A light micrograph showing numerous primary murine adipocytes. The cells are characterized by large, clear, spherical lipid droplets that occupy most of the cell volume, pushing the nucleus to the periphery. The droplets vary in size, with some being significantly larger than others. The overall appearance is that of a dense population of fat cells.

Dissertation
Alexander Bartelt

Primäre murine Adipozyten

Rolle des Apolipoprotein E in der Entstehung der Insulinresistenz

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alexander Bartelt

aus Hamburg

Hamburg, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2007 bis April 2010 extern im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie, N30 des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von PD Dr. Jörg Heeren angefertigt. Prof. Dr. Dr. Christian Betzel betreute diese Arbeit am Department Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel
2. Gutachter: PD Dr. Jörg Heeren

Datum der Disputation: 22.10.2010

1. Einleitung	1
1.1.: Rolle des ApoE im vaskulären Lipoproteinstoffwechsel	1
1.2.: Struktur des ApoE-Moleküls	4
1.3.: Rolle des ApoE in der Entstehung der Atherosklerose	6
1.4.: Rolle des ApoE in der Leber	8
1.5.: Rolle des ApoE in Makrophagen	9
1.6.: Adipozyten und Fettgewebe: Fettleibigkeit und zelluläre Konsequenzen	10
1.7.: Rolle des ApoE im Knochengewebe	14
1.8.: Rolle des ApoE im braunen Fettgewebe	15
Ziele der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1.: Biochemische Reagenzien	18
2.2.: Mausmodelle und Diäten	18
2.3.: Plasma- und Urin-Analyse	18
2.4.: <i>Computed tomography</i> (CT)-basierte Körperkompositionsanalyse	19
2.5.: Histologie und histomorphometrische Analysen	19
2.6.: Histomorphometrie und Histologie des Knochens	19
2.7.: Gesamtlipidbestimmung in Lebergewebe	19
2.8.: RNA-Extraktion und quantitative <i>real-time</i> PCR	20
2.9.: Fettsäuren-Analytik	20
2.10.: Isolation und Kultur von primären murinen Adipozyten	20
2.11.: Fettrotfärbung	22
2.12.: Stimulation mit TNF α in vitro	22
2.13.: Lipoprotein-Isolierung	22
2.14.: ApoE-Überexpression	22
2.15.: Aktivierung des BAT durch Kälteexposition	23
2.16.: Herstellung von ApoE-freien TRL	23

2.17.:	Organverteilung von radioaktiv-markierten TRL	23
2.18.:	Histologie	23
2.19.:	Statistik	23
3. Ergebnisse		24
3.1.:	Diät-induzierte Adipositas in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren	25
3.2.:	Analyse der Serumparameter und Insulinresistenz in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung	28
3.3.:	Auswirkung der HFD auf den Lipidstoffwechsel der Leber in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren	30
3.4.:	Entzündungsreaktion in der Leber von Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	31
3.5.:	Fettsäureanalytik der Gesamt- und Phospholipiden in Lebergewebe von Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	33
3.6.:	Histologie des Fettgewebes von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	36
3.7.:	Entzündungsreaktion im weißen Fettgewebe von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	37
3.8.:	Präparation von primären Adipozyten	39
3.9.:	Charakterisierung von primären Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten	41
3.10.:	Differenzierung von Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten nach Supplementation von ApoE	43
3.11.:	Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten nach TNF α -Gabe	44
3.12.:	Rolle des ApoE im braunen Fettgewebe	46
3.13.:	Bedeutung von ApoE für den Knochenstoffwechsel in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung	49
3.14.:	Auftreten von Knochenmark-Adipozyten in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung	53
4. Diskussion		54
4.1.:	Abgeschwächte Fettleibigkeit in <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren	54
4.2.:	Rolle des ApoE in NASH	55

4.3.:	Rolle des ApoE im weißen Fettgewebe	56
4.4.:	Rolle des ApoE im braunen Fettgewebe	58
4.5.:	Rolle des ApoE im Knochen	59
5.	Zusammenfassung	61
6.	Summary	62
7.	Literatur	63
8.	Anhang	74
8.1.:	Abkürzungsverzeichnis	74
8.2.:	Abbildungsverzeichnis	77
8.3.:	Chemikalien	79
8.4.:	Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge	80
8.5.:	Danksagung	82
8.6.:	Lebenslauf	83
8.7.:	Wissenschaftliche Publikationen, die aus der Promotion hervorgegangen sind	85
8.8.:	Wissenschaftliche Manuskripte, die aus der Promotion hervorgegangen sind	85
8.9.:	Erklärung	86

1. Einleitung

Lipide stellen, neben Kohlenhydraten und Proteinen, energiereiche Substanzen dar, die vom menschlichen Organismus zur Energieversorgung verwendet werden. Der Großteil der Lipide ist wasserunlöslich und benötigt daher spezielle Mechanismen, um im Blut transportiert werden zu können. Während kurzkettige Fettsäuren in der Blutbahn überwiegend an Albumin gebunden vorkommen, werden die meisten anderen Lipide in Form von Lipoproteinen transportiert. Diese enthalten insbesondere Fettsäuren in Form von Triacylglycerol (TAG) oder Cholesterolestern (CE), die die vorherrschende Transportform von Cholesterol sind, sowie Phospholipide (PL) und lipophile Vitamine (siehe Abb. 1.1). Störungen des Lipoproteinstoffwechsels tragen u. a. zur Entstehung von Hyperlipidämien und Atherosklerose bei. Eine Hauptrolle nimmt in diesem Zusammenhang das Apolipoprotein E (ApoE) ein.

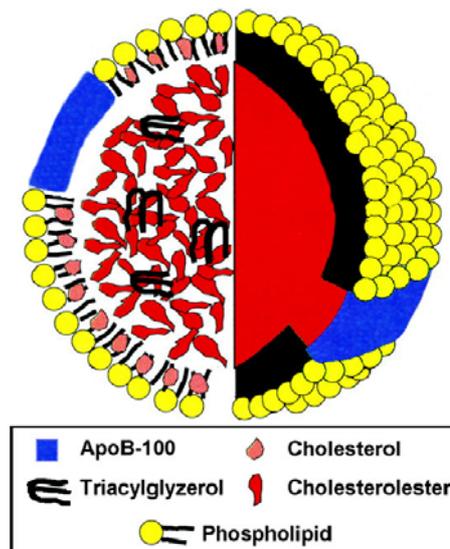


Abb. 1.1.: Modell eines Lipoproteins

Lipoproteine (hier LDL) bestehen aus einem hydrophoben Kern aus TAG und CE, die von einer amphiphatischen Schicht aus Phospholipiden und freiem Cholesterol umgeben sind. (Abbildung modifiziert nach (Segrest et al., 2001))

1.1.: Rolle des ApoE im vaskulären Lipoproteinstoffwechsel

Lipide werden im Körper zur Speicherung, Verbrennung und Weiterverarbeitung zwischen verschiedenen Organen über die Blutbahn in Lipoproteinen transportiert. Lipoproteine zeichnen sich durch eine amphiphile Hülle aus Cholesterol und Phospholipiden und einen hydrophoben Kern aus TAG und CE aus. Hauptsächlich durch die Wirkung der Lipoprotein-Lipase (LPL) werden in der Zirkulation aus dem Kern der Lipoproteine freie

Fettsäuren herausgelöst, die in der Folge von darunter liegenden Geweben wie Muskel und Fettgewebe aufgenommen werden können (Williams, 2008).

Weiterhin werden die Partikel durch strukturegebende Apolipoproteine, die in die Lipoproteinhülle eingebettet sind, funktionalisiert. Findet man auf den TAG-reichen Chylomikronen u. a. ApoB48 und auf *very-low density lipoproteins* (VLDL) bzw. *low-density lipoproteins* (LDL) ApoB100, so ist bei den *high-density lipoproteins* (HDL) das Apolipoprotein AI (ApoAI) das Struktur gebende Apolipoprotein. Daneben findet man viele weitere Apolipoproteine, die je nach Klasse unterschiedliche Aufgaben erfüllen, auf die nicht weiter eingegangen wird. Man unterscheidet der Dichte und Größe nach mehrere Klassen, die verschiedene Funktionen erfüllen (siehe Tab. 1).

Lipoprotein	Dichte [g/mL]	Ø [nm]	Apo	Apo [%]	TAG [%]	CE [%]	PL[%]	FC [%]
CM	~ 0,93	75 - 1200	B48	2	86	3	7	2
VLDL	0,93 - 1.006	30 - 80	B100, C	8	55	12	18	7
IDL	1.006 - 1,019	25 - 35	B100, C, E	19	23	29	19	9
LDL	1,019 -1,063	28 - 25	B100	22	6	42	22	8
HDL	1,063 -1,3	5 - 12	A, C, E	40 - 90	0 - 5	0 - 17	5 - 33	5

Tab. 1.: Einteilung der Lipoprotein-Klassen nach Dichte

Hauptsächlich kann zwischen TAG-reichen Lipoproteinen (TRL), darunter CM und VLDL, und den cholesterolreichen Lipoproteinen (LDL und HDL) unterschieden werden. Neben der Dichte sind Durchmesser, Apolipoprotein- und Lipidzusammensetzung charakteristisch für die einzelnen Klassen.

Prinzipiell lässt sich zwischen exogenen und endogene Lipoproteinstoffwechsel, die beide über den reversen Cholesteroltransport verknüpft sind, unterscheiden. Im exogenen (postprandialen: nach der Nahrungsaufnahme) Weg werden die Nahrungslipide von Enterozyten im Darm in Chylomikronen verpackt und zunächst in die Peripherie unter Umgehung der Leber transportiert. Die aus der Lipolyse durch LPL hervorgehenden *chylomicron remnants* (CR), die eher TAG-arm und CE-reich sind, werden schließlich durch die Leber aus der Zirkulation entfernt (siehe Abb. 1.2, (Mahley et al., 1999)).

