der Leber, verantwortliche Protein erkannte [29]. Die Zunahme der SREBP-1 Expression führt über die Aktivierung der Acetyl-CoA Carboxylase und der Fettsäuresynthase zu einer Aktivierung der de novo Lipogenese. Shimamura et al zeigte in Versuchen an Mäusen eine Abnahme der mRNA Spiegel des intrazellulären Insulinsignal übertragenden Proteins

(IRS) nach chronischer Hyperinsulinämie. Diese induzierte eine hepatische Insulinresistenz. Trotz der Insulinresistenz des Lebergewebes war die Stimulation der SREBP-Synthese nicht eingeschränkt [64]. Ergebnisse aus Mäusen die im Lebergewebe keinen Insulin - Rezeptor exprimieren, sog. LIRKO Mäuse, lassen ebenfalls vermuten, dass Insulin Einfluss auf den SREBP-1 Metabolismus hat. Bei diesen Tieren waren die SREBP-1 Spiegel deutlich niedriger, auch die Triglyzeridsekretion war reduziert [19].

Neben der VLDL-Synthese scheint Insulin auch Einfluss auf den Katabolismus der VLDL-Triglyzeride zu haben, indem es zum einen den LPL-Spiegel und zum anderen den LDL-Rezeptorspiegel beeinflusst.

In Zellkulturstudien mit menschlichen Fettzellen wurde bewiesen, dass Insulin einerseits über die Genexpression und andererseits über die LPL-Syntheserate die Aktivität der LPL fördert [17]. Neben dem direkten Einfluss wirkt sich die Anwesenheit des Insulins auch indirekt auf den LPL- Stoffwechsel aus. Das Apolipoprotein Apo CIII wirkt als Inhibitor der LPL. Seine Expression wird ebenfalls durch Insulin reguliert und wird in insulinresistenten Geweben vermehrt exprimiert [10]. Der entstehende relative Mangel an LPL-Aktivität könnte so zu Störungen des VLDL-Katabolismus führen. Der LDL-Rezeptor ist ein wichtiger Bestandteil des Lipoprotein-Stoffwechsels. Auch dieses Protein wird durch Insulin beeinflusst. Es wird vermutet, dass durch Insulin die Genexpression des LDL-Rezeptors induziert wird [13, 68]. Patientenstudien ergaben, dass die Expression des LDL-R. bei T2DM- Patienten – im Vergleich zu gesunden Probanden – um 41% reduziert war und nach 3 monatiger Insulintherapie um 75% anstieg. Vermutlich ist dies eine Ursache für den bei Patienten mit Insulinresistenz verzögerten Abbau von VLDL und deren Remnants [13].

2 Ziel der Arbeit

In dieser Promotionsarbeit sollte die komplexe Beziehung zwischen Übergewicht, Lipidstoffwechsel und Insulinresistenz im Mausmodell charakterisiert werden. Die molekularen Mechanismen, die zu Störungen des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels bei der Entwicklung der Insulinresistenz führen, sind weitgehend unbekannt. Da davon ausgegangen werden kann, dass primär Veränderungen der stoffwechselaktiven, insulinsensitiven Organe für Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel verantwortlich sind, müssen die Untersuchungen im Tiermodell durchgeführt werden. Für diese Untersuchungen wurde das C57BL/6 Mausmodell gewählt. Dieser Mausstamm wird in vielen Forschungsgebieten verwendet und ist besonders für die Arteriosklerose- und Diabetesforschung geeignet, da diese Tiere durch eine „Hochfett-diät“ (HFD) Übergewicht und Insulinresistenz entwickeln. Das Diät Induzierte Adipositas (*DIO*) Mausmodell kommt somit der durch Überernährung hervorgerufenen, menschlichen Insulinresistenz recht nahe.

Um die komplexen Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel bei der Insulinresistenz besser zu charakterisieren, wurden im ersten Teil dieser Arbeit Lipoproteinprofile der *DIO*-Mäuse erstellt, die mit entsprechenden Kontrolltieren verglichen wurden. Im zweiten Teil sollte die Expressionshöhe verschiedener, für den Lipoproteinstoffwechsel wichtiger Proteine in den für die Insulinsensitivität wichtigsten Organen – wie Leber, Muskel und Fettgewebe bestimmt werden. Mit diesem Ansatz sollten frühe Veränderungen im intravaskulären und organspezifischen Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel detektiert werden, um neue Erkenntnisse zur Entstehung der Diät induzierten Insulinresistenz zu erlangen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

- Blottingkammer und Zubehör (Biorad)
- Elektrophoresekammer Desaphor VA, Glasplatten und Zubehör (Desaga)
- Elektrophoresekammer für Minigele und Zubehör (BioRad)
- FPLC-Anlage für Gelfiltration (Pharmacia)
- Polytron
- Thermomixer compact (Eppendorf)
- IKA-Vibrax-VXR (Janke&Kunkel)
- Biotech Processor Plus (Amersham Pharmacia)
- Laborzentrifuge Minifuge T (Heraeus)
- pH-Meter (Mettler Toledo)
- Powersupply (LKB, Biorad)
- Rollenmischgerät RM5 (Assistent Deutschland)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus), 1-15K (Sigma)
- Ultrazentrifuge (Beckman) mit Festwinkelrotor TLA-100.2

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Von der Aufzählung ausgenommen sind Verbrauchsmaterialien, die zur Standardausrüstung eines Labors gehören wie z. B. Glaswaren, Reaktionsgefäße und Petrischalen.

- Alle Plastikwaren für die Zellkultur von Nunc oder Falcon
- Blotmembran aus Nitrocellulose Porengröße 0,45 µm (Portran)
- Gelblotting-Papier (Schleicher & Schuell)
- Hämatokritkapillare
- Multiwellplatten (Packard) und Einmalküvetten (Brand)
- Objektträger und Präparationsbesteck (Roth)
- Photokassette (rego)
- Röntgenfilme Scientific Imaging Film Biomax MR (Kodak)

- Sterilfilter 0,45 µm und 0,2 µm (Schleicher & Schuell)
- Superose®6 HR 10/30 (Pharmacia LKB Biotech)
- Zentrifugenröhrchen Polyallomer 14 x 89 mm (Beckmann)

3.1.3 Chemikalien, Proteine und Enzyme

Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien, Enzyme und Proteine wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), oder Sigma Chemie (Steinheim) in analytischer (p. A.) bzw. in HPLC-Reinheit bezogen.

Rainbow-Marker RPN 756 und 800 (alles Amersham Pharmacia); steriles H₂O, Albumin-Standardlösung (Pierce);

3.1.4 Kits

- Amplex™ Red Cholesterin Assay Kit (Molecular Probes)
- Enzymatischer Farbtest für Cholesterin nach CHOD-PAP (Roche)
- Enzymatischer Farbtest für freie Fettsäuren NEFA (Wako)
- Enzymatischer Farbtest für freies Cholesterin (Wako)
- Enzymatischer Farbtest für Phospholipide (Roche)
- Enzymatischer Farbtest für Triglyzeride nach GPO-PAP (Roche)
- Proteinassay (Biorad)

3.1.5 Antikörper

Antikörper	Spezies	Typ	Hersteller	Verdünnungen
anti β-Actin	Maus	monoklonal	Sigma	
anti SRB-1	Kaninchen	polyklonal	Jean-Charles Fruchard, Frankreich	1:30000
anti Apo B	Kaninchen	polyklonal	Calbiochem	1:1000
anti Apo E	Kaninchen	polyklonal	DAKO	1:5000
anti Apo C	Kaninchen	polyklonal	Biodesign	1:500
anti aP2	Kaninchen	polyklonal	zur Verfügung gestellt von Lilly	1:2000
anti FAS	Maus	monoklonal	BD Transduction Laboratories	1:1000

anti LDL-R	Huhn	polyklonal IgY	Progen	1:100
anti LRP (Dolly)	Schaf	polyklonal	Heeren JBC et al 2001	1:250
anti IR	Schaf	polyclonal	Santa Cruz	1:100
anti IRS-1	Schaf	polyclonal	Upstate Signalling	1:1000
anri IRS-2	Schaf	polyclonal	Upstate Signalling	1:1000
anti Maus PO	Ziege	IgG	Jackson	1:2500
anti Huhn PO	Kaninchen	IgY	Jackson	1:2500
anti Kaninchen PO	Ziege	IgG	Jackson	1:2500
anti Kaninchen Cy2	Ziege	IgG	Jackson	1:250

Tabelle 1: verwendete Antikörper

3.1.6 Mäuse

C57BL/6 Generation und Organgewinnung in den USA. In Abbildung 1 ist das Fütterungsprotokoll schematisch dargestellt.

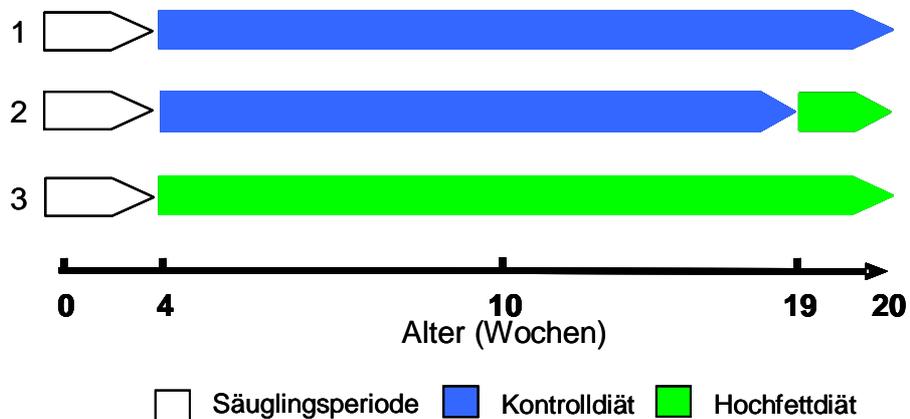


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fütterungsprotokolls der C57BL/6 Mäuse.

Die Gruppe 1 wurde für 16 Wochen mit der Kontroll diät gefüttert. Die Gruppe 2 wurde für 15 Wochen mit der Kontroll diät und abschließend 1 Woche mit der Hochfett diät gefüttert. Die Gruppe 3 wurde für 16 Wochen mit der Hochfett diät gefüttert.

3.2 Methoden

3.2.1 Proteinextraktion

Puffer

- Homogenisierungspuffer (10 mM Natriumacetat pH 5; 0,1M DTT)
- PIC (10 mM Antipain; 10 mM Chymostatin; 10 mM Leupeptin; 1 mM Pepstatin; 1 mM PMSF; 50 % DMSO)
- Resuspensionspuffer (10 mM Natriumacetat pH 5; 0,1M DTT; 1 % (v/v) Triton-X-100)

Methode

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt; direkt vor Verwendung des Homogenisierungs- und des Resuspensionspuffers wurden beide 1:1000 mit PIC versetzt. Es wurden jeweils 200-230 mg Leber, 200-250 mg Subcutan adipose tissue, 200-270 mg Epididymal adipose tissue und 200-230 mg Muskel mit 1,2 ml Homogenisierungspuffer versetzt und mit einem Polytron für 2x 20 sec. homogenisiert. Das Homogenat wurde zweimal 15 min mit 800 g (4000 rpm) zentrifugiert und jeweils der Überstand weiterverwendet. Der Überstand wurde mit einer Beckman TL-100 Ultrazentrifuge in einem TLA-100.2 Festwinkelrotor 1 h bei 4 °C bei 55000 rpm (100000 g) zentrifugiert. Nun wurde der Überstand (Zytosol) abgenommen, das Beckmann Röhrchen mit 500µl Homogenisierungspuffer gefüllt und ein zweites Mal in der Ultrazentrifuge für 15 min. bei 55000 rpm (100000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen. Das Pellet in 400 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und erneut homogenisiert und, wie oben beschrieben, 30 min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Durch das im Resuspensionspuffer enthaltene Triton-X-100 wurden die Membranen lysiert. Im Überstand befanden sich zum einem Membranproteine sowie Proteine aus membranumhüllten Kompartimenten (Peroxisomen, Endosomen, Lysosomen). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration, wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Proteinbestimmung

Puffer

- Lösung A: 2%ige Lösung von Na_2CO_3 + K-Na- Tartrat in 0,1N NaOH
- Lösung B: 0,5%ige Lösung von $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Lösung C: 50 ml Lösung A + 1ml Lösung B (kurz vor Gebrauch mischen)

- Albumin-Standardlösung (Pierce)
- Folin-Reagenz

Methode (Lowry et al., 1951)

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht darauf, dass die Proteine zunächst mit einer alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. In einem nachfolgendem Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit dem Cu^{2+} komplexierten Proteine. Der Kupfer – Protein Komplex bewirkt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form von Heteropolyphosphorsäuren vorliegen. Molybdat bzw. Wolframat werden von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV reduziert. Es entstehen Mischoxide zwischen jeweils VI- und IV- wertigem Molybden bzw. Wolframat. Die Reduktion des Folin-Reagenzes erfolgt. Die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan reduzieren darüber hinaus das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexierung mit dem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz.

Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von Geld nach Blau. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt.

Für die Bestimmung wurden 20 μL der Probe ad 100 μL mit 0,1 M NaOH aufgefüllt, dann 1ml Substanz C zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl Folin-Reagenz und gründlichem Mischen wurde 30 min. im Dunkeln inkubiert. Als Standard diente bovines Serumalbumin. Die Proben wurden anschließend auf eine 96 Well Platte übertragen und in einem Photometer bei 750 nm gemessen. Als Referenz zur Berechnung der OD-Werte diente ein substratfreier Ansatz.

3.2.3 Gelfiltration

Puffer

- Amplex™ Red Cholesterin Assay Kit (Molecular Probes)
- Enzymatischer Farbttest für Cholesterin nach CHOD-PAP (Roche)
- Enzymatischer Farbttest für Triglyzeride nach GPO-PAP (Roche)
- FPLC-Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl 10 mM EDTA, pH 8,6)
- Precinorm, Precipath (Roche)

Methode (Rudel et al. 1986)

Um die Lipoproteine entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde die Gelfiltration eingesetzt. Dazu wurde eine FPLC®-Anlage (Pharmacia) mit einer Superose®-6-Säule verwendet, die einen für Plasmalipoproteine optimalen Trennbereich von 5-5000 kD besitzt. 75-200 µL Plasma wurden auf die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in FPLC-Puffer aufgetrennt. Das Eluat wurde in 0,5-mL-Fractionen gesammelt. In den Fractionen wurde Cholesterin und Triglyzeride photometrisch mit den oben genannten Farbtests gemessen, die Standardisierung erfolgte mit Precipath oder Precinorm.