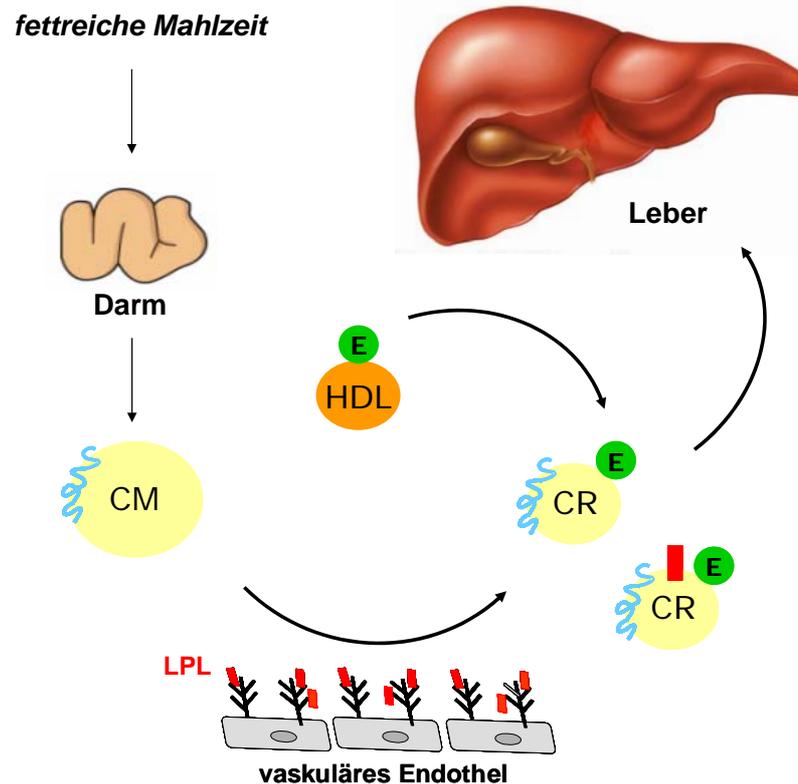


Abb. 1.2.: Postprandialer Lipoprotein-Stoffwechsel

Nach einer fettreichen Mahlzeit werden im Darm TAG-reiche Chylomikronen (CM) gebildet. Im Blutstrom werden aus TAG Fettsäuren durch die endothelständige Lipoprotein-Lipase (LPL) freigesetzt, die durch darunter liegende Gewebe (Fettgewebe, Muskel u. a.) aufgenommen werden. Auf die entstandenen *remnant*-Partikel wird aus der HDL-Fraktion ApoE übertragen. ApoE und LPL auf den Partikeln vermitteln die Aufnahme der Partikel in die Leber über Bindung an Lipoproteinrezeptoren und Heparansulfatproteoglykane.

Als Strukturprotein der CR dient das ApoB48, eine verkürzte Version des ApoB100. Allerdings wird die Aufnahme anders als im endogenen Weg nicht über ApoB, sondern über ApoE vermittelt, das sowohl an den LDL-Rezeptor (LDLR) (Brown et al., 1981; Brown und Goldstein, 1986; Goldstein und Brown, 1990) als auch an das *LDLR-related protein 1* (LRP1) (Beisiegel et al., 1989; Rohlmann et al., 1998) binden kann (siehe auch 1.4). Das ApoE wurde erstmals als Bestandteil der VLDL beschrieben (Shore und Shore, 1973), ist aber auf allen Klassen der Lipoproteine zu finden - außer auf LDL. VLDL transportieren im endogenen Weg Lipide von der Leber in die Peripherie, wobei durch fortschreitende Lipolyse zunächst *intermediate-density lipoproteins* (IDL) und schließlich LDL gebildet werden. LDL enthalten nur noch CE und sind daher besonders atherogen. Der Körper besitzt jedoch die Möglichkeit, überschüssiges Cholesterin in Form von HDL aus der Peripherie zur Leber und damit über die Galle zur Ausscheidung zu transportieren (reverser Cholesterintransport). Diesen Prozess kann ApoE fördern, in dem es zur HDL-

Bildung beiträgt (Heeren et al., 2006). Folglich sind Störungen der ApoE-Funktion sowohl im ApoE-defizienten Mausmodell als auch beim Menschen mit einer Akkumulation von *remnant*-Partikeln und niedrigen HDL-Spiegeln verbunden (Zhang et al., 1992; Plump et al., 1992). Diese Störungen des systemischen Lipoproteinstoffwechsels sind letztendlich auch mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (vor allem Atherosklerose) verbunden. Hierbei lagern sich vorwiegend kleine, cholesterolreiche Lipoproteine wie LDL oder *remnants* in der Arterienwand ab und löst eine chronische Entzündungsreaktion aus, die ultimativ zu Herzinfarkt und Schlaganfall führen kann (Ross, 1999; Lusis, 2000). Die Mehrheit des in der Zirkulation befindlichen ApoE stammt aus der Leber (Elshourbagy et al., 1985). Daneben wird das ApoE aber auch noch im hohen Maße im Gehirn (Herz und Beffert, 2000), im Fettgewebe (Zechner et al., 1991), in Makrophagen (Mazzone, 1996) und in den knochenbauenden Osteoblasten exprimiert (Schilling et al., 2005). Auf die Struktur und die einzelnen Aufgaben des ApoE in den genannten Zelltypen und Geweben wird im Folgenden eingegangen.

1.2.: Struktur des ApoE-Moleküls

Das humane ApoE-Gen besteht aus vier Exons, die durch drei intrinsische Sequenzen voneinander getrennt werden. Das primäre Translationsprodukt besteht aus 317 Aminosäuren, wobei die ersten 18, N-terminal gelegenen Aminosäuren als Signalpeptid fungieren, das ApoE zum endoplasmatischen Retikulum dirigiert (Zannis et al., 1984). Von dort aus nimmt ApoE den klassischen Weg sezernierter Proteine, obschon dieser Prozess im Falle des ApoE kompliziert reguliert wird: ein Großteil der entstandenen Proteine wird gleich wieder degradiert (Mazzone et al., 1992; Duan et al., 1997), und diejenigen Moleküle, die die Zelloberfläche erreichen, können dort über Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) (Lucas und Mazzone, 1996) und Lipoproteinrezeptoren wie dem LDLR (Brown und Goldstein, 1986; Goldstein und Brown, 1990; Brown et al., 1981) und dem LRP1 (Beisiegel et al., 1989; Rohlmann et al., 1998) schnell wieder in die Zelle internalisiert werden. Ob ApoE tatsächlich die Zelloberfläche verlässt, wird auch durch die Konzentration von Lipiden bzw. Lipoproteinen im Serum bzw. Zellkulturüberstand beeinflusst, weil ApoE mit hoher Affinität an dort vorhandene Lipide bzw. Lipoproteine binden kann. ApoE enthält zwei unabhängig von einander gefaltete Domänen, die mit einer proteasesensitiven Schleife verbunden sind (siehe Abb. 1.3).

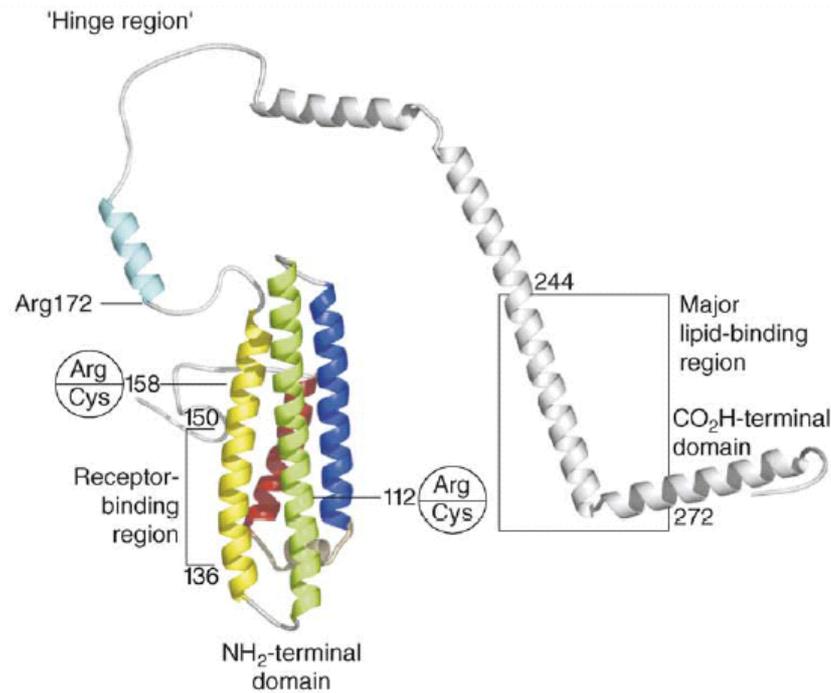


Abb. 1.3.: Struktur des Apolipoprotein E

Im ApoE liegt N-terminal ein gefaltetes Helix-Bündel vor, das über eine proteasesensitive Schleife (*hinge region*) mit der Lipidbindungsdomäne verbunden ist. In dem Helix-Bündel liegen die in den ApoE-Isoformen ApoE2 und ApoE4 mutierten Aminosäuren Cys¹¹² und Arg¹⁵⁸, die entscheidenden Einfluss auf die intramolekulären ionischen Wechselwirkungen und damit auch auf die Rezeptorbindungseigenschaften der ApoE-Isoformen haben (modifiziert nach (Hatters et al., 2006)).

Die N-terminale Domäne besteht aus vier amphipatischen α -Helices, die anti-parallel zu einander angeordnet sind. In diesem Bereich finden sich die arginin- und lysinreichen Sequenzen, die die Bindung an saure Seitenketten des LDLR und LRP1 vermitteln (Wilson et al., 1991). Die C-terminale Region bindet mit hoher Affinität Lipide und hydrophobe Oberflächen und ist für die Selbstbindung in Abwesenheit von Lipiden verantwortlich. Auch wenn die exakten 3D-Anordnungen in diesem Bereich nicht bekannt sind, wird vermutet, dass der Lipidierungsgrad maßgeblich für die intra- und extrazelluläre Stabilität verantwortlich ist (Hatters et al., 2006).

Beim Menschen kommt das ApoE in drei Isoformen vor: ApoE2 (Cys¹¹²; Cys¹⁵⁸), E3 (Cys¹¹²; Arg¹⁵⁸) und E4 (Arg¹¹²; Arg¹⁵⁸) (Greenow et al., 2005). Auch wenn diese Isoformen sich nur durch eine Aminosäure unterscheiden, hat dieser Austausch jedoch eine starke Auswirkung auf die Struktur des Moleküls und damit auch auf dessen Funktion. Die im ApoE3 vorhandenen Salzbrücken sind im ApoE2 und ApoE4 aufgelöst bzw. verändert, was im Falle des ApoE2 zur drastischen Reduktion der Affinität für den LDLR führt (<2%,

(Mahley et al., 1999)). Darüber hinaus sind auch die Eigenschaften, Lipoproteine zu binden verändert: ApoE2 und ApoE3 binden präferenziell an HDL während ApoE4 vermehrt an VLDL bindet (Huang, 2010). Zusammen genommen bringen diese Eigenschaften der Isoformen auch Konsequenzen für den vaskulären Lipoprotein-stoffwechsel mit sich, in der Form, dass – verglichen mit ApoE3 – ApoE2 eher mit verringerten Cholesterol- und höheren ApoE-Spiegeln (Hyperlipoproteinämie Typ III nach Frederickson), ApoE4 eher mit höheren Cholesterol- und verringerten ApoE-Spiegeln assoziiert ist. Bei den meisten Typ III-Patienten, die homozygot für APOE2 sind, liegt jedoch eine sogenannte balancierte Dysbetalipoproteinämie vor, die paradoxerweise eher einen schützenden Effekt auf kardiovaskulären Erkrankungen hat. Erst durch weitere Störungen entwickelt sich bei ca. 1% der Betroffenen ein schädliches Lipoproteinprofil. ApoE4 hat dahingegen stets einen verstärkenden Effekt auf die Ausbildung von kardiovaskulären Erkrankungen (Wilson et al., 1996) und ist ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit (Herz und Beffert, 2000).

1.3.: Rolle des ApoE in der Entstehung der Atherosklerose

Atherosklerose und die daraus entstehenden kardiovaskulären Erkrankungen gehen auf die genetisch oder durch Umweltfaktoren wie Ernährung, körperliche Inaktivität u. ä. bedingte Erhöhung des LDL- und gleichzeitige Absenkung des HDL-Cholesterols zurück (Ross, 1999; Lusis, 2000). Je höher die LDL-Konzentration in der Zirkulation desto mehr LDL-Partikel sammeln sich in der Gefäßwand an. In einem komplexen Prozess, der Jahrzehnte dauern kann, bilden sich so genannte atherosklerotische Plaques. Dabei unterlaufen LDL chemische Modifizierungen und werden von infiltrierenden Makrophagen „gefressen“ und abgebaut. Dieser a priori physiologische Prozess, der eigentlich der Säuberung der Gefäßwand dient, wandelt sich in einen pathophysiologischen um, sobald die LDL-Menge die Kapazität der Makrophagen übersteigt und zum Absterben der überladenen Makrophagen (dann Schaumzellen genannt) führt. Hierdurch wird eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst, die im Folgenden weitere Zellen des Immunsystems anlockt. Der fortgeschrittene, klinisch relevante atherosklerotische Plaque zeichnet sich durch einen nekrotischen Kern von abgestorbenen Schaumzellen mit Cholesterolkristallen und eine Vielzahl von anderen Zelltypen aus (siehe Abb. 1.4). Entsteht eine Ruptur des Plaques, kommt es zu einer Gerinnungsreaktion, die das Gefäß verschließen und so einen Herzinfarkt oder Schlaganfall auslösen kann.

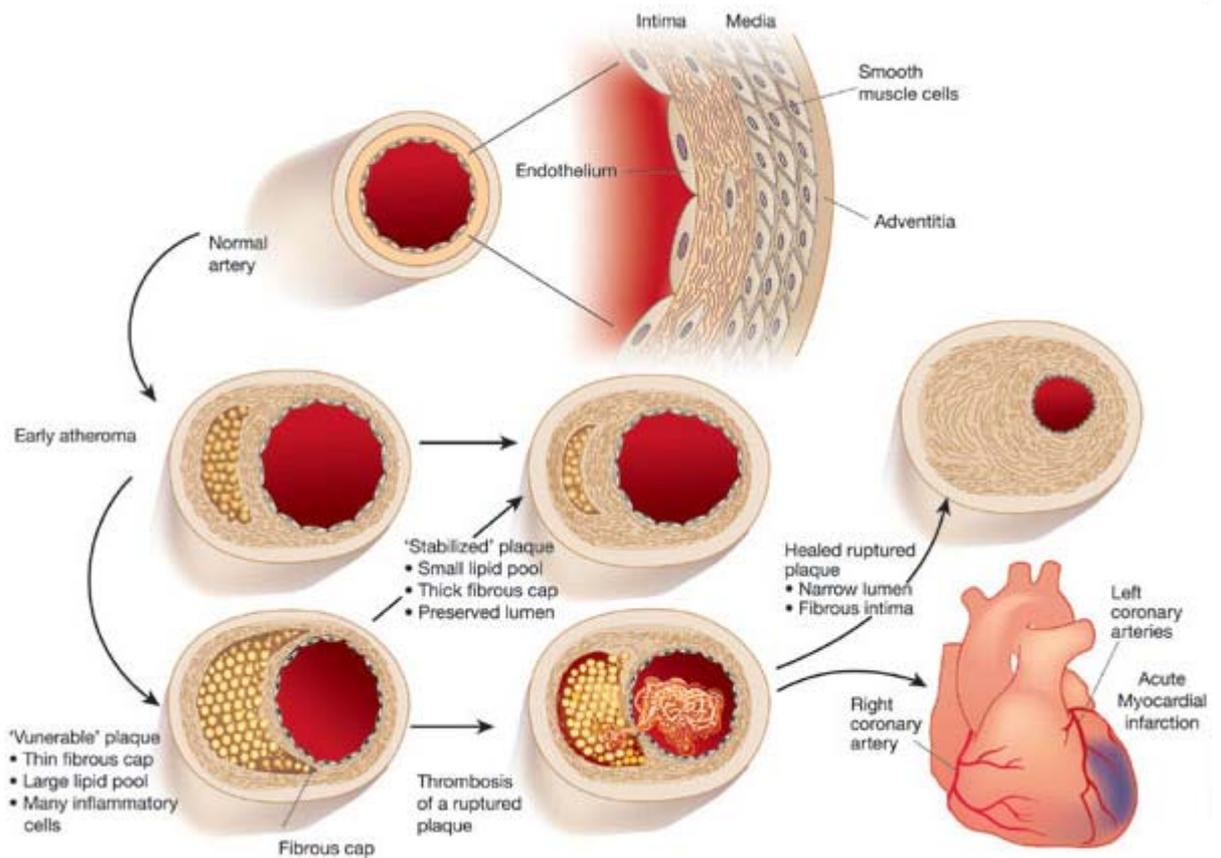


Abb. 1.4.: Entstehung eines atherosklerotischen Plaques

In einem frühen Stadium sammeln sich in der Gefäßwand Schaumzellen, die aus cholesterolbeladenen Makrophagen entstanden sind. Im Verlauf wächst der Plaque in das Gefäßlumen und kann durch eine Thrombose das Gefäß verschließen, was zu einem Herinfarkt oder Schlaganfall führen kann (nach (Libby, 2002))

Auch wenn etabliert ist, dass das ApoE einen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen hat, stellt sich die Frage, welche Mechanismen zu Grunde liegen. Hierzu liefert das ApoE-defiziente Mausmodell einige Erkenntnisse. Dieses Tiermodell zeichnet sich durch eine schwere Hypercholesterolämie aus, wobei dazu noch der HDL-Spiegel stark erniedrigt ist und weist schon frühzeitig fortgeschrittene atherosklerotische Plaques auf (Zhang et al., 1992; Plump et al., 1992). Einerseits als gesichert gilt, dass durch die Wirkung des ApoE als Ligand für den LDLR und das LRP1 die atherogenen, cholesterolreichen CR aus der Zirkulation entfernt werden (Rohmann et al., 1998; Laatsch et al., 2009). Andererseits spielt das ApoE, das von Zellen in der Peripherie und ins Besondere von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen produziert wird, eine sehr wichtige Rolle beim Abtransport von überschüssigem Cholesterol zur Leber (Heeren et al., 2006), welches über die Galle ausgeschieden werden kann (dieser Prozess wird als reverser Cholesteroltransport bezeichnet).

1.4.: Rolle des ApoE in der Leber

Die Leber und vor allem Hepatozyten produzieren den Großteil des in der Blutbahn vorkommenden ApoE. Wie oben beschrieben, folgt das ApoE dem sekretorischen Pfad der Proteinsynthese. Auf diesem Weg wird das ApoE mit Lipiden beladen und kann auf diese Weise z.B. Cholesterol aus der Zelle befördern. Gelangt ApoE an die Zelloberfläche, so wird es durch HSPG sequestriert. Neben der Sekretion von ApoE als eigenständiges Protein, wird ApoE bei der Produktion von VLDL auf die entstehenden Partikel übertragen (Mensenkamp et al., 2001). ApoB, das Strukturprotein der VLDL, wird während der Passage durch die ER-Membran kotranslational durch MTP lipidiert, da dieses große Protein nur im lipidierten Zustand stabil ist (Hussain et al., 1996). Im zweiten Schritt reifen die primordialen VLDL im Golgi-Apparat, in dem Lipide (vornehmlich TAG) und andere Apolipoproteine, darunter auch ApoE, addiert werden (Mensenkamp et al., 2001; Gusarova et al., 2007). Allerdings scheint die Addition von einigen Apolipoproteinen nicht essentiell für die Reifungsprozesse zu sein.