3.2.4 Westernblotanalyse**3.2.4.1 Proteinextraktion aus Leber, Subkutan-, Epididymalfett und Muskel**
Puffer

- Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 mM MgCl₂; 0,25 M Sucrose)
- PIC (10 mM Antipain; 10 mM Chymostatin; 10 mM Leupeptin; 1 mM Pepstatin; 50 % DMSO)
- Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 2 mM CaCl₂; 1 % (v/v) Triton-X-100)

3.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)Puffer

- Elektroden-Oberpuffer (0,04 M Borsäure; 0,04 M Tris-HCl 0,1 % SDS; pH 8,6)
- Elektroden-Unterpuffer (0,42 M Tris-HCl pH 9,5)
- Probenpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 8 % Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % β-Mercaptoethanol)
- Proteinstandard Rainbow Marker RPN 756 oder RPN 800 (Amersham)
- Sammelgel (3 %) (3 % Acrylamidlösung; 0,2M Tris-HCl, pH 6,14; 20µl TEMED; 10 % APS)
- Trenngel (7,5 %) (4,5ml Aquadest, 2ml Untergelpuffer: 1,7M Tris pH 9,18; 1,5ml 7,5% Acrylamid(Bis Biorad), 40µl 10% APS (frisch!);10µl Temed (Serva))

Methode

Das Trenn- und das Sammelgel mit oben beschriebener Zusammensetzung wurden nacheinander gegossen. Es wurden jeweils 10 bis 50 µg Protein in die SDS-PAGE eingesetzt und auf 8-12%igen Gelen untersucht. Es wurden jeweils drei Teile Probe mit 2 Teilen Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden 10 min bei 45 °C und 1400 rpm im

Thermomixer reduziert. Zusätzlich zu den Proben wurden Marker (Rainbow Marker) mit Proteinen definierter Größe und eine BSA-Kontrolle (Molekulargewicht 69 kDa) aufgetragen. Die Proben liefen im Gel bei 30 mA (großes Gel) bzw. 10 mA (Minigel) und konstanter Spannung. Da alle Proteine negativ geladen sind (SDS), wurden sie auf dem Weg von der Kathode zur Anode ihrer Größe nach aufgetrennt.

3.2.4.2 Westernblot

Puffer

- Blocklösung (10 % Milchpulver Blotting Grade Non-Fat Dry Milk (BioRad), 5 % BSA Fraction V (PAA Laboratories) in Waschpuffer A)
- Blotting-Puffer (150 mM Glyzin; 20 mM Tris, 20 % Methanol)
- Entwicklungslösung I (Lösung A (4°C): 200ml 0,1M Tris-HCL pH 8,6, 50mg Luminol (Sigma A4685), Lösung B (RT): 11mg para-Hydroxysoumarinsäure (Sigma C 9008), In 10ml DMSO. Lösung C (4°C): H₂O₂ 30%) Pro Minigelmembran: 2ml Lösung A, 200µl Lösung B, 0,6µl Lösung C
- Ponceau-Färbelösung (0,2 % in 3 % Trichloressigsäure)
- primäre und sekundäre Antikörper siehe Tabelle 1
- Waschpuffer A (154 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,1 % Tween 20, pH 7,4)
- Waschpuffer B (154 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,1 % Tween 20; 0,25 % Natrium-desoxycholat; 0,1 % SDS, pH 7,4)

Methode

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden im Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (bei 4 °C und konstanter Spannung: 4 h bei 400 mA oder 20 h bei 200 mA). Zur Lade- und Transferkontrolle wurde die Membran nach dem Blotvorgang mit Ponceau-Lösung gefärbt und für die Inkubation mit den unterschiedlichen Antikörpern zurecht geschnitten. Die Streifen wurden in PBS entfärbt und 2 h in Blocklösung behandelt. Die Blocklösung wurde mit Waschpuffer A abgespült und die Membran mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die folgenden Schritte wurden durch das Gerät „Processor Plus“ (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Waschen (1 min in Waschpuffer A, 2 x je 10 min in Waschpuffer B, 1 min in Waschpuffer A), Auftragen und Inkubation des entsprechenden, Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper für 2 h bei RT. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper ist unter 0 angegeben. Anschließend erneutes, wie oben beschrieben, waschen und spülen der Membran in PBS. Für die Entwicklung wurden beide frisch angesetzten Entwicklungslösungen vereint, der Blot zwischen 60 sec und 3 min mit

dem ECL-Substrat inkubiert, das Substrat anschließend entfernt, mehrere Röntgenfilme mit unterschiedlich langen Expositionszeiten auf den Blot aufgelegt und entwickelt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase reagiert mit dem Luminol der Entwicklungslösung und der als Enhancer fungierenden Cumarinsäure unter Bildung eines Chemilumineszenzsignals (ECL=Enhanced Chemoluminescence), das die markierten Proteine als dunkle Banden auf hellem Röntgenfilm sichtbar werden lässt.

3.2.5 Statistik

Die Auswertung und Darstellung von Messdaten erfolgte mit der Software Microsoft Excel. Es sind jeweils die Mittelwerte, sowie die Standardfehler der Fehler (\pm SEM) dargestellt. Mit Hilfe des Student's t-test für unabhängige Stichproben wurden die Signifikanzen zweier Gruppen überprüft. Als statistisch signifikant wurde angesehen, wenn $<0,05$.

4 Ergebnisse

Um den Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel bei Diät Induzierter Insulinresistenz besser zu charakterisieren wurde das C57BL/6 Mausmodell gewählt. Es wurden 6 Gruppen miteinander verglichen: 1.) C57BL/6 12 Wochen Kontrolldiät 2.) C57BL/6 11 Wochen Kontrolldiät 1 Woche HFD und 3.) *DIO* C57BL/6 12 Wochen HFD. Bei diesen 3 Gruppen wurden die Proben im gefasteten und postprandialen Zustand entnommen, so dass insgesamt 6 Gruppen mit je 8 Tieren vorlagen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden aus dem Plasma der Tiere Lipide bestimmt und Lipoproteinprofile erstellt.

Im zweiten Teil wurde die Expression wichtiger Proteine des Insulin-Signalling, des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels analysiert.

4.1 Lipidcharakteristik und Lipoproteinprofile in Plasmen von Kontrolldiät und HFD gefütterten Mäusen

4.1.1 Plasmalipidcharakteristik von Kontrolldiät und HFD gefütterten Mäusen

Zunächst wurden im Plasma von jeweils 8 Mäusen die Lipide im gefasteten und gefütterten Zustand analysiert. Die Plasmalipide wurden enzymatisch mit Kits von Roche oder Wako nach Herstellerangaben bestimmt (Abb. 1).

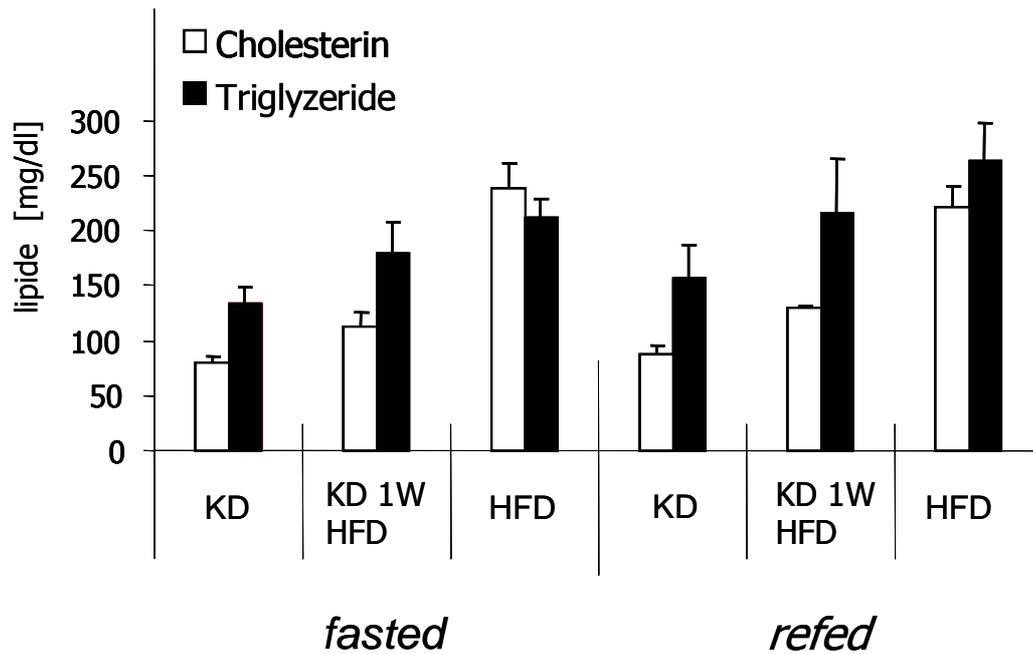


Abbildung 1: Lipidparameter von Mausplasmen nach HFD und Kontrolldiät im gefasteten und im gefütterten Zustand

KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfettdiät, HFD: Hochfettdiät.

Es wird deutlich, dass *DIO* Mäuse sowohl im gefasteten als auch im gefütterten Zustand eine höhere Plasmacholesterinkonzentration aufweisen als die Mäuse, die mit der Kontrolldiät gefüttert wurden. Bei der Gruppe, die nach 11-wöchiger Kontrolldiät eine Woche HFD (KD 1W HFD) erhalten hat, zeigt sich hingegen nur eine geringe Erhöhung der Cholesterinkonzentration im Plasma.

Bei der Plasmatriglyceridkonzentration zeigt sich ein ähnliches Bild, wobei hier der Einfluss des gefasteten und des gefütterten Zustandes geringer ausfällt.

4.1.2 Lipoproteinprofile im Plasma von Kontrolldiät und HFD-gefütterten Mäusen

Um mögliche Unterschiede der Plasmalipoproteine in den einzelnen Mausgruppen zu erkennen, wurde ein Lipoproteinprofil der Plasmalipoproteine erstellt.

Zur Auftrennung der Lipoproteine im Plasma der Mäuse wurde eine Superose 6 Säule von Pharmacia verwendet und über eine FPLC betrieben. Es wurden 100µl Plasma je Maus ad 180µl FPLC Puffer über die Säule gegeben, davon wurden 200µl appliziert und nach Trennung in 500µl Fraktionen eluiert. In diesen wurden Cholesterin und Triglyceride mit Kits von Roche gemessen. Die Standardisierung erfolgte mit Precinorm von Roche. Je Gruppe wurden acht Tiere einzeln analysiert (siehe Anhang) und der Mittelwert gebildet.

Das überwiegende Lipoprotein bei der Maus ist HDL (über 85% des Plasmacholesterins), das in den Fraktionen 21-27 eluiert. Die Triglyceridreichen Lipoproteine (VLDL im nüchternen bzw. VLDL und Chylomikronen im gefütterten Zustand) konzentrierten sich in den Fraktionen 7-10, die IDL in den Fraktionen 12-16 und LDL in den Fraktionen 17-19 (Abb. 2-5). In der Abbildung 2 sind zunächst die Cholesterinprofilen der verschiedenen Gruppen im Nüchternzustand gezeigt.

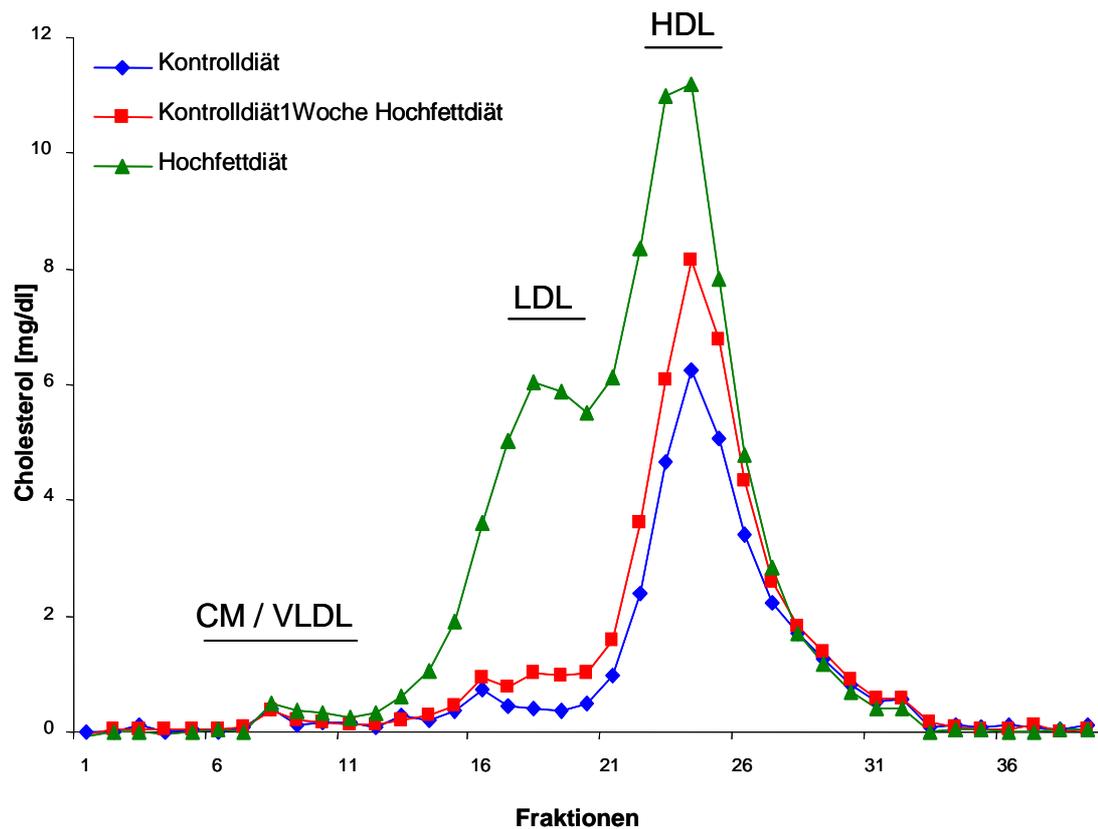


Abbildung 2: Cholesterinprofil nach FPLC von Kontrolldiät und HFD gefütterten Mäusen im gefasteten Zustand

Mit einer FPLC Superose 6 Säule von Pharmacia wurden die Plasmalipoproteine aufgetrennt. In den Fraktionen wurde die Cholesterinkonzentration enzymatisch mit Kits von Roche gemessen. Für jede Gruppe ist der Mittelwert von 8 Mäusen gezeigt.

Wie in Abbildung 2 ersichtlich, zeigt die *DIO* Gruppe eine deutlich höhere Konzentration an HDL-Cholesterin als die beiden Kontrollgruppen. Die HDL-Cholesterinkonzentration der *DIO* Mausplasmen liegt fast 100% über der der Kontrollgruppe. Bei den Kontrolldiät 1 Woche HFD Tieren fällt dieser HDL-Cholesterinpeak deutlich geringer aus.

Noch extremer zeigt sich der Unterschied der Cholesterinkonzentration beim LDL-Cholesterin. Hier liegt die LDL-Cholesterinkonzentration der *DIO* Mäuse ca. 6-fach über der LDL-Cholesterinkonzentration der Kontrollgruppen. Im Gegensatz zu den deutlichen Unterschieden in der Fraktion der LDL und HDL finden sich in der VLDL-Fraktion so gut wie keine Unterschiede. Neben den Lipoproteinprofilen der Mausplasmen im gefasteten Zustand, wurden auch die Lipoproteinprofile im gefütterten Zustand untersucht (Abb.3).

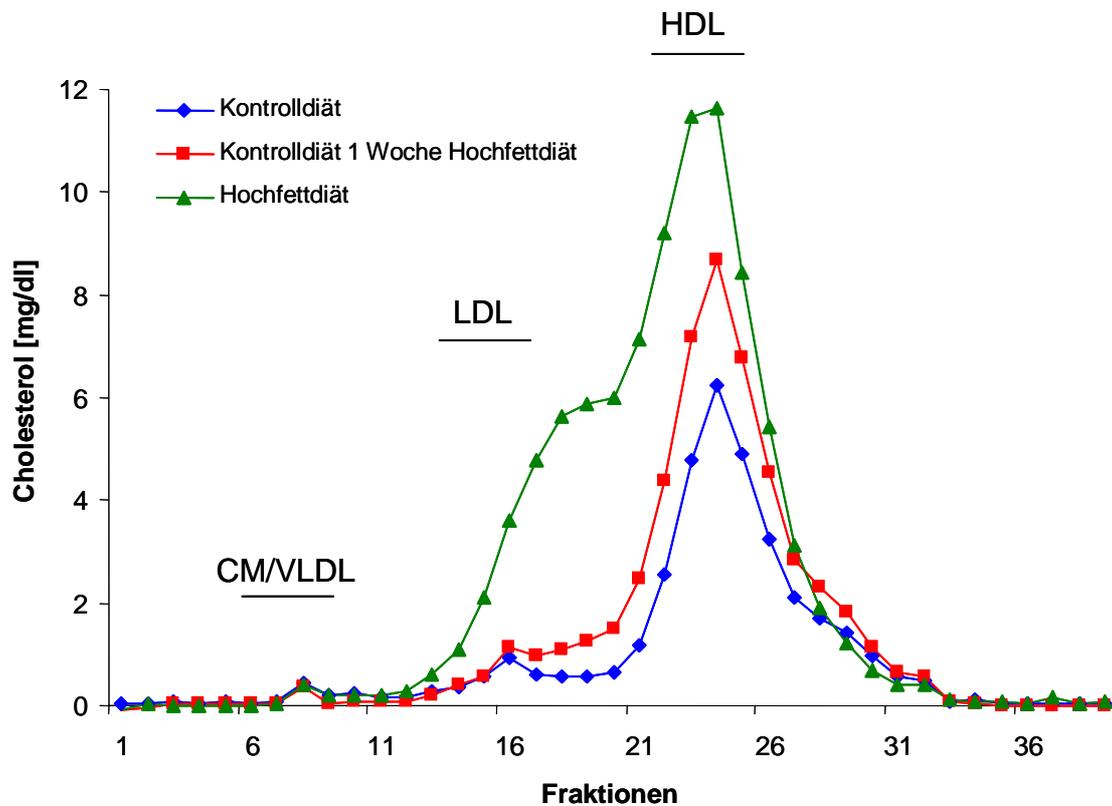


Abbildung 3: Cholesterinprofil nach FPLC von Kontrolldiät und HFD gefütterten Mäusen im gefütterten Zustand

Mit einer FPLC Superose 6 Säule von Pharmacia wurden die Plasmalipoproteine aufgetrennt. In den Fraktionen wurde die Cholesterinkonzentration enzymatisch mit Kits von Roche gemessen. Für jede Gruppe ist der Mittelwert von 8 Mäusen gezeigt.

Die Lipoproteinprofile in den Mausplasmen der einzelnen Gruppen zeigen im gefütterten Zustand ähnliche Konzentrationsunterschiede des Cholesterins wie im gefasteten Zustand. Hier lassen sich ebenfalls die extrem erhöhten Konzentrationen des LDL- sowie des HDL-Cholesterins in der *DIO* Gruppe nachweisen. Auch hier zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen 1 Woche HFD und KD.

Im postprandialen Zustand lassen sich in allen drei Gruppen geringfügig erhöhte Cholesterinkonzentrationen im Vergleich zum gefasteten Zustand messen, wobei das Verhältnis von *DIO*- zu den Kontrollgruppen nahezu identisch geblieben ist. Es wurden ebenfalls die Triglyceride in den Lipoproteinprofilen bestimmt (Abb. 4).

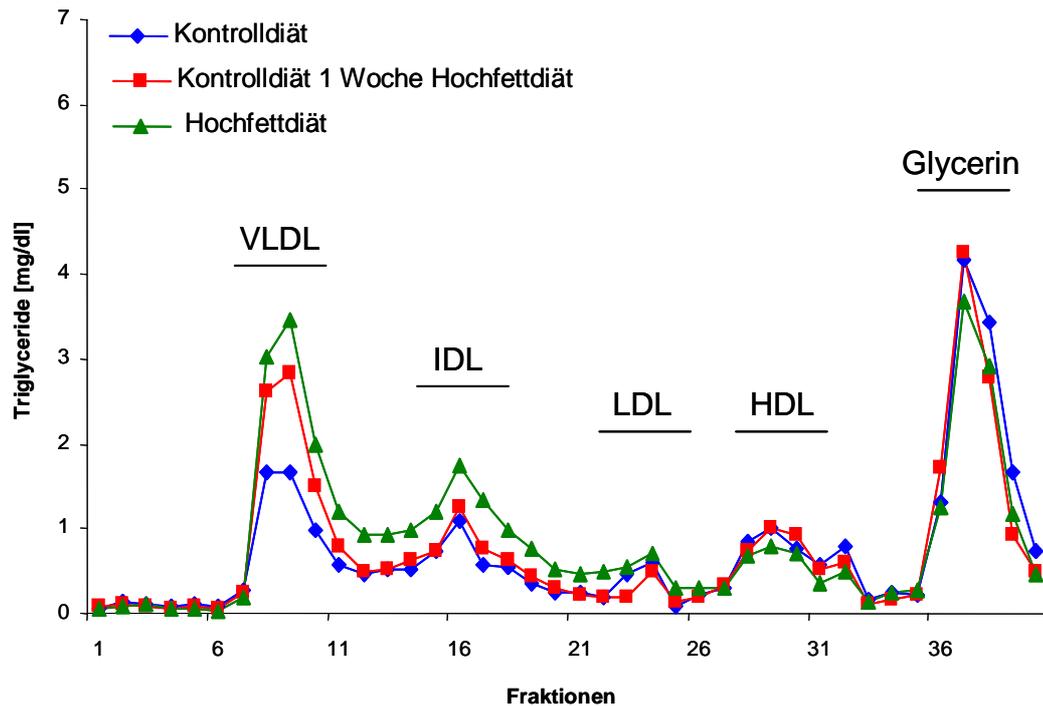


Abbildung 4: Triglyceridprofil nach FPLC von Kontrolldiät und HFD-gefütterten Mäusen im gefasteten Zustand

Mit einer FPLC Superose 6 Säule von Pharmacia wurden die Plasmalipoproteine aufgetrennt. In den Fraktionen wurde die Triglyceridkonzentration enzymatisch mit Kits von Roche gemessen. Für jede Gruppe ist der Mittelwert von 8 Mäusen gezeigt.

Im Gegensatz zur Cholesterinkonzentration zeigt die Triglyceridkonzentration der Plasmalipoproteinprofile nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, dass die *DIO*-Gruppe eine deutlich höhere Triglyceridkonzentration in der VLDL-Fraktion aufweist als die Kontrollgruppe. Die *KD-1Woche-HFD* Gruppe zeigt ebenfalls erhöhte Triglyceridwerte in der VLDL-Fraktion, die jedoch unterhalb der Werte der *DIO*-Gruppe zurückbleiben. Neben der VLDL-Fraktion zeigt die *DIO*-Gruppe auch erhöhte Triglyceridkonzentrationen in der IDL-Fraktion. Da der Kit zur Bestimmung von Triglyceriden Glycerin bestimmt, wurde in den Fraktionen 36-38 freies Glycerin gemessen. Um Unterschiede in der Triglyceridkonzentration zwischen postprandialem und präprandialem Ernährungszustand feststellen zu können, wurde auch hier die

Triglyceridkonzentration des Lipoproteinprofils der Mausplasmen im gefütterten Zustand bestimmt (Abb.5).

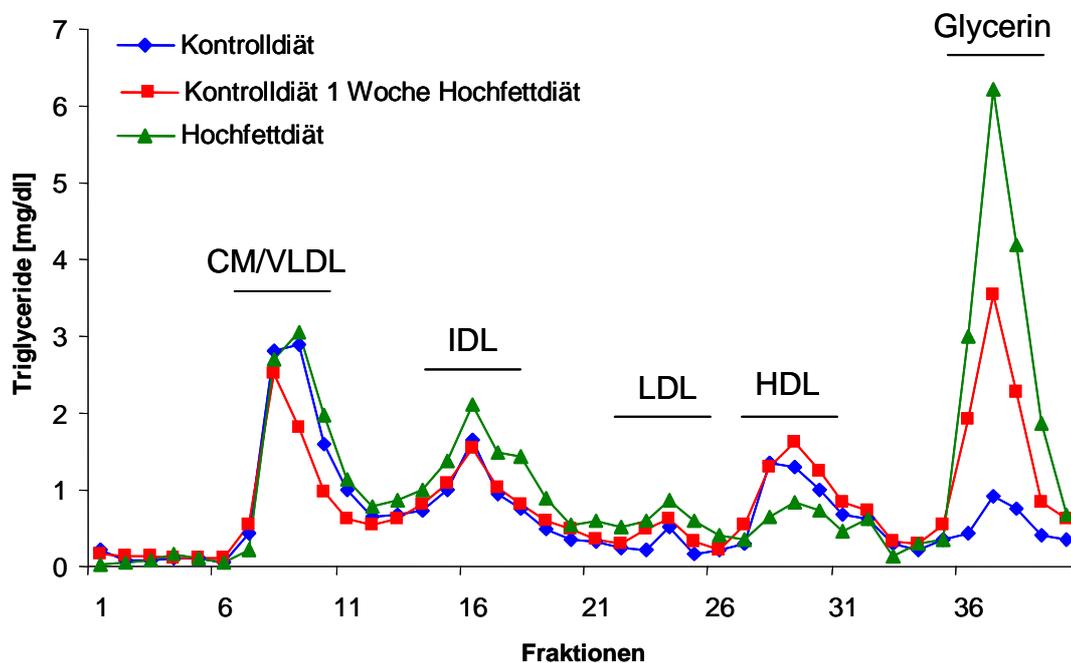


Abbildung 5: Triglyceridprofil nach FPLC von Kontrolldiät und HFD gefütterten Mäusen im gefütterten Zustand

Mit einer FPLC Superose 6 Säule von Pharmacia wurden die Plasmalipoproteine aufgetrennt. In den Fraktionen wurde die Triglyceridkonzentration enzymatisch mit Kits von Roche gemessen. Für jede Gruppe ist der Mittelwert von 8 Mäusen gezeigt.

Im gefütterten Zustand zeigt die Triglyceridkonzentration des Lipoproteinprofils neben einer leichten Erhöhung aller Fraktionen vor allem im Glycerin. Bei Tieren der Kontrolldiät-Gruppe scheint die CM / VLDL-Fraktion deutlich anzusteigen. Die *DIO*-Gruppe zeigt einen *Peak* in der Fraktion des Glycerins (Fraktion 36-38), die in beiden Kontrollgruppen deutlich geringer ausfällt. Die Konzentration des freien Glycerins liegt im Vergleich zur Kontrolldiätgruppe (KD) in der *DIO*-Gruppe um das siebenfache höher. Die Bestimmung von Glycerin im gefasteten und gefütterten Zustand ist ein sehr sensibler Marker zur Bestimmung der Insulinresistenz. Insulin bewirkt im postprandialen Zustand, dass die Freisetzung von Fettsäuren und Glycerin gestoppt wird. Das bedeutet, dass bei Insulinresistenz die Lipolyse nicht reduziert wird und deswegen die Glycerinwerte von der *DIO*-Gruppe auch postprandial erhöht bleiben.

4.2 Expression wichtiger Proteine des Insulinsignalling, des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels

Bei C57BL/6 Mäusen, die über mehrere Wochen mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert wurden entwickelt sich eine Stoffwechselstörung.

Wie im ersten Teil der Ergebnisse beschrieben, weisen diese *DIO*-Tiere eine deutlich erhöhte Cholesterinkonzentration vor allem in der LDL- aber auch in der HDL-Fraktion auf.

Um die Zusammenhänge zwischen HFD und der Entwicklung der *DIO* besser verstehen zu können, wurde die Expression ausgewählter Lipoproteinrezeptoren, Apolipoproteine sowie Schlüsselenzyme der Fettsäuresynthese (FAS) und wichtige Enzyme des Insulinsignalling untersucht.

In den nächsten Abbildungen sind Westernblottanalysen gezeigt. Hierfür wurden aus Leber, Muskel, epididymalen und subkutanen Fett der drei Mausgruppen (Kontrolldiät, Kontrolldiät 1 Woche Hochfettdiät und Hochfettdiät) Proteine aufgereinigt und über 7,5-12%ige Acrylamidgele und Gradientengele von Invitrogen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulose wurden dann regulatorisch wichtige Proteine des Insulin- und Lipidstoffwechsels mit spezifischen Antikörpern detektiert. Je Gruppe wurden drei Tiere ausgewählt .

Im zweiten Schritt wurden die Westernblottanalysen der Proteine aus Leber-, Muskel- und Fettgewebe mit Hilfe des „Image-Quant“ Programms (GE-Healthcare) quantifiziert. Dadurch konnte jeder Bande der Westernblottanalyse ein eindeutiger Wert gegeben werden. Die Unterschiede der Gruppen (Kontrolldiät, Kontrolldiät 1 Woche Hochfettdiät und Hochfettdiät) konnten so eindeutiger gegeneinander abgegrenzt werden. Die Kontrolldiät Gruppe diente als Kontrollgruppe, ihr wurde die Wertigkeit „1“ gegeben, die anderen Gruppen wurden ins Verhältnis zur Kontrollgruppe gesetzt.

Die Abbildung 6. zeigt die Expression verschiedener Schlüsselproteine des Insulinsignalling in der Leber.