ApoE, das im Plasma vorwiegend gebunden an HDL vorkommt, wird in der postprandialen Phase auf CM übertragen und trägt zur Aufnahme dieser Partikel über den LDLR und LRP1 in die Leber bei. HSPG wurden zwar mit der Aufnahme, d.h. Internalisierung in Verbindung gebracht, doch erscheint es eher wahrscheinlich, dass die erste Bindung an die Zelloberfläche durch HSPG vermittelt wird, von wo aus LDLR und LRP1 die nachfolgende Internalisierung bewerkstelligen. Diese Rezeptoren unterscheiden sich allerdings prinzipiell in ihrer Wirkungsweise. Während der LDLR dem klassischen Weg der *clathrin-coated pits* folgt und im 15 min-Takt zwischen dem endosomalen System und Zellmembran zirkuliert (Brown et al., 1981; Brown und Goldstein, 1986; Goldstein und Brown, 1990), wird LRP1 erst in der postprandialen Phase von endosomalen Kompartimenten an die Zellmembran befördert (Laatsch et al., 2009). Auch nach der Bindung des Liganden verhalten sich beide Rezeptoren unterschiedlich. Liganden, die vom LDLR an lysosomale Kompartimente geliefert werden, werden ausnahmslos degradiert. Einige Liganden, die vom LRP1 transportiert werden, können dem Abbau entgehen und gelangen wieder an die Zellmembran – darunter das ApoE (Heeren et al., 1999). Für CR ist das sogenannte ApoE-Recycling beschrieben, bei dem das Gros der Lipide und ApoB48 degradiert, ApoE und eine residuale Menge an Lipiden aber als so genannte *surface remnants* gebunden an LRP1 dem Abbau entkommen (Heeren et al., 2001). Dieser Prozess kann durch HDL stimuliert werden, derart, dass HDL in endosomalen Kompartimenten *surface remnants* treffen und sich HDL_E bilden, die so zum Cholesterolefflux beitragen (Heeren et al., 2003).

1.5.: Rolle des ApoE in Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems, die universell Fremdkörper, Pathogene u. ä. über Phagozytose aufnehmen und helfen, eine systemische Immunantwort gegen etwaige Eindringlinge und Fremdkörper zu generieren. Man unterscheidet zum einen geweberesidente (z.B. Kupffer-Zellen in der Leber), zum anderen infiltrierende Makrophagen, die aus zirkulierenden Monozyten entstehen und durch lokale Entzündungen angezogen werden. Die verschiedenen Zelltypen lassen sich über bestimmte Oberflächenmarkermoleküle (CD68 u. a.) unterscheiden. Auch wenn LDL in der Arterienwand keine Fremdkörper darstellen, so werden durch die Retention chemische Prozesse ausgelöst, die zur u.a. zu Oxidation, Acetylierung und Aggregation dieser Partikel führen. Hierdurch wird eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst, die Zelladhäsionsmoleküle auf Endothelzellen induziert und zur Monozyteneinwanderung führt (siehe Abb. 1.4; (Ross, 1999; Lusis, 2000)). Die resultierenden Makrophagen nehmen die für Phagozytose und Degradation markierten LDL auf. Durch die Aufnahme von LDL werden Makrophagen mit Cholesterol beladen, was eine Induktion von sowohl ApoE-Produktion (über den Transkriptionsfaktor *liver X receptor* (Laffitte et al., 2001)) als auch –Sekretion veranlasst (Mazzone et al., 1987). Im Tiermodell ist dieses ApoE in der Lage, vor der Bildung von atherosklerotischen Plaques zu schützen (Linton et al., 1995). Wenn ApoE-defiziente Tiere mit Knochenmark von Wildtyp-Tieren transplantiert werden, so wird zwar nicht das Lipoproteinprofil wiederhergestellt, sehr wohl lässt sich aber eine starke Regression der Atherosklerose beobachten. Der mit der Sekretion von ApoE verbundene Cholesterolefflux zu vor allem HDL fördert den reversen Cholesteroltransport zur Leber, wo überschüssiges Cholesterol ausgeschieden werden kann (Mazzone, 1996). Sehr wichtig für diesen Prozess ist dazu das *ATP-binding cassette transporter A1*, welches mit der C-terminale Lipidbindungsdomäne des ApoE interagieren kann und so den Cholesteroltransfer und HDL-Bildung direkt beeinflussen kann (Yancey et al., 2007).

1.6.: Adipozyten und Fettgewebe: Fettleibigkeit und zelluläre Konsequenzen

Weißes Fettgewebe, das aus Adipozyten, Kapillargefäßen, Makrophagen und den jeweiligen Vorläuferzellen besteht, ist in erster Linie ein Organ, das Glukose und Fettsäuren postprandial als TAG speichert und in Zeiten der Nahrungskarenz Fettsäuren für den Rest des Körpers wieder bereitstellt. Folgerichtig ist das wichtigste Hormon, das die Adipozytenfunktion steuert das anabole Insulin. Auch wenn die Kapazität einzelner Adipozyten, kalorienreiche Moleküle zu speichern besonders groß ist, führt heutzutage das Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und –verbrennung zu den Volkskrankheiten Übergewicht (Adipositas) und Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) (Hossain et al., 2007). Neben den alltäglichen Einschränkungen, die diese Krankheitsbilder mit sich bringen, sind vor allem die stark erhöhten Risiken, kardiovaskuläre Komplikationen zu entwickeln, besonders gefährlich (Mazzone et al., 2008).

Zu Beginn der Promotion wurde in Pionier-Arbeiten zwar gezeigt, das ApoE an der Adipogenese und Fettakkumulation beteiligt ist (Schreyer et al., 2002; Huang et al., 2006; Gao et al., 2007), doch die exakten Mechanismen sowohl auf zellulärer Ebene als auch systemisch sind unklar. Im Folgenden werden die Mechanismen, die der Entstehung von Insulinresistenz zu Grunde liegen, näher beschrieben und mögliche Verbindungen zu der Rolle von ApoE aufgezeigt.

Die treibende Kraft, die hinter der Entstehung von T2DM steht, ist die nachlassende Wirkung des Insulins, beschrieben als Insulinresistenz (Guilherme et al., 2008). Man bezeichnet eine Situation, in der zwar ein chronisch hoher Insulinspiegel vorliegt, jedoch die Wirkung auf Leber (hepatische Insulinresistenz) und/oder Fettgewebe und Muskel (periphere Insulinresistenz) stark abgeschwächt bzw. nicht mehr vorhanden ist. Klinisch wird die Situation dann als T2DM bezeichnet, wenn die Insulinproduktion in der Bauchspeicheldrüse zum Erliegen kommt. Anstatt einer Hyper- liegt eine Hypoinsulinämie vor und der Patient muss dann mit exogenem Insulin behandelt werden. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass verschiedene Depots des weißen Fettgewebes andere Risiken für die Entstehung des T2DM mitbringen. Generell kann zwischen viszeralem und subkutanem Fettgewebe unterschieden werden, das sich primär über die Lage innerhalb oder außerhalb der Bauchdecke definiert. Vermehrte Ansammlung von viszeralem Fettgewebe, das auch als Bauch- oder Organfett bezeichnet wird, birgt ein höheres Risiko als Ansammlungen der subkutanen Depots (Gesta et al., 2007). Auch wenn dieser Zusammenhang noch nicht vollständig verstanden ist, sind diese regionalen Unterschiede wohl der zellulären Komposition des Organs und der unterschiedlichen Eigenschaften, auf Kalorienbeladung zu reagieren, geschuldet. In diesem Zusammenhang könnte ApoE durch seine Funktion als Lipidtransportmolekül die

Verteilung zwischen viszeralem und subkutanem Fettgewebe entscheiden und damit direkt auf die Entstehung der Insulinresistenz einwirken.

Ein wichtiger Ansatz zur Therapie von Insulinresistenz birgt die Anwendung von Thiazolidinedionen, darunter das Rosiglitazon, das direkt den wichtigsten Transkriptionsfaktor in Adipozyten, den *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) aktiviert (Forman et al., 1995). Auch wenn die Wirkung von Rosiglitazon schon in anderen Zellen demonstriert wurde (Brunham et al., 2007), liegt ein Haupteffekt in der Expansion des Fettgewebes, der Patient nimmt zu. Jedoch geht mit dieser augenscheinlichen Verschlechterung des Zustands eine Verbesserung der metabolischen Parameter einher, weil durch die Expansion Lipide von Orten im Körper, wo die Lipide eine schädliche Wirkung entfalten, im Fettgewebe „sicher verpackt“ werden (Kim et al., 2007). PPAR γ ist neben dem *CCAAT-enhancer binding protein* α (C/EBP α) der wichtigste Transkriptionsfaktor für den Übergang von Vorläuferzelle zu Adipozyt (Rosen und MacDougald, 2006) und beeinflusst die Expression von für die Adipozyten essentiellen Genen maßgeblich. Seine Aktivierung auch durch Fettsäuren und Fettsäurederivate führt folglich zu vermehrter Fettzellbildung und gesteigerter Aktivität (Tontonoz und Spiegelman, 2008). Der Transport von Fettsäuren könnte durch ApoE beeinflusst sein und folglich auch der Aktivierungsgrad von PPAR γ .

Heute wird das Fettgewebe als endokrines Organe gesehen, dass sehr dynamisch auf Kalorienbeladung reagiert. Durch das in Adipozyten produzierte Zytokin (auch Adipokin) Leptin wird bestimmten Neuronen im Gehirn ein Sättigungssignal gesendet, was stark die Appetitregulation beeinflusst (Coll et al., 2007). Dabei korreliert die Leptinausschüttung mit dem Lipidgehalt der Adipozyten. Folgerichtig sind sowohl Patienten als auch die natürlich auftretende Mausmutante *ob/ob* (Ingalls et al., 1950), denen beiden funktionell das Leptin fehlt, hyperphagisch und stark übergewichtig und leiden unbehandelt an T2DM. Ein anderes Hormon, dem eine protektive Rolle im systemischen Energiestoffwechsel zu gesprochen wird, ist das anti-diabetische Adiponektin. Es ist das mengenmäßig häufigste Hormon in der Zirkulation und der Blutspiegel korreliert in humane Studien negativ mit T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen (Tilg und Moschen, 2006). Durch Bindung an die Adiponektinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in Muskel, Fettgewebe und Leber hat Adiponektin einen direkten Einfluss auf den Fettstoffwechsel und Mitochondrienfunktion und damit auch auf Insulinsensitivität (Iwabu et al., 2010). Interessanterweise können Adipozyten – ähnlich wie Makrophagen – auch eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen ausschütten, die eine Entzündungsreaktion auslösen können. Darunter sind *tumor necrosis factor* α (TNF α), *interleukin 6* (IL-6) und das *monocyte-chemoattractant protein 1* (MCP1), welche bei Überladung abgegeben werden (Abb. 1.5; (Tilg und Moschen, 2006)).

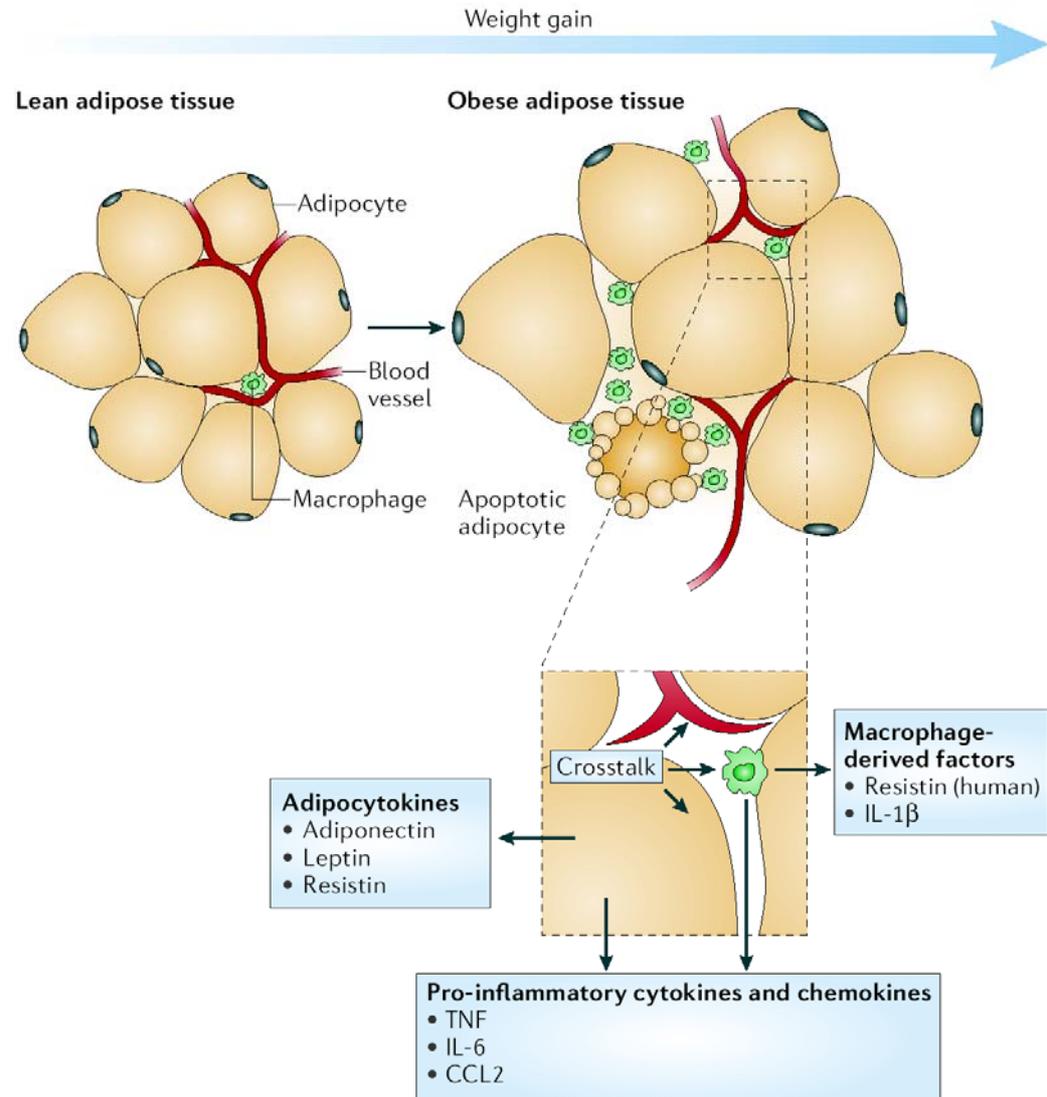


Abb. 1.5.: Chronische Entzündung im weißen Fettgewebe

Im gesunden Fettgewebe eines Normalgewichtigen (*lean adipose tissue*) finden sich nur wenige Makrophagen. Im Verlauf der Entstehung einer Adipositas mit hypertrophen Fettgewebe (*obese adipose tissue*) sammeln sich Lipide an, die Adipozyten wachsen im Durchmesser und es wandern vermehrt Makrophagen ein. Beide Zelltypen produzieren pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine (TNF α , IL-6 und CCL2), die die Ausschüttung von Adipokinen (Adiponektin und Leptin) beeinflussen und somit die zelluläre Insulinresistenz verstärken (modifiziert nach (Tilg und Moschen, 2006)).

Es zeichnet sich daher ein kompliziertes Bild, bei dem bei fortschreitender Nahrungsaufnahme die Adipozyten im Durchmesser wachsen, stetig mehr Leptin und weniger Adiponektin und ab einem gewissen Zeitpunkt auch verstärkt TNF α , IL-6 und MCP1 (kodiert vom Gen *CCL2*) abgegeben werden. Das MCP1 ist ein so genanntes Chemokin, das auf kurze Distanz Monozyten bzw. Makrophagen anzieht, die dann über die

proinflammatorische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 aktiviert werden. An diesem Punkt steigern sich die Immunantworten von Adipozyten und Makrophagen gegenseitig und verstärken jeweils ihre Zytokinsekretion.

Bei der Entstehung der Insulinresistenz ist die chronische Entzündung im Fettgewebe von entscheidender Bedeutung (Hotamisligil, 2006; Hotamisligil, 2010): $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 führen direkt über Aktivierung von so genannten „Stresskinasen“ (ins Besondere der *jun N-terminal kinase*, JNK) zur zellulären Insulinresistenz von Adipozyten, wobei ins Besondere die Signalkaskade des Insulinrezeptors gestört ist (Hirosumi et al., 2002). Ein pathophysiologisches Hauptmerkmal ist, dass die Adipozyten ihre Lipide nicht nur dann abgeben, wenn ein Hungerzustand vorliegt, sondern dass unkontrolliert Lipolyse stattfindet und aus TAG heraus gelöste freie Fettsäuren in die Zirkulation abgegeben werden (Guilherme et al., 2008). Von der Leber aufgenommen, werden diese als TAG in VLDL verpackt und wieder in die Peripherie geschickt. Da auch die Aufnahme in Adipozyten gestört ist, gelangt eine Restmenge an Lipiden in andere Organe (ektope Ablagerungen in beispielsweise Muskelgewebe) oder verbleibt in der Zirkulation als VLDL remnants. Ähnlich verhält sich mit der Aufnahme von Glukose. Im Normalzustand stimuliert Insulin die Translokation des Glukose-Transporters GLUT4 von endosomalen Kompartimenten an die Zelloberfläche, von wo aus die Glukose aufgenommen und über den Weg der *de novo*-Lipogenese als TAG gespeichert werden kann (Guilherme et al., 2008). Im Zustand der Insulinresistenz ist zum einen die Insulinwirkung abgeschwächt, zum anderen ist auch die Expression des GLUT4-Gens *SLC2A4* reduziert, so dass typischerweise während eines oralen Glukosetoleranz-Testes a) höhere basale Blutglukose (Hyperglykämie) und auch b) längere Retentionszeiten mit einer höherer Maximalkonzentration im Blut gemessen werden können.

Neben Insulin, Adiponektin und Leptin ist kürzlich ein weiteres Hormon identifiziert worden, das an der systemischen Regulation der Insulinresistenz beteiligt ist. Es handelt sich hierbei um die Fettsäure Palmitoleat (C16:1n-7), das die Autoren als „Lipokin“ bezeichnen (Cao et al., 2008). Dieses Lipokin ist in Mausstudien mit verbesserter Insulinwirkung und Adipositas mit niedrigeren C16:1n-7-Spiegeln assoziiert. Beispielhaft wird dadurch deutlich, dass nicht nur die Menge an Lipiden sondern anscheinend auch die exakte Komposition der Fettsäuren in den Lipiden im Blut aber auch in Leber und Fettgewebe von Bedeutung ist. Daher stellt sich die Frage, ob ApoE in seiner Funktion als Lipidtransportmolekül nicht nur die Menge, sondern auch die Komposition der TAG in Adipozyten und Leber maßgeblich beeinflusst. In Pionier-Arbeiten wurde zwar gezeigt, dass ApoE an der Adipogenese beteiligt ist (Schreyer et al., 2002; Huang et al., 2006; Gao et al., 2007), doch die exakten Mechanismen sind unklar. Neben der Funktion als

Transportmolekül kann ApoE auch in die Signalweiterleitung in vielen Signalkaskaden (z.B. PDGF, IL-1 β) eingreifen (Boucher et al., 2003; Kawamura et al., 2007), ein Feld, das in Bezug auf ApoE und Fettgewebe weitgehend unerforscht ist.