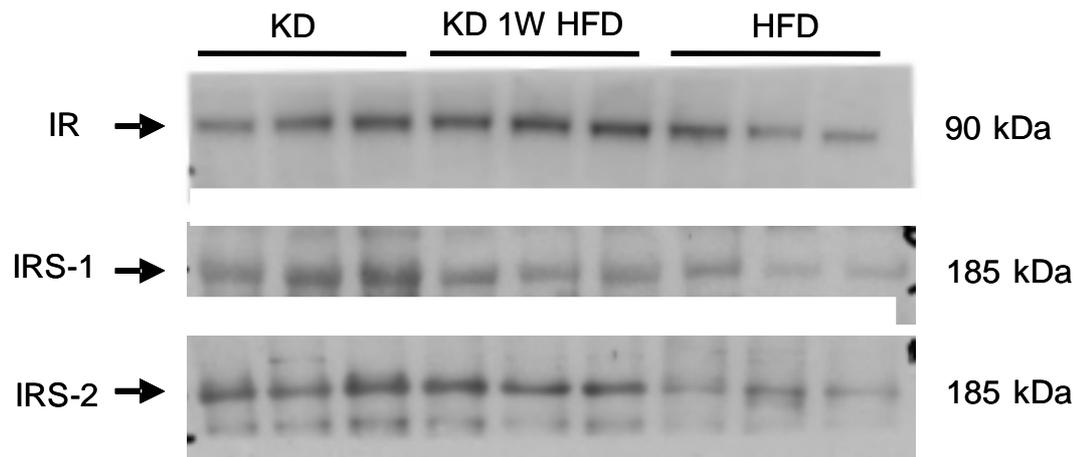


Abbildung 6: Westernblottanalyse verschiedener Schlüsselproteine des Insulinsignalling in der Leber

Es wurden jeweils 10 μ g Leberprotein pro Bahn und Maus über eine 10% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Leberproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. Die Detektion des β -Actin dient der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels (siehe Abb. 8). KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfettdiät, HFD: Hochfettdiät.

Abbildung 7 zeigt die Quantifizierung der Wesernblottanalysen verschiedener Schlüsselenzyme des Insulinsignalling aus Lebergewebe.

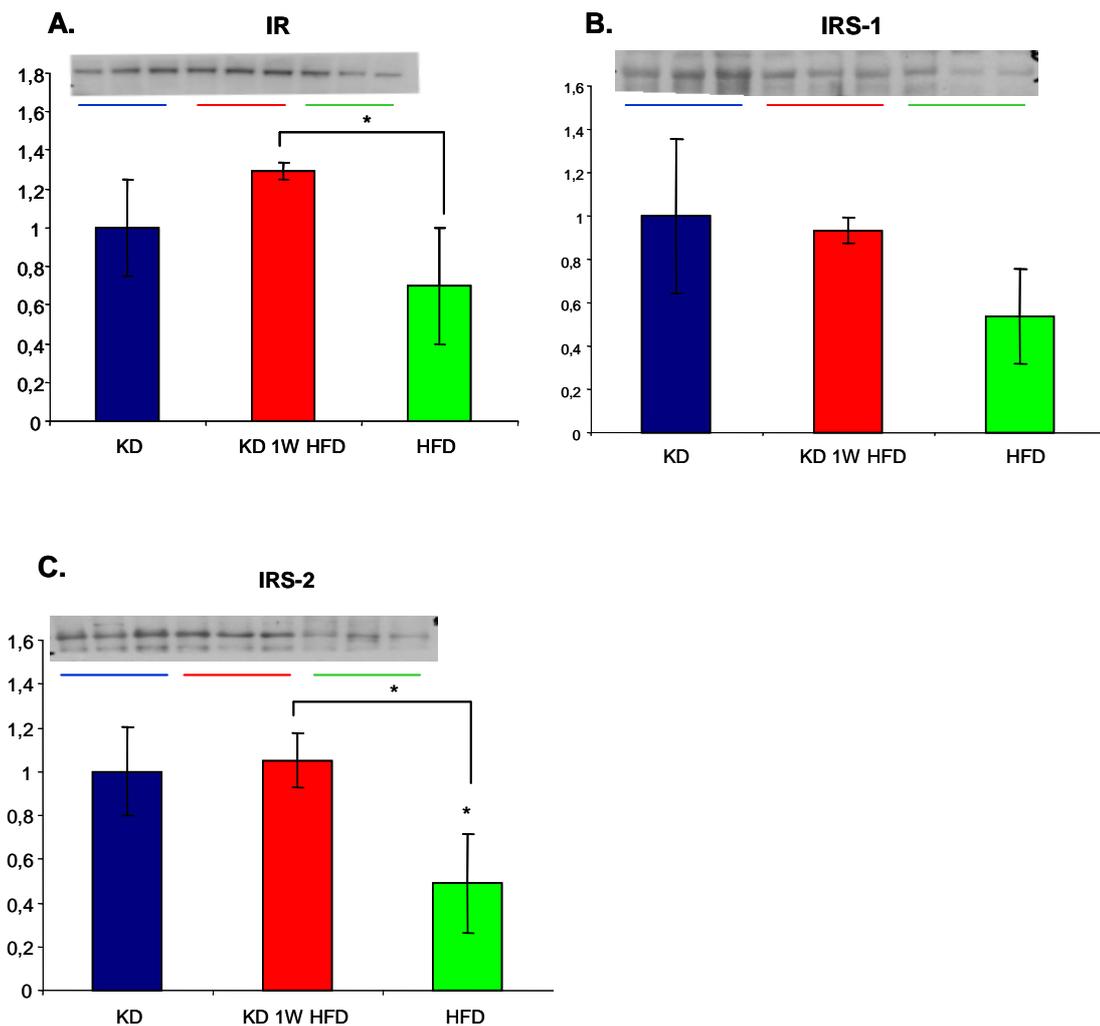


Abbildung 7: Quantifizierung von Westernblottanalysen aus Lebergewebe

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Insullinsignalling aus Lebergewebe. Abb. 7A: Insulin Rezeptor (IR), Abb. 7B: Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1), Abb. 7C: Insulin Rezeptor Substrat-2 (IRS-2). Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Lean-chow wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett-diät, HFD: Hochfett-diät. * = $p < 0,05$

Die Expression verschiedener Proteine im Lebergewebe wurde untersucht. Als Schlüsselproteine des Insullinsignalling wurden der Insulin Rezeptor (IR), das Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) und das Insulin Rezeptor Substrat -2 untersucht. Die Expression aller drei Schlüsselenzyme lassen die gleiche Tendenz erkennen. Sowohl IR, IRS-1 als auch IRS-2 zeigen eine Abnahme der Expression von der Kontrolldiät-,

über die KD 1W HFD bis hin zur HFD Gruppe. In der Quantifizierung der Westernblotts zeigt sich das Bild deutlicher. Die *DIO*- Tiere weisen eine um ca. 20% geringere IR-Expression auf. Die Substrate IRS-1 & IRS-2 fallen in der *DIO*-Gruppe sogar um ca. 50% ab.

Als Schlüsselenzyme des Lipidstoffwechsels wurden der LDL-Rezeptor, das LDL-Rezeptor Related Protein -1 (LRP-1), die *Fatty Acid Synthetase* (FAS) und SR-B1 untersucht. β -Aktin diente der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels (Abb. 8). Abbildung 9 zeigt die Quantifizierung der Westernblottanalysen der verschiedenen Schlüsselproteine des Lipidstoffwechsels aus Lebergewebe.

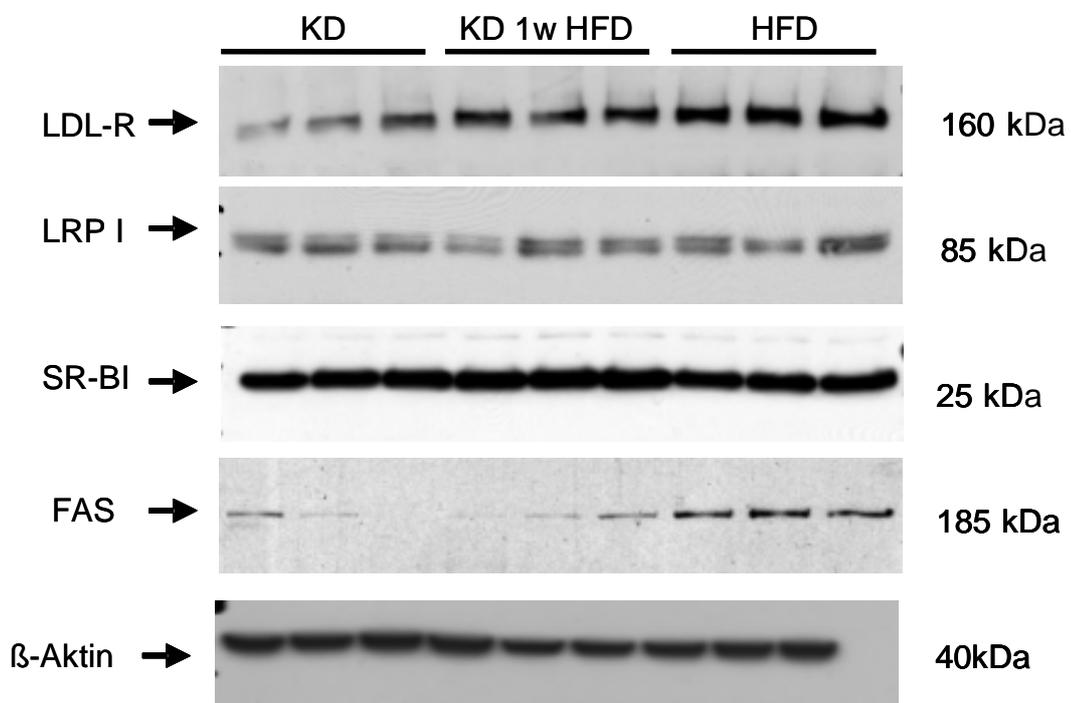


Abbildung 8: Westernblottanalyse verschiedener Schlüsselproteine des Lipidstoffwechsels in der Leber

Es wurden jeweils 10 μ g Leberprotein pro Bahn und Maus über eine 10% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Leberproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. Die Detektion des β -Aktin dient der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät.

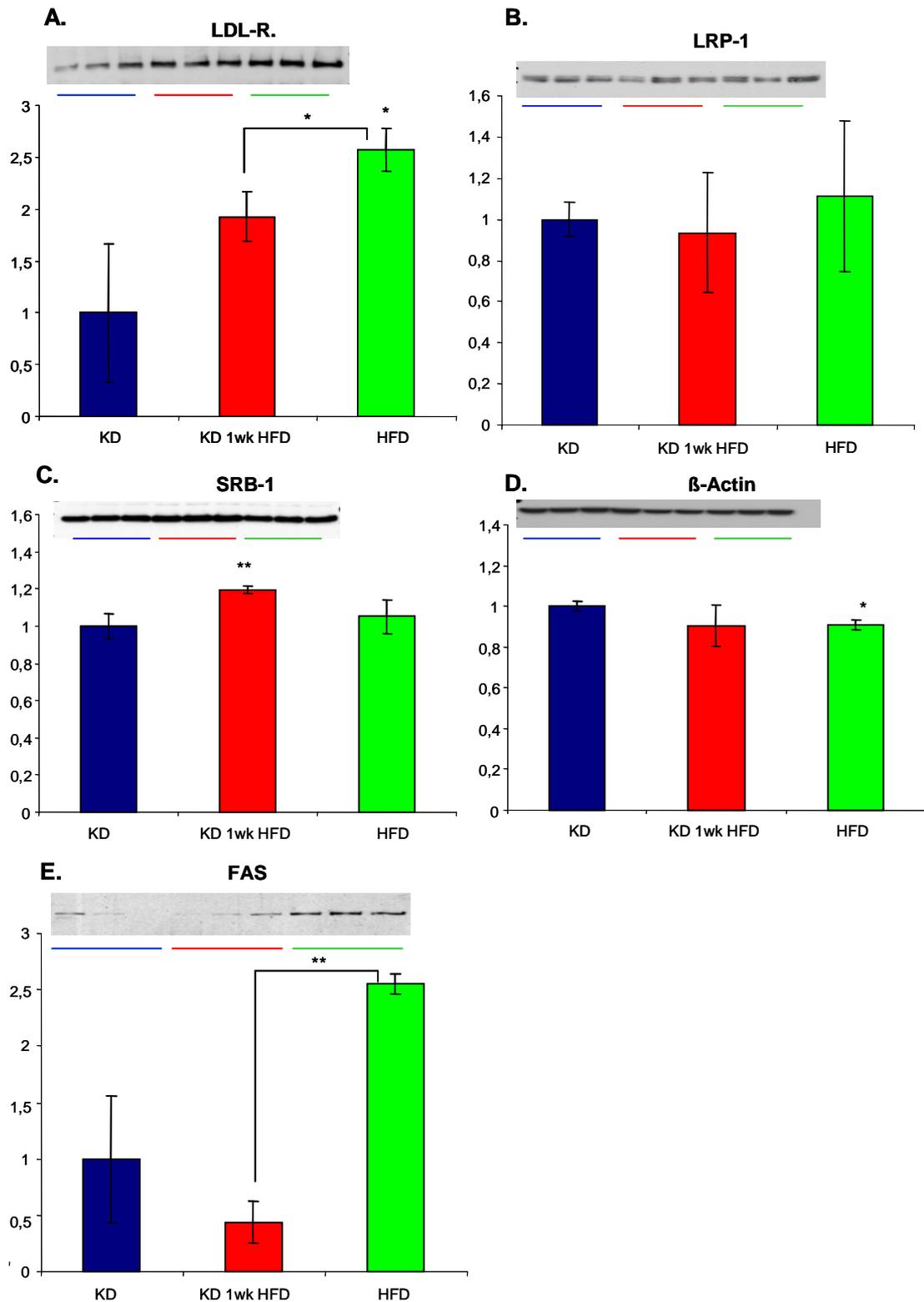


Abbildung 9: Quantifizierung von Westernblottanalysen wichtiger Proteine des Lipidstoffwechsels aus Lebergewebe

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Lipidstoffwechsels aus Lebergewebe. Abb. 9A: LDL-R, Abb. 9B: LRP-1, Abb. 9C: SR-B1, 9D: β-Aktin, 9E: FAS. Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Lean-chow wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett-diät, HFD: Hochfett-diät. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Wie man aus der Abbildung 8 erkennen kann, zeigt der LDL- Rezeptor eine Zunahme der Expression mit Höchstwerten in der HFD -Gruppe. Dies wird durch die Abbildung 9A deutlicher, die Expression des LDL-R ist bei den *DIO* Tieren um ca. 2,5 fach höher als bei den KD-Tieren. Die Westernblottanalyse des LRP-1 zeigt, mit einer leichten Erhöhung der Expression in der HFD-Gruppe, die gleiche Tendenz wie auch der LDL-R. Wie auch die Quantifizierung zeigt (Abb.9B) ist die Expression des LRP-1 in der HFD-Gruppe leicht aber nicht signifikant erhöht.