1.7.: Rolle des ApoE im Knochengewebe

Mineralisierter Knochen unterliegt dem ständigen Entgegenwirken aus Abbau durch Osteoclasten und Aufbau durch Osteoblasten (Abb. 1.6). Überwiegt ein Prozess, so kommt es zu Erkrankungen wie Osteoporose (mehr Abbau) oder Osteopetrose (mehr Aufbau) (Zaidi, 2007). Während Osteoclasten aus der myeloiden Stammzelllinie entspringen, entstehen Osteoblasten – wie Adipozyten - aus mesenchymalen Stammzellen (Rosen und Bouxsein, 2006). In der Entstehung wird festgelegt, ob eine Zelle zu einem Präosteoblasten oder Präadipozyt differenziert (Abb. 1.6).

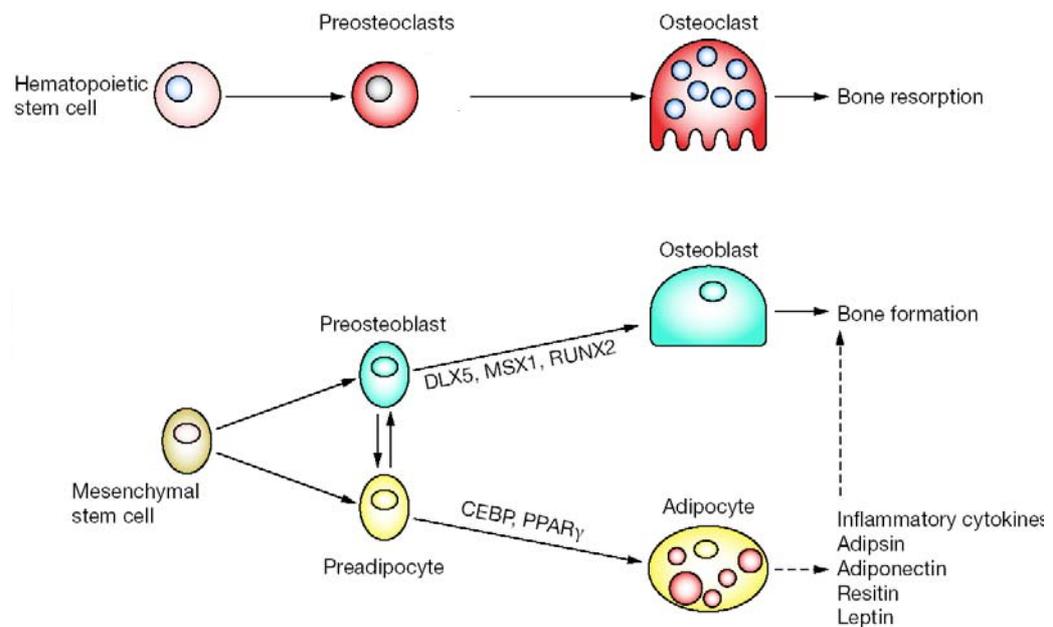


Abb. 1.6.: Entstehung von Osteoclasten, Osteoblasten und Adipozyten

Im Gegensatz zu Osteoclasten, den knochenabbauenden Zellen, die aus hämatopoetischen Vorläufern hervor gehen, stammen sowohl Osteoblasten als auch Adipozyten von mesenchymalen Stammzellen ab und sind daher eng miteinander verwandt. Während Osteoblasten, die knochenaufbauenden Zellen, durch die Transkriptionsfaktoren DLX5, MSX1 und RUNX2 bestimmt werden, sind die Schlüsselfaktoren für die Adipozytendifferenzierung C/EBP α und PPAR γ (modifiziert nach (Rosen und Bouxsein, 2006)).

Entscheidend für diesen Übergang ist eine Gruppe von Molekülen, deren Signale und Signalweiterleitung als WNT *signalling* bekannt sind (Clevers, 2006). Zuerst entdeckt in *Drosophila Melanogaster*, lassen sich die WNT-Moleküle als Morphogene bezeichnen, die vornehmlich entwicklungsbiologisch relevant sind. Bei dem kanonischen Signalweg bindet ein WNT-Molekül an einen *Frizzled*-Rezeptor und an die Lipoproteinrezeptoren LRP5 oder LRP6 als Korezeptoren auf der Zelloberfläche. Über weitere Zwischenschritte wird ein Komplex, der den Transkriptionsfaktor β -Catenin enthält, zersetzt und das β -Catenin wandert in den Zellkern, wo ein genregulatorisches Programm nachgeschaltet ist. Grundsätzlich inhibiert das kanonische WNT *signalling* primär über WNT10b Adipogenese während es die Osteoblastendifferenzierung über WNT5a fördert (Schett et al., 2008; Christodoulides et al., 2009).

Neben den Lipoproteinrezeptoren LRP5 und LRP6 ist auch das LRP1 mit WNT *signalling* in Verbindung gebracht worden (Zilberberg et al., 2004; Terrand et al., 2009). In Anbetracht der Tatsache, dass alle Lipoproteinrezeptoren ApoE binden können, liegt es nahe, dass ApoE mit WNT-Molekülen um die Bindung an LRP1, LRP5 und LRP6 konkurriert und somit in die Signalweiterleitung eingreifen könnte. Übereinstimmend mit dieser Hypothese ist die Beobachtung, dass *ApoE*^{-/-}-Tiere ein vermehrtes Knochenwachstum zeigen (Schilling et al., 2005) und das Osteoblasten direkt über ApoE in ihrer Funktion beeinflusst werden. Medizinisch bedeutsam ist, das Übergewichtige oft auch einen Knochenphänotyp zeigen (Rosen und Bouxsein, 2006; Karsenty, 2006), doch bleibt es unklar, ob Übergewicht eher mit mehr oder weniger Knochenbildung assoziiert ist – und ob ApoE bei diesen Prozessen eine Rolle spielt.

1.8.: Rolle des ApoE im braunen Fettgewebe

Braunes Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT) zeichnet sich zwar durch eine starke Lipidakkumulation aus, doch erfüllt es andere Funktionen als das weiße (Cannon und Nedergaard, 2004). Die braune Farbe dieses Gewebes entsteht durch eine hohe Konzentration von Mitochondrien, die zusammen mit den *lipid droplets* (intrazelluläre Fettspeicher) für seine Funktion essentiell sind (Abb. 1.7).

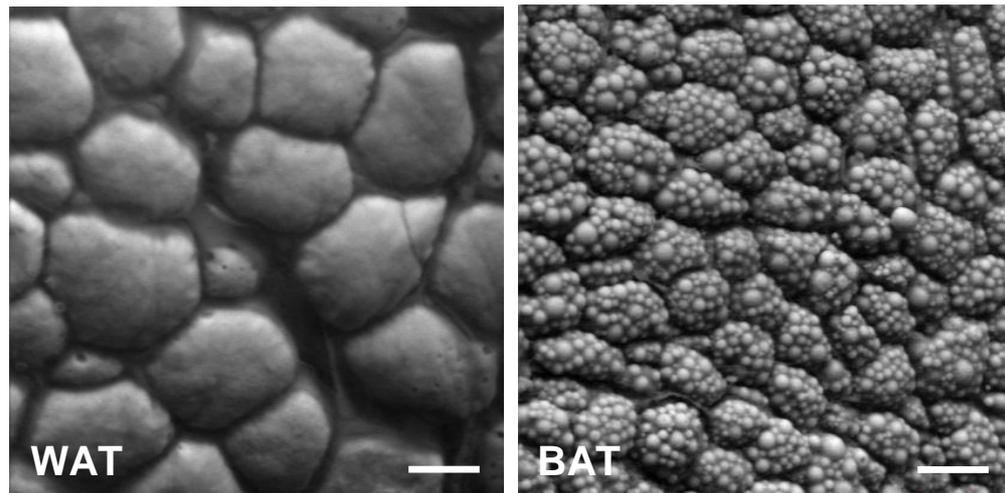


Abb. 1.7.: Weißes und braunes Fettgewebe

Während sich weißes Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT) durch einen monolokulären Fetttropfen auszeichnet, sind die Lipide im braunen Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT) multilokulär verteilt (*environmental scanning electron microscopy*, ESEM-Bilder von Julia Thomas-Morr, Balken 25 µm)

Evolutionär gesehen kommt dieses Gewebe nur bei Säugern vor, und wird benötigt, um den homoiothermen Körper vor niedrigen Umgebungstemperaturen zu schützen. Dafür sind braune Adipozyten mit einem Protein, dem *uncoupling protein 1* (UCP1) ausgestattet, das ermöglicht, in der mitochondriellen Atmungskette den Elektronentransport von der ATP-Synthese abzukoppeln und so durch diese stark exotherme Reaktion Wärme zu produzieren (dieser Prozess wird als *non-shivering thermogenesis* bezeichnet). Das braune Fett ist stark vaskularisiert, so dass das hindurch fließende Blut aufgewärmt und die Wärme in den Rest des Körpers transportiert wird. Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass Erwachsene – im Gegensatz zu Kleinkindern - kein BAT mehr besitzen, doch wurde neben der Präsenz in Erwachsenen sogar die inverse Korrelation mit Fettmasse gezeigt (Cypess et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Marken Lichtenbelt et al., 2009). Da BAT durch das „Verbrennen“ von sowohl Glukose als auch Fettsäuren einen starken Energiebedarf- und umsatz hat, wird spekuliert dieses Gewebe als Therapieansatz für Adipositas und andere Erkrankungen zu nutzen (Farmer, 2009; Enerback, 2010). In Bezug auf ApoE ist weder seine Expression noch eine potentielle Funktion in diesem Gewebe bekannt, doch weil BAT dem weißen Fettgewebe ist vielen Eigenschaften ähnlich ist, erscheint es wahrscheinlich, dass ApoE auch von braunen Adipozyten produziert wird.

Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie das multifunktionelle Lipidtransportmolekül ApoE die Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz im Mausmodell beeinflusst. Unter Verwendung des ApoE-defizienten Mausmodells, dem genetisch dasjenige Gen fehlt, das für ApoE kodiert, soll charakterisiert werden, welche Rolle ApoE bei der mit einer fettreichen Nahrung induzierten Adipositas spielt und welche Organe im Körper, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind, dabei von Bedeutung sind. Dafür wird Wild-Typ- und ApoE-defizienten Tieren eine Hochfett- bzw. Kontrolldiät gefüttert um Adipositas auszulösen. Neben makroskopischen Veränderungen im Körper wie Gewicht- und Fettansammlung, sollen Lipide in Leber und Fettgewebe quantifiziert und auch in ihrer biochemischen Zusammensetzung analysiert werden. Mit molekularbiologischen Methoden soll bestimmt werden, wie sich exzessive und ektope Lipidablagerung, die mit Adipositas verbunden sind, auf chronische Entzündungsprozesse in Leber und Fettgewebe auswirkt. Entwicklung von Knochen- und Fettgewebe sind entwicklungsbiologisch eng miteinander verknüpft, weshalb hier der Knochenstoffwechsel histologisch und biochemisch in Abhängigkeit von Ernährung und ApoE untersucht werden soll. Über die systemische Analyse des Glukosestoffwechsels soll eine Aussage gewonnen werden, ob die Beobachtungen, die auf zellulärer Ebene in den Organen gesammelt wurden, eine Korrelation mit der Funktion von ApoE liefern und ob die Entstehung der Insulinresistenz mit der Funktion von ApoE erklärt werden kann.

2. Material und Methoden

Dieses Kapitel stellt die im Rahmen der Promotion benutzten Materialien und Techniken zusammen. Bei Materialien wird bei der Erstnennung der Hersteller mit Standort genannt, im Folgenden dann nur noch der Firmenname. Bei gewöhnlichen Chemikalien wird darauf ganz verzichtet. Die verwendete Mauslinie war bei Beginn der Promotion schon im Labor etabliert. Daher wird hier deren Darstellung und Erstbeschreibung zitiert.

2.1.: Biochemische Reagenzien

Alle biochemischen Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich (USA) bezogen, insofern nicht anders angegeben.

2.2.: Mausmodelle und Diäten

Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Stadt Hamburg durchgeführt. Männliche C57BL/6J Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tiere (Zhang et al., 1992; Plump et al., 1992) wurden unter einem 12 h-Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Für die Fütterungsstudien wurden die Hochfettdiät Bio-Serv F3282, 35 % w/w Fett (HFD) und die Kontrolldiät Bio-Serv F4031, 7 % w/w Fett (KD) ad libidum für 16 Wochen beginnend im Alter von 4 Wochen.

2.3.: Plasma- und Urin-Analyse

Die Tiere wurden 4 h vor der Organentnahme gefastet. TAG und Cholesterol wurden im Plasma mit kommerziellen kits (Roche) bestimmt. Die Insulinkonzentration wurde mit einem kommerziellen *rat/mouse insulin assay kit* (Chrystal Chem) gemessen. Adiponektin und Leptin wurden mit ELISA von R&D Systems quantifiziert. Ein immunoradiometrischer Test (IRMA, Immutopics) wurde für die quantitative Bestimmung des Osteocalcin eingesetzt. Um den Grad der Osteocalcin-Carboxylierung zu bestimmen, wurde eine Hydroxyapatit-Methode eingesetzt (Niemeier et al., 2008). Der orale Glukosetoleranztest wurde durchgeführt in dem 1,5 g/kg Glukose in 200 µL H₂O per Gavage nach einer vierstündigen Nahrungskarenz mit einer Fütterungsnadel verabreicht wurden. Blutglukose wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit AccuCheck Aviva-Teststreifen (Roche) gemessen. Der Insulin-Toleranztest wurde durchgeführt indem 1U/kg Insulin (Insuman Rapid, Aventis) intra-peritoneal injiziert und die Blutglukose wie oben beschrieben gemessen wurde.

2.4.: Computed tomography (CT)-basierte Körperkompositionsanalyse

Der Fettgehalt der Mäuse wurde radiographisch mit einem mobilen LaTheta μ CT-Scanner (Aloka Inc., Japan) anhand der Angaben des Herstellers bestimmt (Rotationsgeschwindigkeit: 4,5 s, Röntgenspulenspannung: 50kV bei einer Stärke von 1,0 mA). CT-Scans von narkotisierten Mäusen wurden im Alter von 19 Wochen durchgeführt. Dazu wurden 1 mm Intervalle aufgenommen, die Leber und die gesamte abdominale Bauchhöhle einschließen. Viszerales und subkutanes Fettvolumen [cm^3] wurde in den Intervallen zwischen den Wirbel L1 bis L6 bestimmt (n=4 Tiere pro Gruppe).

2.5.: Histologie und histomorphometrische Analysen

In Paraffin eingebettete Gewebeproben wurden geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Morphometrische Analysen des Fettgewebes wurden mit ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/) durchgeführt, wobei eine *threshold*-Methode verwendet wurde.

2.6.: Histomorphometrie und Histologie des Knochens

Nach der Präparation des Skeletts wurde es in 3,7 % PBS-gepuffertem Formaldehyd fixiert. Nach der Dehydrierung in Ethanol wurden die Unterschenkel (Tibiae) und Wirbelkörper (Vertebrae) in Methylmethacrylat eingebettet und 5 μm -Schnitte wurden in der Sagittalebene auf einem rotierenden Mikrotom (Cut 4060E; MicroTech) hergestellt. Die Schnitte wurden mit Toluidin-Blau oder mit von Kossa/van Gieson gefärbt. Quantitative Histomorphometrie wurde auf Toluidin-Blau-gefärbten proximalen Tibia- und lumbar Vertebra-Schnitten durchgeführt. Für vergleichende Histomorphometrie wurden Knochenvolumen [%], Trabekeldicke [μm], Trabekelanzahl [pro mm], Trabekelabstand [μm], Osteoblastenanzahl [pro mm], Osteoklastenanzahl [pro mm], Kortikale Dicke [%] und trabekuläre und kortikale Knochenbildungsrate [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{Jahr}$] anhand der Standards der *American Society for Bone and Mineral Research* (Parfitt et al., 1987) mit Hilfe des *Osteomeasure histomorphometry system* (Osteometrics) gemessen. Für die Messung der dynamischen histomorphometrischen Indizes wurde Kalcein nach der Doppelmarkierungsmethode injiziert (Amling et al., 1999). Für die Fluorochrommessungen wurden zwei 12 μm -Schnitte pro Tier in Fluoromount (Electron Microscopy Sciences) eingebettet und vermessen.

2.7.: Gesamtlipidbestimmung in Lebergewebe

50 mg gefrorenes Lebergewebe wurden in Lysis-Puffer (2 mM CaCl_2 , 80 mM NaCl, 1% TritonX-100, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) homogenisiert. TAG und Cholesterol wurden mit kommerziellen Kits (Roche) bestimmt. Die Proteinbestimmung wurde mit einer Lowry-Methode durchgeführt, die für fetthaltige Proben mit 0,1% SDS modifiziert war.

2.8.: RNA-Extraktion und quantitative *real-time* PCR

RNA von gefrorenen Leberproben wurde mit Hilfe von Trizol (Invitrogen), TissueLyser und RNeasy system (Qiagen) extrahiert. DNA-Verunreinigungen wurden auf der Säule durch DNase-Behandlung (RNase-Free DNase set; Qiagen) entfernt. 1 µg RNA wurde in 50 µL Reaktionsvolumen mit dem High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) umgeschrieben. Quantitative *real-time* PCR wurde wie beschrieben durchgeführt (Zitser et al., 2006). Für alle Gene wurden Assay-on-Demand primer/probe von Applied Biosystems verwendet. Unter Verwendung der Expression des Haushältergens TBP wurde die relative Expression mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) errechnet.

2.9.: Fettsäuren-Analytik

Fettsäuremethylester-Standards wurden von Restek, Cayman and Supelco bezogen. Gesamtlipide von Leber und Fettgewebe wurden nach der Methode von Folch (FOLCH et al., 1951) extrahiert. Dazu wurden 250 µl Butylhydroxytoluol (0,1 mol/l in Methanol) und 6 ml Chloroform/Methanol (2:1) zu 50 mg Gewebe hinzugefügt. Nach der Homogenisierung mit einem Ultraturrax wurden die Proben auf 50 °C für 30 min erhitzt und anschließend zentrifugiert (1800 g, 5 min). Die Lipidklassentrennung von Lebergewebe wurde nach der Methode von Hamilton und Comai (Hamilton und Comai, 1988) mit Silika-Säulen (Separtis) erreicht. Die aufgetrennten Lipidfraktionen wurden evaporiert und in Methanol/Toluol (4:1) gelöst. Fettsäuremethylester wurden nach der Methode von Lepage und Roy (Lepage und Roy, 1986) hergestellt, bis auf dass anstatt Benzol Toluol verwendet wurde. 100 µl des Gewebeextraktes, 2 ml Methanol/Toluol (4:1), 50 µl Heptadecansäure (200 µg/ml in Methanol/Toluol, 4:1) und 200 µl Acetylchlorid wurden für 1 h bei 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 ml 6%-iges Na₂CO₃ hinzugefügt. Nach dem Zentrifugieren (1800 g, 5 min.) wurden 150–200 µl der oberen Schicht in Messröhrchen überführt. Für Lebergewebe wurde eine Vorverdünnung hergestellt, indem 1.6 ml Toluol im Vorraus dem Na₂CO₃ beigemischt wurde. Gas-chromatographische Analytik wurde mit einem HP 5890 Gaschromatograph (Hewlett Packard) durchgeführt, der mit einem *flame ionization detector* (Stationary phase: DB-225 30 m 9 0.25 mm id., film thickness 0.25 µm; Agilent) ausgestattet war. Signalidentifikation und –quantifizierung wurde anhand des Standards ermöglicht.

2.10.: Isolation und Kultur von primären murinen Adipozyten

Es wurde die Methode von Rodbell (Rodbell, 1964) zur Grundlage genommen. Epididymale Fettdepots wurde von männlichen C57BL/6J Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tiere präpariert, in physiol. NaCl-Lösung (Braun) gewaschen und in der Collagenase-Lösung (siehe unten) mit kleiner Gewebeschere zerkleinert. Die Adipozyten und andere Zellen wurden durch Inkubation mit 1 mg/mL Collagenase II / (Biochrom AG) in DMEM

(Invitrogen) (10 mg Collagenase II/ g Fettgewebe) für 60 min im Wasserbad bei 37 °C unter leichtem Schütteln vereinzelt. Gewebereste wurden von Zellsuspension durch Filtration durch ein Polypropylen-Filter (100 µm, Nunc) abgetrennt. Durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min wurde die stromal-vaskuläre Fraktion nebst Erythrozyten pelletiert. Das Pellet wird in 10 mL Erythrozytenlysispuffer für 10 min inkubiert und abzentrifugiert (2x). Der dann weiße Neiderschlag wurde in 10 mL Standardmedium (Invitrogen) aufgenommen und in T75 (Nunc) ausgesetzt. Am nächsten wurden die Zellen passagiert und mit 250.000 Zellen/mL auf 24-Loch-Platten (Nunc) ausgesetzt (125.000/Loch, d-2). Die Differenzierung wurde am d0 durch Wechsel auf Induktionsmedium initiiert. Am d3 wurde auf Insulinmedium gewechselt, am d5 auf Standardmedium. Am d7 wurden die Zellen für das jeweilige Experiment verwendet (die Medien sind in Tab. 2 zur Übersicht näher beschrieben).

A

Komponente	Menge
DMEM high glucose (Invitrogen)	
FCS (Invitrogen)	+10% v/v Medium
PS (Invitrogen)	+1% v/v Medium
Insulin 10 mg/mL	2 µM
Dexamethason	0,1 µM
IBMX	450 µM
Rosiglitazon BRL49653 (Cayman)	1 µM

B

Medium	Insulin	Dexamethason	IBMX	Rosiglitazon
Induktion	+	+	+	+
Insulin	+	+	-	-
Standard	-	-	-	-

Tab. 2.: Zusätze und Differenzierungsmedien

In Tab. 2A sind die Komponenten, die für die Adipozyten-Differenzierung verwendet wurden zusammengefasst. 2B stellt eine Übersicht über die Supplementation für die entsprechenden Kulturmedien dar.

2.11.: Fettrotfärbung

Am d7 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT in 4%-Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min in Oil-Red-O-Lösung (1 mg/mL in 60%-Isopropanol) gefärbt und dreimal mit H₂O gewaschen. Nachdem die Ergebnisse bildlich festgehalten wurden, wurden die Zellen mit Isopropanol entfärbt und der extrahierte Farbstoff im Photometer bei 560 nm gegen Isopropanol als Referenzwert vermessen.

2.12.: Stimulation mit TNF α in vitro

Am d7 wurden die Zellen über Nacht in Hungermedium (DMEM Glutamax low glucose, Invitrogen; 0,1% Fettsäure-freies bovines Serumalbumin), das mit (bzw. ohne) 2 ng/mL mTNF α (Promega) supplementiert war inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen in Trizol (Invitrogen) aufgenommen.

2.13.: Lipoprotein-Isolierung

40 mL humanes Plasma eines gesunden Spenders wurden mit KBr auf eine Dichte von 1,21 g/mL eingestellt. Für einen Dichtegradienten wurden mit Stammlösungen A ($\rho = 1,33 - 1,34$ g/mL; KBr in 0.9 % w/w NaCl, 10 mM Tris/Cl, pH 8.6) und B ($\rho = 1,006$ g/mL; KBr in 0.9 % w/w NaCl, 10 mM Tris/Cl, pH 8.6) nach der Formel $X \text{ mL A } \rho(A) + Y \text{ mL B } \times \rho(B) = (X \text{ mL} + Y \text{ mL}) \times \text{„Dichte der Wahl“}$ Lösungen der Dichten $\rho = 1,019$ (Lösung C) und $\rho = 1,063$ g/mL (Lösung D) hergestellt. Für die Gradientenherstellung wurden UZ-Röhrchen (ca. 11,5 mL Polyallomer Beckman für SW 41 Rotor, Beckmann) zunächst mit 1 mL B beladen. Dann wurde mit 2 mL C, 2 mL D und zuletzt mit 6 mL humanem Plasma $\rho = 1,21$ mit langer Kanüle unterschichtet. Anschließend wurden die Proben für 20 h bei 4°C und 38.000 rpm im SW 41 Rotor, Beckman UZ zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation sah der Gradient wie folgt aus: Die weißliche, trüb-gelbe Bande der VLDL befand sich oben im Gradienten. Darunter lag eine stark dunkelgelb-orange LDL-Bande. Danach war eine schwach gelbe, relativ breite HDL-Bande sichtbar. Die VLDL und LDL wurden sequentiell von oben nach unten mit einer umgebogenen Kanüle abgenommen. Die erhaltenen Lösungen wurden in PD10-Säulen (Amersham) gemäß den Angaben des Herstellers in PBS umgepuffert.

2.14.: ApoE-Überexpression

Die Zellkultur-Überstände von ApoE-überexprimierenden Zellen waren eine Gabe von Dr. D. Lasrich. Kurz gesagt wurde, um ApoE konstitutiv in hoher Konzentration zu erhalten, cDNA, die für humanes ApoE kodiert in den pLEGO (Weber et al., 2010) kloniert und in einem Lenti-viralen Vektor verpackt. Mit diesem wurde die humane mesenchymale

Stammzelllinie hMSC-TERT (Simonsen et al., 2002; Prawitt et al., 2008) infiziert und anschließend die ApoE-Expression charakterisiert. Dieses neue Zellsystem liefert in hohen Konzentrationen ApoE-reiche Überstände. Diese wurden auf 5 µg/mL ApoE mit Hilfe eines ApoE-ELISA (Genentech) durch Zugabe von frischem DMEM eingestellt und für die Inkubation/Differenzierung der primären Adipozyten verwendet.

2.15.: Aktivierung des BAT durch Kälteexposition

Das braune Fettgewebe wurde durch Kälteexposition aktiviert. Dafür wurden die Tiere für 24 h in einem Kühlraum bei 4°C gehalten bzw. die Kontrolltiere bei Raumtemperatur. In den letzten 4 h wurden die Tiere zusätzlich gefastet.

2.16.: Herstellung von ApoE-freien TRL

ApoE-defiziente Tiere wurden mit 370 KBq [9,10-³H(N)]-triolein pro Maus gavagiert und das Blut nach 2 h entnommen. Das Plasma wurde einem Ultrazentrifugationsschritt (siehe 2.13) unterzogen und die TRL-Fraktion über eine PD10-Säule (Amersham) in PBS umgepuffert.

2.17.: Organverteilung von radioaktiv-markierten TRL

200 µL der ApoE-freien wurden in die Schwanzvene von BAT-aktivierten Wild-Typ- und *ApoE*^{-/-}-Tieren injiziert und nach 15 min das Blut und die Organe unter Narkose entnommen. Die Organe wurden 1:10 in Solvable (PerkinElmer) für 1 h bei 60°C gelöst und die Radioaktivität 1:5 in UltimaGold (PerkinElmer) Szintillationsflüssigkeit bestimmt.

2.18.: Histologie

Tiefgefrorene Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet, einer Alkoholreihe unterzogen, getrocknet, mit einem Mikrotom geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.19.: Statistik

Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's T-Test* überprüft. Bei $P < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

3. Ergebnisse

Dieses Kapitel stellt die im Rahmen der Promotion erzielten Ergebnisse dar. Dabei werden zunächst die Ergebnisse der Adipositas-Fütterungsstudie im Tiermodell dargelegt. Im ApoE-defizienten Mausmodell und Wild-Typ-Kontrolltieren wurde durch Füttern einer fettreichen Nahrung eine Adipositas ausgelöst. Die Auswirkungen dieser Adipositas in Anhängigkeit von ApoE werden organspezifisch für Leber, Knochen und Fettgewebe. Schwerpunktmäßig wurde die Funktion des ApoE im Fettgewebe untersucht. Zu diesem Zweck wurden primäre murine Adipozyten, die von Wild-Typ- und *ApoE*^{-/-}-Tieren isoliert wurden, charakterisiert. Hierbei wird Bezug auf Adipogenese, zelluläre Markermoleküle und chronische Entzündung genommen.

3.1.: Diät-induzierte Adipositas in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren

Die Fütterung der Tiere begann nach dem Abstillen durch die Muttertiere im Alter von 4 Wochen. Die Hochfett-diät (HFD) enthält 35 % w/w TAG (Kontrolldiät, KD 5 % w/w) und ist daher geeignet, primär Fettleibigkeit zu erzeugen, die sich in der Zunahme an weißem Fettgewebe manifestiert. Dieses Futter unterscheidet sich grundsätzlich von Futtermitteln, denen Cholat und Cholesteroll beigemischt sind, um Atherosklerose auszulösen. Um auszuschließen, dass sich HFD und KD in ihrer Komposition unterscheiden, wurde in dieser Studie ein besonderes Futter verwendet, dass ein definiertes Fettsäureprofil zeigt. HFD und KD unterscheiden sich demnach nicht in Komposition, sondern nur in der Menge bestimmter Fettsäuren in den TAG. In der folgenden Abbildung 3.1 ist der Gewichtsverlauf nach Beginn der Fütterung in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