Die FAS, die in der KD- und der KD 1W HFD-Gruppe nur schwer zu detektieren war, zeigt in der HFD-Gruppe eine deutliche Expression. Wie auch die Abbildung 9E zeigt, zeigt FAS bei den *DIO*-Tieren eine 2,5fach höhere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. SR-B1 zeigt in allen Gruppen eine sehr starke und gleichmäßige Expression, so dass sich aus dem Westernblott keine Tendenz erkennen lässt. Die Quantifizierung zeigt jedoch eine leichte Expressionsabnahme in der Gruppe der *DIO*-Tiere. Auch β -Aktin zeigt über alle Bahnen des Westernblotts hinweg eine gleichmäßige Expression, auch hier zeigen sich in der Quantifizierung leichte Unterschiede mit einem Expressionsmaximum in der KD-Gruppe.

Um zelluläre Expressionslevel von regulatorisch wichtigen Apolipoproteinen zu detektieren, wurde die Expression der Apolipoproteine Apo-E und Apo-C bestimmt (Abb.10).

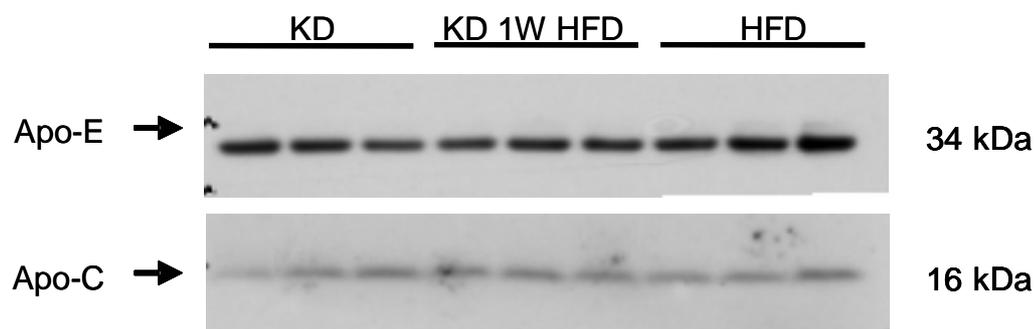


Abbildung 10: Westernblottanalyse von Apolipoprotein E und C aus Lebergewebe

Es wurden jeweils 10 μ g Leberprotein pro Bahn und Maus über eine 7,5% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Leberproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät.

Auch hier wurden im Anschluss die Westernblottanalysen, zur besseren Differenzierung, quantitativ bestimmt (Abb.11).

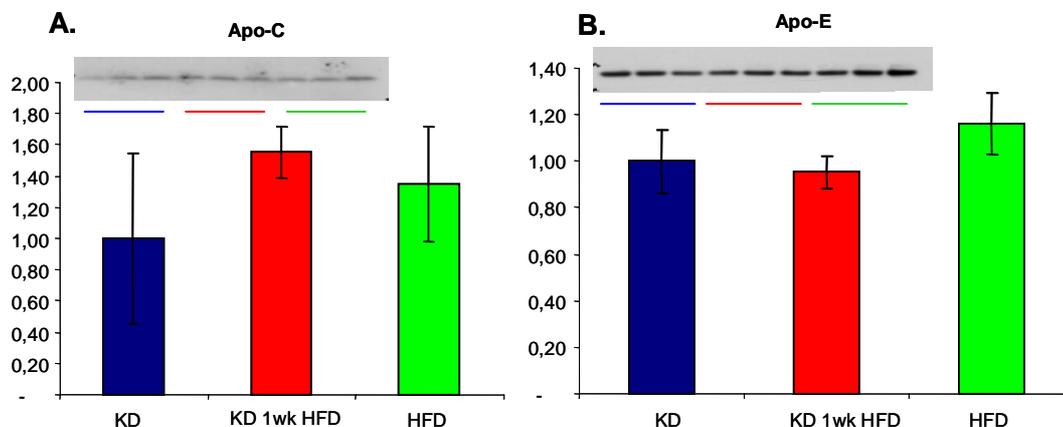


Abbildung 11: Quantifizierung von Westernblottanalysen ApoE und C in der Leber

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Lipoproteinstoffwechsels aus Lebergewebe. Abb. 11A: Apo-C, Abb. 11B: Apo-E. Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Kontrolldiät wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät.

Auch die Expression der Apolipoproteine E und C ist bei *DIO* Tieren leicht erhöht. Wie die Abbildungen 11A und 11B zeigen, ist die Expression des Apo-C um ca. 40%, die Expression des Apo-E um ca. 20% in der HFD-Gruppe erhöht. Apo-C zeigt außerdem einen *Peak* in der KD 1W HFD-Gruppe.

Um den Einfluss der *Diet Induced Obesity (DIO)* auf den Lipid-, Lipoproteinstoffwechsel und das Insulinsignalling im Muskelgewebe zu untersuchen, wurden hier ebenfalls Schlüsselproteine dieser Stoffwechselwege durch Westernblottanalyse untersucht und anschließend mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert.

Als Schlüsselproteine des Insulinsignalling wurden zunächst der Insulin Rezeptor (IR) und das Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) untersucht (Abb.12 & 13).

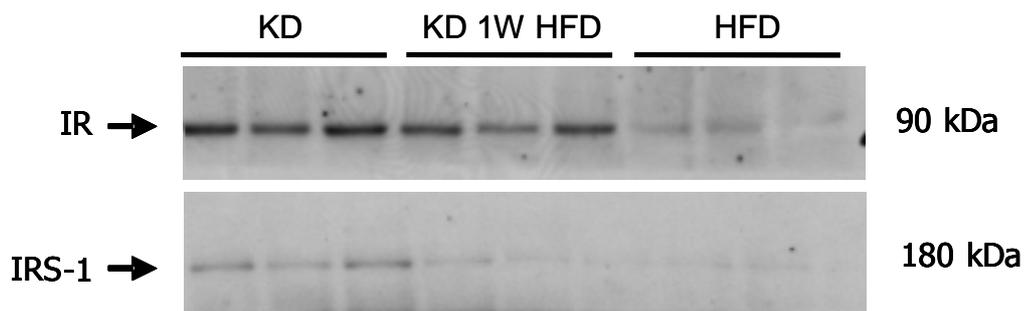


Abbildung 12: Semiquantitative Westernblottanalyse von IR und IRS-1 im Muskelgewebe

Es wurden jeweils 30µg Muskelprotein pro Bahn über eine 7,5% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Muskelproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät.

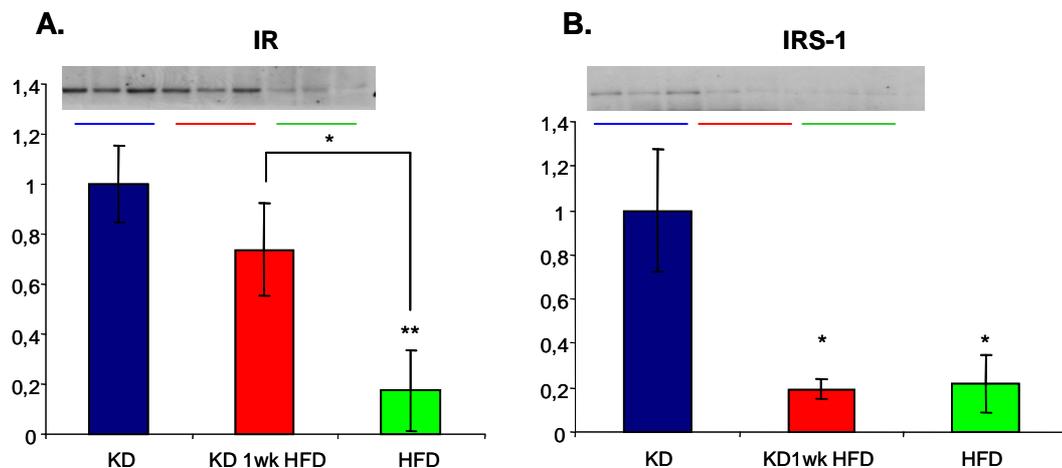


Abbildung 13: Quantifizierung von Westernblottanalysen IR und IRS-1 im Muskel

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Lipoproteinstoffwechsels aus Muskelgewebe. Abb. 13A: Insulinrezeptor (IR), Abb. 13 B: Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1). Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Kontroll diät wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontroll diät, KD 1W HFD: Kontroll diät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

IR und IRS-1 zeigen im Muskelgewebe ähnliche, jedoch deutlich ausgeprägtere Expressionsunterschiede für IR und IRS-1 im Lebergewebe. Die Insulin Rezeptor Expression fällt von KD, über KD 1W

HFD, bis zu HFD stark ab und weist in der HFD-Gruppe nur noch eine 20% Expression auf (Abb.12BI). IRS-2 konnte im Muskelgewebe nicht nachgewiesen werden Die Detektion des IRS-1 erweist sich im Muskelgewebe als schwierig. Auch hier liegen die höchsten Werte in der KD-Gruppe und fallen dann um bis zu 80% in der HFD-Gruppe ab.

Um Unterschiede im Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel des Muskels zu untersuchen wurde die Expression des Apolipoproteins E (Apo-E) und LDL Rezeptors (LDL-R) im Muskelgewebe bestimmt (Abb.14 & 15). Alle weiteren für die Leber dargestellten Proteine wurden auch im Muskel untersucht, konnten jedoch per Western-Blott-Analyse nicht nachgewiesen werden.

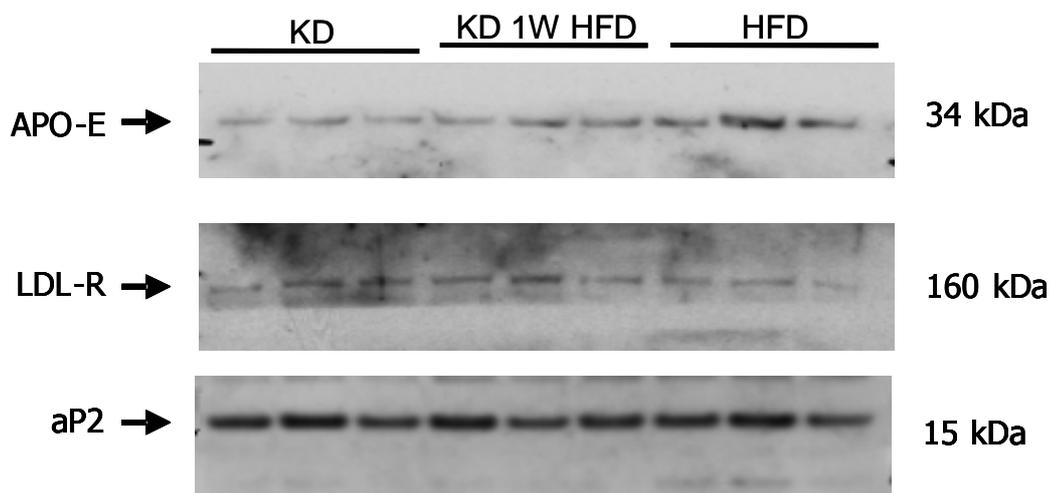


Abbildung 14: Semiquantitative Westernblottanalyse von LDL-R, APO-E und aP2 im Muskel

Es wurden jeweils 30µg Muskelprotein pro Bahn über eine 7,5% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Muskelproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfettdiät, HFD: Hochfettdiät.

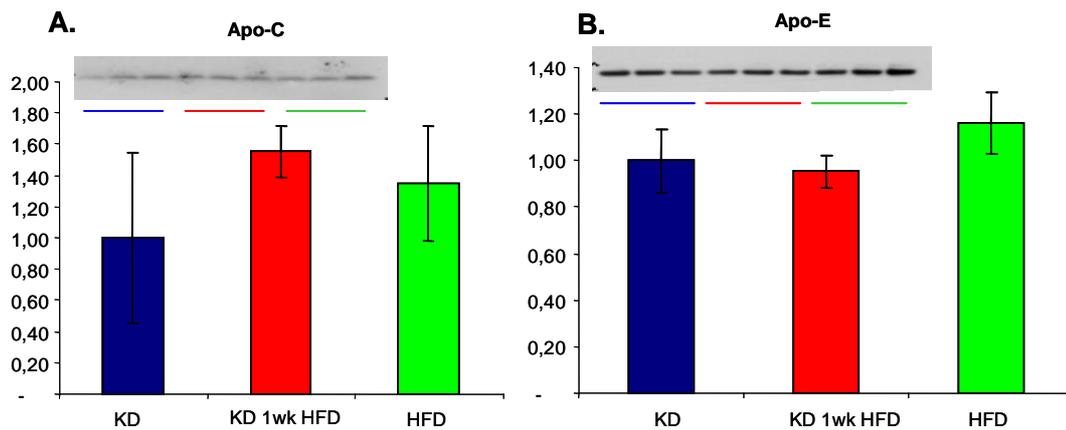


Abbildung 15: Quantifizierung von Westernblottanalysen Apo-C und Apo-E im Muskel

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Lipoproteinstoffwechsels aus Muskelgewebe. Abb. 15A: Apo-C, Abb. 15B: Apo-E. Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Kontrolldiät wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät.

Anders als im Lebergewebe scheint die Expression des LDL-R im Muskelgewebe abzunehmen mit einem Minimum bei den *DIO* Tieren. Im Vergleich dazu zeigt Apo-E ähnliches Verhalten im Muskel- wie im Lebergewebe. Die Expression des Apo-E steigt an und liegt in der HFD-Gruppe 3,5fach über der Expression in der KD - Gruppe.

Neben Leber- und Muskelgewebe wurden auch Proteine des epididymalen Fettgewebes mit der Westernblottanalyse untersucht. Als Schlüsselproteine des Insulinsignallings wurden auch hier IR & IRS-1 bestimmt (Abb.16 & 17).

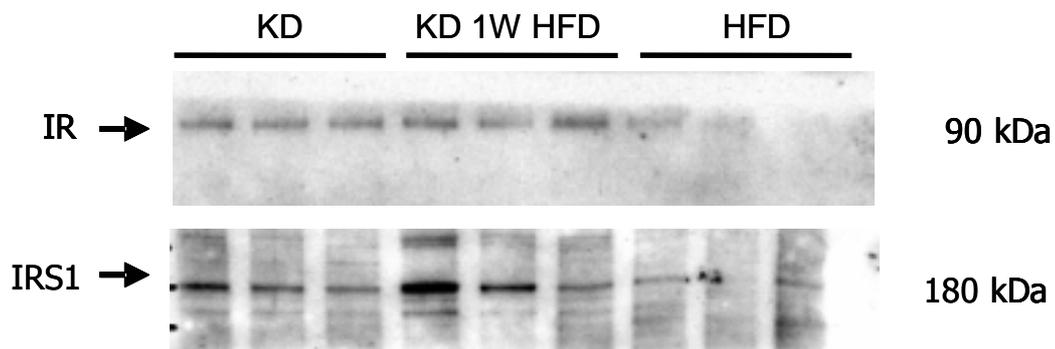


Abbildung 16: Semiquantitative Westernblottanalyse von IR und IRS-1 im epididymalen Fettgewebe

Es wurden jeweils 25 μ g Fettgewebsprotein pro Bahn über eine 7,5% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Fettgewebsproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett-diät, HFD: Hochfett-diät.

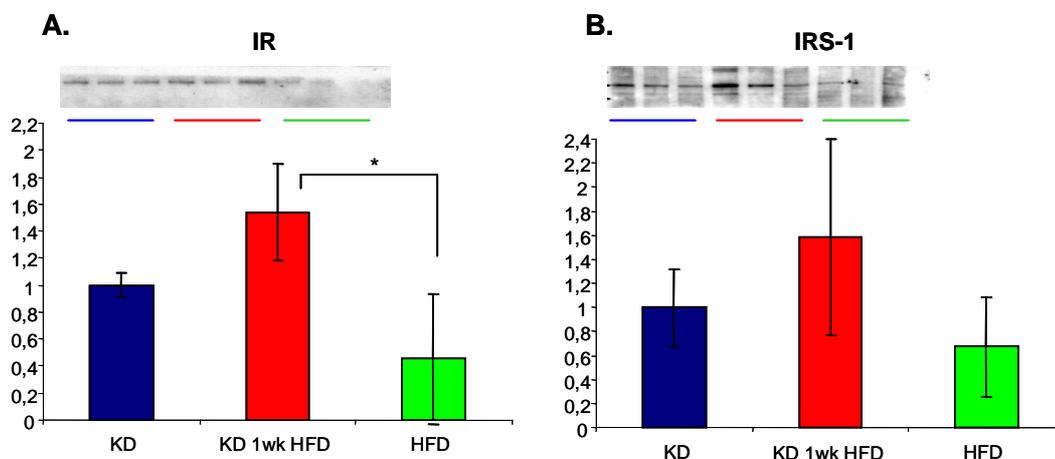


Abbildung 17: Quantifizierung von Westernblottanalysen IR und IRS-1 im epididymalen Fett

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Lipoprotein-stoffwechsels aus epididymalen Fettgewebe. Abb. 17A: IR, Abb. 17B: IRS -1. Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Kontroll-diät wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontroll-diät, KD 1W HFD: Kontroll-diät 1 Woche Hochfett-diät, HFD: Hochfett-diät. *= $p < 0,05$.

Auch im epididymalen Fettgewebe zeigen Insulin Rezeptor (IR) und Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) ein ähnliches Verhalten wie im Leber-

und Muskelgewebe. Die IR-Expression fällt ab und liegt in der HFD-Gruppe ca. 50% unter der der KD - Gruppe. IRS-1 ist schwieriger zu detektieren, auch hier zeigt die HFD -Gruppe ein Expressionsminimum. Als Schlüsselproteine des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels wurden Apo-E, LRP-1 und aP2 analysiert (Abb. 18 & 19)

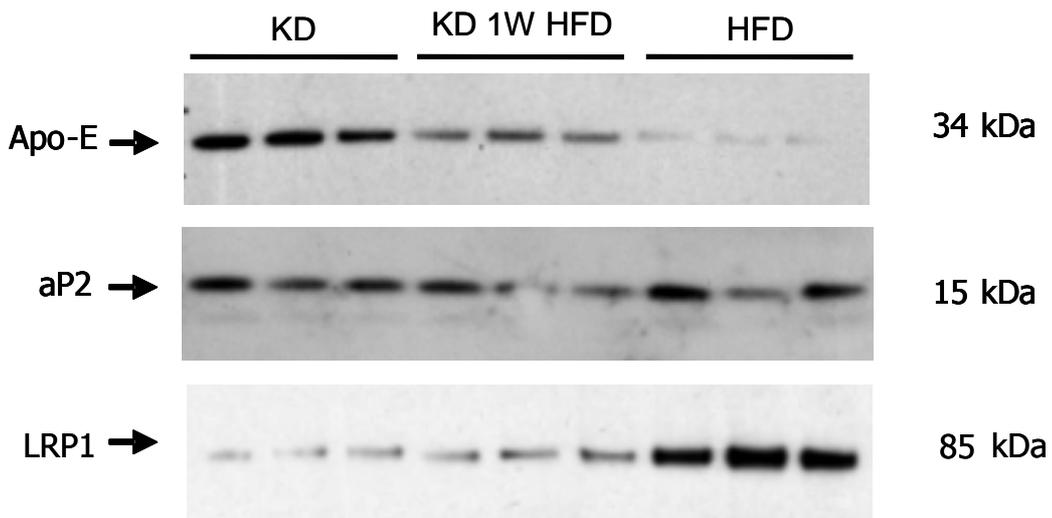


Abbildung 18: Semiquantitative Westernblottanalyse von Apo-E, aP2 und LRP-1 im epididymalen Fettgewebe

Es wurden jeweils 25 µg Fettgewebsprotein pro Bahn über eine 7,5% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Fettgewebsproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfettdiät, HFD: Hochfettdiät.

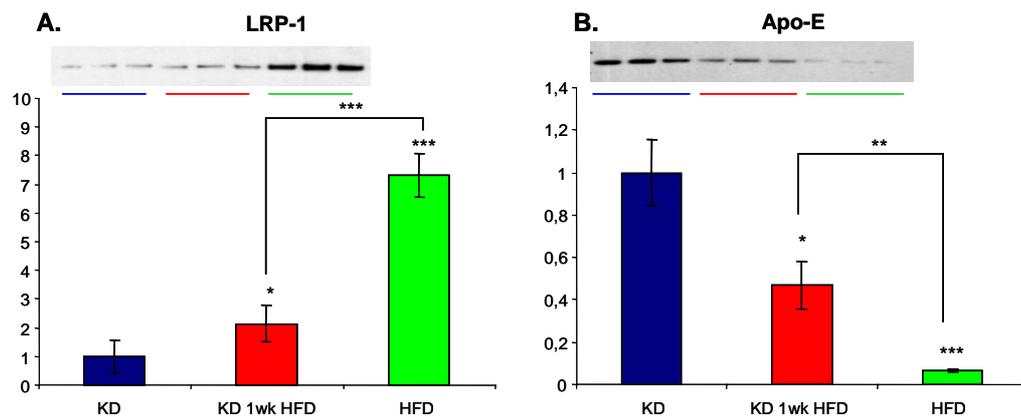


Abbildung 19: Quantifizierung von Westernblottanalysen LRP-1 und Apo-E im epididymalen Fett

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Lipoproteinstoffwechsels aus epididymalen Fettgewebe. Abb. 19A: LRP-1, Abb. 19B: Apo-E. Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Lean-chow wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Anders als im Muskelgewebe sinkt die Expression des Apo-E im epididymalen Fettgewebe. Die *DIO*-Tiere weisen im epididymalen Fettgewebe eine um ca. 90% reduzierte Expression des Apo-E auf. Auch LRP1 zeigt im epididymalen Fettgewebe ein, dem Muskelgewebe, gegensätzliches Expressionsverhalten. LRP1 steigt im epididymalen Fett an. Die *DIO*-Tiere zeigen die höchsten Werte der LRP1-Expression, die ca. 8fach über den der KD - Tiere liegt. So zeigen sowohl LRP1 als auch Apo-E in Muskel- und epi. Fettgewebe ein gegenläufiges Verhalten.

Im subkutanen Fettgewebe wurde die Expression des IR, des LRP1, des Apo-E und der aP2 untersucht (Abb. 20 & 21).

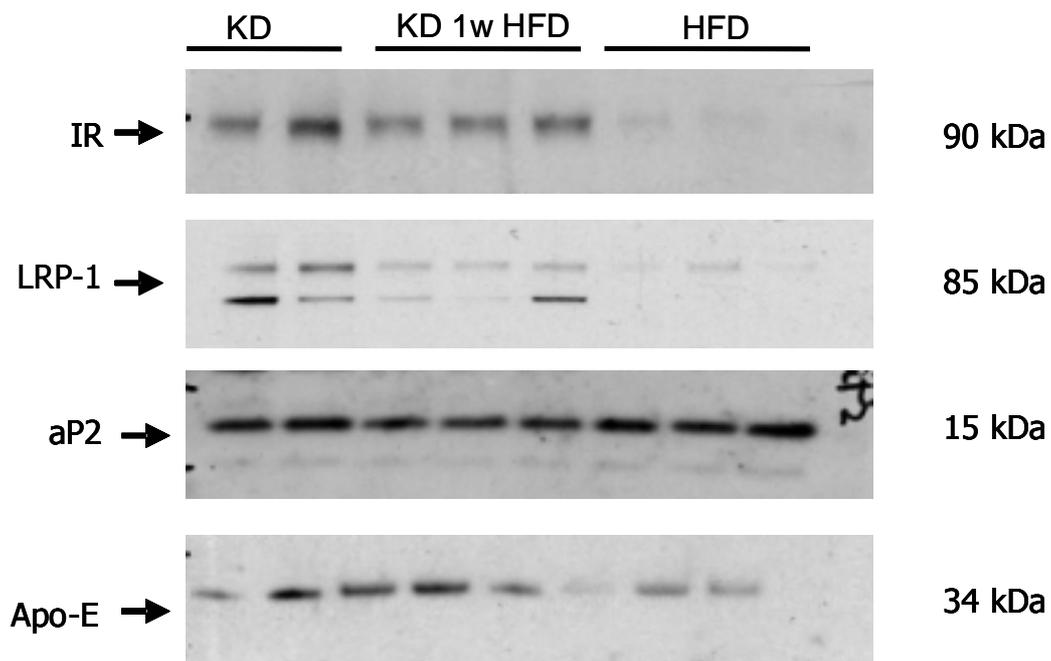


Abbildung 20: Semiquantitative Westernblottanalyse von Apo-E, aP2, IR und LRP-1 im subkutanen Fettgewebe

Es wurden jeweils 25 μ g Fettgewebsprotein pro Bahn über eine 7,5% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es sind exemplarische Gele mit jeweils drei Fettgewebsproben von drei verschiedenen Mäusen je Gruppe dargestellt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfettdiät, HFD: Hochfettdiät.

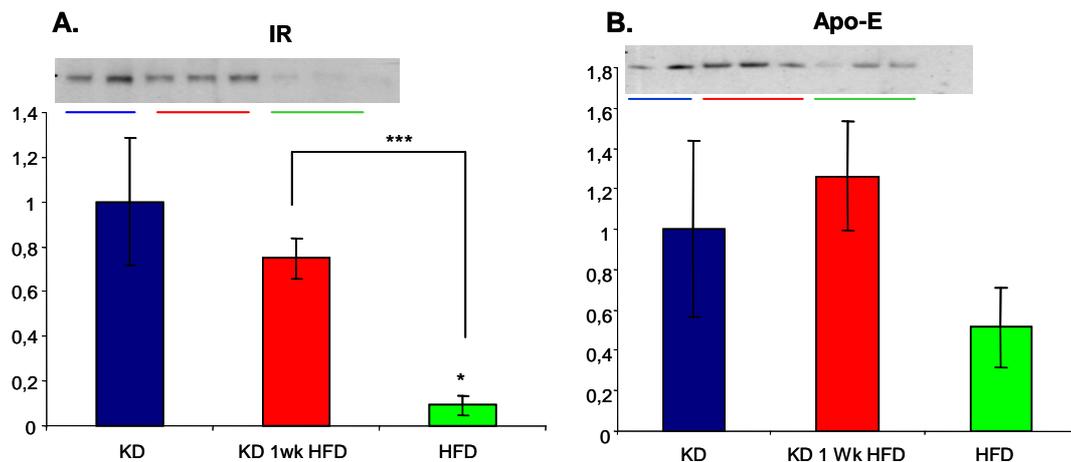


Abbildung 21: Quantifizierung von Westernblottanalysen IR und Apo-E im subkutanen Fettgewebe

Quantifizierung der Schlüsselproteine des Lipoproteinstoffwechsels aus epididymalen Fettgewebe. Abb. 21A: IR, Abb. 21B: Apo-E. Es wurde mit dem „Image-Quant“ Programm quantifiziert. Die Gruppe Kontrolldiät wurde als Kontrollgruppe gleich „1“ gesetzt und gegen die anderen Gruppen ins Verhältnis gesetzt. KD: Kontrolldiät, KD 1W HFD: Kontrolldiät 1 Woche Hochfett diät, HFD: Hochfett diät. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Als Schlüsselprotein des Insulinsignalling wurde die Expression des IR untersucht. Hier zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Abfall der IR-Expression mit einem Minimum in der HFD-Gruppe.

Ähnlich wie zuvor im epididymalen Fettgewebe ist auch im subkutanen Fett die Expression des Apo-E in der HFD-Gruppe deutlich reduziert. Abbildung 21 B zeigt eine um ca. 50% reduzierte Apo-E-Expression bei den *DIO* Tieren. Anders verhält sich LRP1 im subkutanen Fettgewebe, während es im epi. Fett in der Expression ansteigt, scheint sie im subkutanen Fettgewebe eher abzunehmen.

5 Diskussion

Die durch Insulinresistenz verursachte Dyslipidämie beim Menschen besteht vor allem einer Erhöhung der Triglyceridkonzentration im Plasma mit Überproduktion und reduziertem Abbau von VLDL-Lipoproteinen, einer Reduktion der HDL-Plasmakonzentration und weitestgehend unveränderten LDL-Konzentrationen [19].

Ein in der Diabetes- und Lipidforschung weit verbreitetes Forschungsmodell ist die C57BL/6 Maus, die nach einer Hochfettdiät eine periphere Insulinresistenz entwickelt [69]. Bei der Interpretation der Forschungsergebnisse aus diesem Mausmodell können Probleme entstehen, denn Mäuse – wie alle Nagetiere – gehören in die Gruppe der HDL-Tiere. Anders als beim Menschen wird Cholesterin im Plasma primär HDL-vermittelt in die verschiedenen Organe transportiert.

Um die Veränderungen im Lipoproteinprofil bei C57BL/6 Mäusen genauer zu untersuchen, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit Lipoproteinprofile der *DIO* Tiere, mit denen von Kontrolltieren verglichen.

Erstmals beschrieb Surwit im Jahre 1988 die Entwicklung eines Typ II DM ähnlichen Zustandes bei C57BL/6 Mäusen die mit der HFD gefüttert wurden. Surwit untersuchte damals die Gewichtszunahme, die Glukose- und Insulinkonzentration im Serum der Tiere [69]. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmen von 48 C57BL/6 Mäusen, die insgesamt in sechs Gruppen aufgeteilt waren, untersucht und zunächst die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen der Mausseren bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen im Lipoproteinprofil der unterschiedlichen Mausgruppen kein alleiniger, kurzfristiger Effekt der Hochfettdiät waren, sondern dass tatsächlich Veränderungen in den stoffwechselaktiven Organen für die Änderungen im Lipoproteinprofil verantwortlich sein müssten. Auch Surwit machte die Beobachtung, dass eine einwöchige HFD nicht zu den beobachteten Veränderungen im Lipoproteinprofil führten. Er vermutete damals, dass genetische Faktoren zur Entwicklung eines Diabetes mellitus ähnlichen Zustandes führten wenn das Tier fettleibig wurde [69, 70]. Vor allem bei der Cholesterinbestimmung lässt sich dies gut darstellen; Hier sieht man

normale bis leicht erhöhte Werte in der KD- und KD 1W HFD Gruppe im Gegensatz zu um bis zu 100% erhöhten Werten in der Gruppe der *DIO* Tiere. Über ähnliche Ergebnisse berichtet Schreyer et al., der eine 3fache Erhöhung der Gesamtcholesterinkonzentration bei HFD gefütterten C57BL/6 Mäusen beobachtete. Schreyer und Hayek et al. konnten in weiteren Untersuchungen an C57BL/6 Mäusen auch zeigen, dass neben einer Erhöhung der Gesamtcholesterinkonzentration in erster Linie das HDL-Cholesterin ansteigt [22, 61].

Betrachtet man nun die Lipoproteinprofile der einzelnen Mausgruppen aus meiner Arbeit so weichen meine Ergebnisse in Teilen von denen von Schreyer und Hayek ab. Auch hier lassen sich die *DIO* Tier deutlich von der Gruppe der Kontrolltiere abgrenzen. Es bestätigt sich auch, dass das HDL-Cholesterin den größten Anteil der Plasmalipide stellt. Vor allem aber fällt neben der Erhöhung der HDL- die Erhöhung der LDL-Konzentration auf. Bei der Cholesterinbestimmung der Lipoproteinprofile weisen *DIO*-Tiere einen siebenfach erhöhten LDL-Peak auf, der in der Gruppe der KD- oder KD 1W HFD-Tiere nicht beobachtet werden kann. Auch in der Fraktion der HDL zeigen sich signifikant höhere Werte bei den *DIO* Tieren. Anders als bei der Triglyceridbestimmung scheint bei der Cholesterinbestimmung der prä- oder postprandiale Zustand keinen Einfluss auf die Konzentrationsverhältnisse zu haben. Die Triglyceridbestimmung zeigt vor allem im postprandialen Zustand interessante Veränderungen im Lipoproteinprofil der *DIO* Tiere. Hier fällt vor allem das, bedingt durch die Bestimmungsmethode, deutlich erhöhte Glycerol der *DIO* Tiere im postprandialen Zustand auf, das im Vergleich zu KD- um das Sechsfache, und im Vergleich zu KD 1W HFD – Tieren um das Dreifache erhöht ist. Es scheint also so zu sein, dass die Dyslipidämie bei *DIO* C57BL/6 Mäusen in erster Linie in einer signifikanten Erhöhung der LDL- und deutlichen Erhöhung der HDL-Konzentration besteht. Außerdem zeigt sich postprandial ein deutlicher Anstieg des Glycerols [19]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Insulin einen starken antilipolytischen Effekt auf das Fettgewebe ausübt. Molekular vermittelt Insulin die Spaltung des Hungersignals cAMP zu AMP durch Aktivierung einer Insulin-aktivierbaren Phosphodiesterase. Dies führt unter normalen Umständen zur Inaktivierung der Proteinkinase A und damit zur Inhibition

der Hormon-Sensitiven Lipase und zur Rekrutierung von Perilipin an die Lipidtröpfchen der Fett. Beides verhindert den Abbau von Triglyceriden und damit die Freisetzung von Fettsäuren und Glycerin. Sowohl nach einer Woche HFD und stärker ausgeprägt nach 16 Wochen HFD bewirkt die Insulinresistenz somit keine Reduktion der Fettsäure und Glycerol Konzentration im postprandialen Zustand (Vergleich Abb. 4 und 5), während die Kontrolldiät gefütterten Tiere eine sehr starke Reduktion in der Glycerolkonzentration im postprandialen Zustand aufweist, was auf ein optimales Insulinsignalling im Fettgewebe zurückzuführen ist.

Wo liegen die Ursachen für die Veränderungen des Lipoproteinprofils der *DIO* Tiere?

Um Hinweise auf mögliche Mechanismen zu erlangen, die zur Entwicklung der Dyslipidämie bei *DIO* C57BL/6 Mäusen führten, wurde im zweiten Teil meiner Arbeit die Expressionslevel verschiedener, für den Lipid- und Insulinstoffwechsel wichtiger Proteine untersucht. Dazu wurden Proteinpräparate aus Leber-, Muskel-, subkutanen und epididymalen Fettgewebe erstellt.

Die Ergebnisse aus Westernblottanalysen des Fettgewebes scheinen diese Theorie zu bestätigen, hier zeigt sich das *DIO* Tiere eine deutlich reduzierte Expression des Insulinrezeptors (IR) und des Insulinrezeptorsubstrates 1 (IRS-1) insbesondere im Fett- und Muskelgewebe aufwiesen – sich also tatsächlich eine Resistenz des Fettgewebes gegenüber Insulin entwickelt hatte (Abb.20). Untersuchungen an HSL-defizienten Mäusen unterstützen diese Theorie. In einer Studie von K. Harada waren HSL-defiziente Mäuse resistent gegenüber der HFD-Ernährung, außerdem war die Hydrolyse von Triglyceriden und Cholesterinestern im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen deutlich reduziert [21].

Neben dem Fettgewebe fallen auch im Leber- und Muskelgewebe Veränderungen in der Genexpression auf. Auch hier ist die Abnahme der Expression des Insulin-Rezeptors in der HFD-Gruppe zu beobachten, was bedeuten könnte dass sich tatsächlich eine Insulinresistenz der insulinsensitiven Organe nach Hochfettdiät entwickelt hat.

Das Insulin großen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel hat, wurde bereits in der Einleitung dargestellt. Es existieren unterschiedliche Theorien darüber wie eine Insulinresistenz der insulinempfindlichen Organe die Dyslipidämie bei DM II Patienten auslöst. Die Fehlende Hemmung der hormonsensitiven Lipase (HSL) des insulinresistenten Fettgewebes könnte für ein gesteigertes Angebot an freien Fettsäuren für die Lipoproteinproduktion der Leber sorgen [51]. Da Insulin ein spezifischer Induktor der Lipoproteinlipase ist und die Transkription der LPL durch Insulin stark gefördert wird [17], könnte die Insulinresistenz des Fett- und Muskelgewebes zu einem reduzierten Abbau der cholesterinreichen Lipoproteine führen. Ein wichtiger Co-Faktor der LPL ist das Apolipoprotein CII. In Westernblottanalysen aus Lebergewebe weisen *DIO* Tiere eine Expressionszunahme des Apo-C auf. Ob die Expression des Apo-C aufgrund einer Reduktion der LPL kompensatorisch gesteigert ist, um den Lipoproteinkatabolismus der peripheren Organe aufrecht zu halten muss weiter untersucht werden. Es muss jedoch ebenfalls geklärt werden ob in der vorliegenden Studie die Expression der inhibitorisch wirkenden Apo CI und Apo CIV ebenfalls verändert werden.

Eine große Rolle in der Produktion und im Abbau von Lipoproteinen spielen der LDL-Rezeptor (LDL-R) und das Apolipoprotein E. Die Leber ist das zentrale Organ sowohl für die LDL- als auch für die LDL-Rezeptor Produktion. Der LDL-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle im Cholesterintransport, also dem Abbau von LDL- und Apo-E haltigen Lipoproteinen durch die Leber. Auch hier scheint Insulin einen Einfluß auf die Expression des LDL-Rezeptors zu haben. Duvillard untersuchte die LDL-Rezeptor Expression von DM II Patienten und fand heraus, dass diese deutlich reduziert war. Er vermutete, dass Insulin eine wichtige Rolle in der Expression des LDL-Rezeptor haben könnte. Patienten mit einem Typ II DM hatten eine um 40% reduzierte LDL-R Expression, die nach Gabe von Insulin um bis zu 75% anstieg [13, 68] .

Wenn diese Ergebnisse auch auf die Insulinresistenz der C57BL/6 Mäuse zutreffen sollen, so müsste vor allem in der Leber, als dem zentralen Organ für die LDL-R Synthese, eine Expressionsabnahme des LDL-R in der Gruppe der *DIO*-Tiere sehen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Duvillard war in der Gruppe der *DIO*-Tiere jedoch eine deutlich

Expressionszunahme des LDL-R in der Leber aber auch im Muskelgewebe festzustellen. Außerdem ist auch die Expression des Apo-E und des LRP1 im Leber- und Muskelgewebe der *DIO*-Tiere erhöht. Sie scheinen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Dyslipidämie und *DIO* bei C57 BL/6 Mäusen zu spielen. Versuchen an Apo-E und LDL-R defizienten Mäusen haben gezeigt, dass der Verlust des LDL-Rezeptors zu deutlich gesteigerter Fettsucht, deutlich erhöhten Serumglukosewerten und einer Hypertriglyceridämie führte. Apo-E defiziente Mäuse hingegen waren neben einer Entwicklung einer Adipositas resistent gegenüber Veränderungen im Glukose oder Lipidstoffwechsel [60].

Es scheint also als ob die Expression des LDL-Rezeptors im Leber- und Muskelgewebe kompensatorisch erhöht ist um einer Zunahme zirkulierender Lipoprotein entgegenzuwirken. Die Unterschiede zwischen Maus und Mensch können darauf zurückzuführen sein, dass bei den Untersuchungen Menschen bereits ein Typ II Diabetes Mellitus und damit auch eine komplette hepatische Insulinresistenz vorlag. In den vorliegenden Studien an C57BL/6 Mäusen hat die HFD vermutlich primär eine periphere Insulinresistenz induziert. Dies ist daran zu erkennen, dass zum einen die IR-Expression in der Leber nur leicht reduziert war und zum anderen in parallel durchgeführten Studien eher ein erhöhtes Insulinsignalling in der Leber durch Phosphorylierung von Akt nachgewiesen wurde. Dies würde wiederum bedeuten, dass die erhöhte VLDL, IDL und HDL-Konzentration im Plasma primär nicht durch die veränderte Expression von Proteinen der Leber zu erklären sind. Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass vermutlich die Insulinresistenz im Fett- und Muskelgewebe die Veränderungen im Lipoproteinprofil erklären könnten. Ob die starke Reduktion der Apo E-Expression oder die erhöhte LRP1 Synthese ursächlich mit dem Lipoproteinphänotyp zusammenhängen, muss in weiteren Studien geklärt werden.

6 Zusammenfassung

Neue Erkenntnisse zur Entstehung der Übergewichts- induzierten Insulinresistenz und den damit zusammenhängenden Folgeerkrankungen wie Typ II Diabetes Mellitus und Atherosklerose sind von großem medizinischen Interesse, da hier neue Ansätze zur Prävention und Behandlung dieser Volkskrankheiten benannt werden können. In der vorliegenden Arbeit sollten Veränderungen im Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel mit der Expression von regulatorisch – wichtigen Proteinen des Insulinsignalwegs und des Lipoproteinstoffwechsels organspezifisch korreliert werden. Dazu wurde das Plasmalipoproteinprofil mittels FPLC und die Proteinexpression in Leber, Fett und Muskelgewebe in verschiedenen Tieren untersucht, die mit unterschiedlichen Diäten gefüttert wurden. Die Kontrollgruppe erhielt eine *Chow*-Haltungsdiät für 16 Wochen während die Mausgruppe zur Induktion einer ausgeprägten Insulinresistenz 16 Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert wurden. Um Kurzzeiteffekte der Hochfettdiät zu untersuchen, wurde eine Gruppe für 15 Wochen mit der *Chow*-Diät und zum Ende der Studie eine Woche mit Hochfettdiät gefüttert. Die Untersuchungen zur Erstellung der Lipoproteinprofile wurden im gefasteten Zustand und in der postprandialen Phase durchgeführt. Die Untersuchung der Profile ergab, dass Tiere mit Diät- induziertem Übergewicht vermehrt HDL- und vor allem LDL/IDL sowie VLDL-Lipoproteine im Plasma aufweisen. Diese Veränderungen wurden abgeschwächt ebenfalls nach einer Woche Fütterung der Hochfettdiät gefunden. Als früher Marker der peripheren Insulinresistenz konnten erhöhte Glycerolwerte im Plasma identifiziert werden. Die Untersuchungen zur Proteinexpression zeigten, dass die Insulinresistenz zu einem hohen Anteil durch die stark reduzierte Expression des Insulin-Rezeptors und seines spezifischen Signalvermittlers IRS vor allem im Fett- und Muskelgewebe zu erklären ist. Die gegenläufige Expression von Apo E und LRP1 im Fettgewebe während der Entstehung der Insulinresistenz, deuten auf eine prominente Rolle dieser Proteine bei der Pathogenese dieser Erkrankung. Ob die veränderte Expression von Apo-E und LRP1 ursächlich mit der beobachteten Dyslipoproteinämie in Zusammenhang steht, muss in weiteren Studien geklärt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

- Apo Apolipoprotein
- BSA bovines Serum-Albumin
- cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat
- CE Cholesterinester
- CETP Cholesterinester-Transferprotein
- CM Chylomikronen
- CM Rem. Chylomikronen Remnants
- DIO Diet induced obesity
- DM Diabetes mellitus
- EL endotheliale Lipase
- ER endoplasmatischen Retikulums
- et al. et alii (und andere)
- ELL Enhanced Chemoluminescence
- FFA freien Fettsäuren
- FAS Fettsäure-Synthase
- FC freies Cholesterin
- FPLC *Fast Protein Liquid Chromatography*®
- GPO-PAP
- Glut Glucose Transporter
- G6Pase Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
- GPAT Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
- HDL Lipoprotein hoher Dichte (*High Density Lipoprotein*)
- HL hepatische Lipase
- HFD Hochfett Diät (*High Fat Diet*)
- HSL Hormonsensitive Lipase
- IDL Lipoprotein mittlerer Dichte (*Intermediate Density Lipoprotein*)
- IRS Insulin Rezeptor Substrat
- LIRKO Leber Insulin Rezeptor Defizienz (*Knock Out*)
- LCAT Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
- LDL Lipoprotein geringer Dichte (*Low Density Lipoprotein*)
- LDL-R LDL-Rezeptor
- LpL Lipoprotein Lipase
- LRP-1 *LDL-Rezeptor-related Protein -1*
- mRNA messenger Ribonukleinsäure
- MTP mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein
- PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- PBS
- RAP Rezeptorassoziiertes Protein
- sd LDL LDL geringer Dichte (*small dense LDL*)
- SR-BI Scavanger Rezeptor BI
- SREBP Sterol-responsives Element-bindendes Protein
- TEMED Tetramethylethyldiamin
- T2DM Typ II Diabetes mellitus
- TG Triglyzeride
- VLDL Lipoprotein sehr geringer Dichte (*Very Low Density Lipoprotein*)
- wt wildtyp

8 Literaturverzeichnis

1. Barrans, A., B. Jaspard, R. Barbaras, H. Chap, B. Perret, and X. Collet, *Pre-beta HDL: structure and metabolism*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1300**(2): p. 73-85.
2. Beisiegel, U., *Apolipoproteins as ligands for lipoprotein receptors* Structure and function of apolipoproteins 1992: p. 269-292.
3. Beisiegel, U., *Receptors of triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism*. Current opinion in Lipidology, 1995. **6**: p. 117-122.
4. Beisiegel, U., *The role of alpha M2 receptor/ LRP in chylomicron remnant metabolism* Annals of the New York Academy of sciences, 1994. **737**: p. 53-68.
5. Beisiegel, U.e.a., *The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein*. Nature, 1989. **341**: p. 162-164.
6. Boivin, A., I. Montplaisir, and Y. Deshaies, *Postprandial modulation of lipoprotein lipase in rats with insulin resistance*. Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 1): p. E620-7.
7. Chuck, S.L., Z. Yao, B. Blackhart, B. J. McCarthy, V. R. Lingappa, *New variation on the translocation of proteins during early biogenesis of apolipoprotein B* Nature, 1990. **346**: p. 382-385.
8. Clay, M.A., H.H. Newnham, T.M. Forte, and P.I. Barter, *Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1124**(1): p. 52-8.
9. Cohen, J.C., *Endothelial lipase: direct evidence for a role in HDL metabolism*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 318-21.
10. Cohn, J.S., B.W. Patterson, K.D. Uffelman, J. Davignon, and G. Steiner, *Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(8): p. 3949-55.
11. Coleman, D.L., *Two genes causing diabetes obesity syndromes in mice*. Diabetologia, 1978. **14**: p. 141-148.
12. Curtiss, L.K., *ApoE in atherosclerosis : a protein with multiple hats*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(8): p. 1852-3.
13. Duvillard, L., E. Florentin, G. Lizard, J.M. Petit, F. Galland, S. Monier, P. Gambert, and B. Verges, *Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy*. Diabetes Care, 2003. **26**(5): p. 1540-4.
14. Eisenberg, S., J.R. Patsch, J.T. Sparrow, A.M. Gotto, and T. Olivecrona, *Very low density lipoprotein. Removal of Apolipoproteins C-II and C-III-1 during lipolysis in vitro*. J Biol Chem, 1979. **254**(24): p. 12603-8.
15. Fazio, S.Y., Z., *The enhanced association of apolipoprotein E with apolipoprotein B-containing lipoproteins in serum -stimulated*

- hepatocytes occurs intracellularly*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**: p. 593-600.
16. Francone, O.L., L. Royer, and M. Haghpassand, *Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes*. *J Lipid Res*, 1996. **37**(6): p. 1268-77.
 17. Fried, S.K., C.D. Russell, N.L. Grauso, and R.E. Brolin, *Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(5): p. 2191-8.
 18. Gibbons, G.F., *Assembly and secretion of very-low-density lipoprotein*. *Biochem. J.*, 1990. **268**: p. 1-13.
 19. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, *Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes*. *Arch Med Res*, 2005. **36**(3): p. 232-40.
 20. Haffner, S.M., S. Lehto, T. Ronnema, K. Pyorala, and M. Laakso, *Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(4): p. 229-34.
 21. Harada, K., W.J. Shen, S. Patel, V. Natsu, J. Wang, J. Osuga, S. Ishibashi, and F.B. Kraemer, *Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(6): p. E1182-95.
 22. Hayek, T., Y. Ito, N. Azrolan, R.B. Verdery, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, and J.L. Breslow, *Dietary fat increases high density lipoprotein (HDL) levels both by increasing the transport rates and decreasing the fractional catabolic rates of HDL cholesterol ester and apolipoprotein (Apo) A-I. Presentation of a new animal model and mechanistic studies in human Apo A-I transgenic and control mice*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1665-71.
 23. Heeren, J., T. Grewal, S. Jackle, and U. Beisiegel, *Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(45): p. 42333-8.
 24. Heeren, J., T. Grewal, A. Laatsch, D. Rottke, F. Rinninger, C. Enrich, and U. Beisiegel, *Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(16): p. 14370-8.
 25. Heeren, J., A. Niemeier, M. Merkel, and U. Beisiegel, *Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo*. *J Mol Med*, 2002. **80**(9): p. 576-84.
 26. Hellerstein, M.K., *De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects*. *Eur J Clin Nutr*, 1999. **53 Suppl 1**: p. S53-65.
 27. Hennessy, L.K., S.T. Kunitake, and J.P. Kane, *Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre-beta high-density lipoprotein particles*. *Biochemistry*, 1993. **32**(22): p. 5759-65.
 28. Hill, J.O., H.R. Wyatt, G.W. Reed, and J.C. Peters, *Obesity and the environment: where do we go from here?* *Science*, 2003. **299**(5608): p. 853-5.

29. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
30. Hussain, M.M., R.K. Kancha, Z. Zhou, J. Luchoomun, H. Zu, and A. Bakillah, *Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1300**(3): p. 151-70.
31. Ishida, T., S. Choi, R.K. Kundu, K. Hirata, E.M. Rubin, A.D. Cooper, and T. Quertermous, *Endothelial lipase is a major determinant of HDL level*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 347-55.
32. Koo, C., T.L. Innerarity, and R.W. Mahley, *Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor-active high density lipoproteins*. J Biol Chem, 1985. **260**(22): p. 11934-43.
33. Kostner, G.M., *Apolipoproteins and lipoproteins of human plasma: significance in health and in disease*. Adv Lipid Res, 1983. **20**: p. 1-43.
34. Kostner, G.M., *Lipoprotein receptors and atherosclerosis*. Biochem Soc Trans, 1989. **17**(4): p. 639-41.
35. Kostner, K., S. Spitzauer, H. Rumpold, G. Maurer, G. Knipping, A. Hrzenjak, S. Frank, and G.M. Kostner, *Urinary excretion of apolipoprotein(a): relation to other plasma proteins*. Clin Chim Acta, 2001. **304**(1-2): p. 29-37.
36. Kowal, R.C., *Low density lipoprotein-receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apolipoprotein E-enriched lipoproteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1989. **A86**: p. 5810-5814.
37. Kowal, R.C., *Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein*. Biology Chemistry, 1990. **265**: p. 10771-10779.
38. Kraemer, F.B., *Role of lipoprotein lipase and apolipoprotein E secretion by macrophages in modulating lipoprotein uptake. Possible role in acceleration of atherosclerosis in diabetes*. Diabetes, 1992. **41 Suppl 2**: p. 77-80.
39. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 601-37.
40. Kuhn, R., *Inductible gene targeting in mice*. Science, 1995. **269**: p. 1427-1429.
41. Lewis, G.F., K.D. Uffelman, L.W. Szeto, and G. Steiner, *Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals*. Diabetes, 1993. **42**(6): p. 833-42.
42. Liang, H.Q., K.A. Rye, and P.J. Barter, *Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins*. J Lipid Res, 1994. **35**(7): p. 1187-99.
43. Lin, M.C., D. Gordon, and J.R. Wetterau, *Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression*. J Lipid Res, 1995. **36**(5): p. 1073-81.

44. Malden, L.T., A. Chait, E.W. Raines, and R. Ross, *The influence of oxidatively modified low density lipoproteins on expression of platelet-derived growth factor by human monocyte-derived macrophages*. J Biol Chem, 1991. **266**(21): p. 13901-7.
45. Malmstrom, R., C.J. Packard, M. Caslake, D. Bedford, P. Stewart, H. Yki-Jarvinen, J. Shepherd, and M.R. Taskinen, *Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM*. Diabetologia, 1997. **40**(4): p. 454-62.
46. Marz, W., H. Scharnagl, U. Mondorf, H. Wieland, W. Gross, and G.M. Kostner, *The receptor-mediated endocytosis of lipoprotein (a)*. Z Gastroenterol, 1996. **34 Suppl 3**: p. 131-8.
47. Marz, W., R. Siekmeier, W. Gross, and G.M. Kostner, *Determination of lipoprotein(a): evaluation of three methods*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1993. **31**(5): p. 295-302.
48. Mendez, A.J., J.F. Oram, and E.L. Bierman, *Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10104-11.
49. Merkel, M., R.H. Eckel, and I.J. Goldberg, *Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 1997-2006.
50. Merkel, M., J. Heeren, W. Dudeck, F. Rinninger, H. Radner, J.L. Breslow, I.J. Goldberg, R. Zechner, and H. Greten, *Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7405-11.
51. Muurling, M., M.C. Jong, R.P. Mensink, G. Hornstra, V.E. Dahlmans, H. Pijl, P.J. Voshol, and L.M. Havekes, *A low-fat diet has a higher potential than energy restriction to improve high-fat diet-induced insulin resistance in mice*. Metabolism, 2002. **51**(6): p. 695-701.
52. Olofsson, S.O., P. Stillemark-Billton, and L. Asp, *Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(8): p. 338-45.
53. Pan, M., A.I. Cederbaum, Y.L. Zhang, H.N. Ginsberg, K.J. Williams, and E.A. Fisher, *Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1277-87.
54. Picard, F., A. Boivin, J. Lalonde, and Y. Deshaies, *Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(2): p. E412-8.
55. Reaven, G.M., *Non-insulin-dependent diabetes mellitus, abnormal lipoprotein metabolism, and atherosclerosis*. Metabolism, 1987. **36**(2 Suppl 1): p. 1-8.
56. Reaven, G.M. and M.S. Greenfield, *Diabetic hypertriglyceridemia: evidence for three clinical syndromes*. Diabetes, 1981. **30**(Suppl 2): p. 66-75.
57. Rinninger, F., M. Brundert, I. Brosch, N. Donarski, R.M. Budzinski, and H. Greten, *Lipoprotein lipase mediates an increase in selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters by cells in culture*

- independent of scavenger receptor BI*. J Lipid Res, 2001. **42**(11): p. 1740-51.
58. Rinninger, F., J.T. Deichen, S. Jackle, E. Windler, and H. Greten, *Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters and high-density lipoprotein particle uptake by human monocyte-macrophages*. Atherosclerosis, 1994. **105**(2): p. 145-57.
59. Rohlmann, A., M. Gotthardt, R.E. Hammer, and J. Herz, *Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 689-95.
60. Schreyer, S.A., C. Vick, T.C. Lystig, P. Mystkowski, and R.C. LeBoeuf, *LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(1): p. E207-14.
61. Schreyer, S.A., D.L. Wilson, and R.C. LeBoeuf, *C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1998. **136**(1): p. 17-24.
62. Schwarz, J.M., P. Linfoot, D. Dare, and K. Aghajanian, *Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(1): p. 43-50.
63. Shepherd, P.R. and B.B. Kahn, *Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1999. **341**(4): p. 248-57.
64. Shimomura, I., M. Matsuda, R.E. Hammer, Y. Bashmakov, M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 77-86.
65. Shulman, G.I., *Cellular mechanism of insulin resistance*. Clin Invest, 2000. **106**(473-481).
66. Sparks, J.D. and C.E. Sparks, *Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1215**(1-2): p. 9-32.
67. Srivastava, R.A., *Saturated fatty acid, but not cholesterol, regulates apolipoprotein AI gene expression by posttranscriptional mechanism*. Biochem Mol Biol Int, 1994. **34**(2): p. 393-402.
68. Streicher, R., J. Kotzka, D. Muller-Wieland, G. Siemeister, M. Munck, H. Avci, and W. Krone, *SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 7128-33.
69. Surwit, R.S., Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, and Feinglos MN, *Diet-induced type II diabetes in C57BL/6 mice*. Diabetes, 1988. **37**: p. 1163-1167
70. Surwit, R.S., M.F. Seldin, C.M. Kuhn, C. Cochrane, and M.N. Feinglos, *Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice*. Diabetes, 1991. **40**(1): p. 82-7.
71. Taghibiglou, C., F. Rashid-Kolvear, S.C. Van Iderstine, H. Le-Tien, I.G. Fantus, G.F. Lewis, and K. Adeli, *Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated*

- hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance.* J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 793-803.
72. Tall, A.R., X. Jiang, Y. Luo, and D. Silver, 1999 *George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1185-8.
73. Taskinen, M.R., J. Kahri, V. Koivisto, J. Shepherd, and C.J. Packard, *Metabolism of HDL apolipoprotein A-I and A-II in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia, 1992. **35**(4): p. 347-56.
74. Trigatti, B. and A. Rigotti, *Scavenger receptor class B type I (SR-BI) and high-density lipoprotein metabolism: recent lessons from genetically manipulated mice.* Int J Tissue React, 2000. **22**(2-3): p. 29-37.
75. Vance, J.E., D. E. Vance, *Lipoprotein assembly and secretion by hepatocytes.* Ann. Rev. Nutr., 1990. **10**: p. 337-356.
76. von Eckardstein, A., M. Jauhiainen, Y. Huang, J. Metso, C. Langer, P. Pussinen, S. Wu, C. Ehnholm, and G. Assmann, *Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1301**(3): p. 255-62.
77. Wilson, P.W., *Diabetes mellitus and coronary heart disease.* Am J Kidney Dis, 1998. **32**(5 Suppl 3): p. S89-100.
78. Zhang, Y.L., A. Hernandez-Ono, C. Ko, K. Yasunaga, L.S. Huang, and H.N. Ginsberg, *Regulation of hepatic apolipoprotein B-lipoprotein assembly and secretion by the availability of fatty acids. I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles.* J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19362-74.
79. Zimmermann, R., U. Panzenbock, A. Wintersperger, S. Levak-Frank, W. Graier, O. Glatter, G. Fritz, G.M. Kostner, and R. Zechner, *Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages.* Diabetes, 2001. **50**(7): p. 1643-53.

9 Danksagung

Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beilsiegel danke ich für das Thema dieser Dissertation und die Möglichkeit, diese experimentelle Arbeit in Ihrem Labor durchzuführen.

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD. Dr. Jörg Heeren für die intensive wissenschaftliche Betreuung, die Geduld und die jederzeitige Unterstützung während der letzten Jahre.

Vielen Dank auch an Frau Sandra Ehret für die gute Einarbeitung, sehr nette Zusammenarbeit und praktische Hilfe im Verlauf der experimentellen Arbeit.

Abschließend danke ich ganz herzlich meiner Familie und meiner Freundin für die ausdauernde und innige Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: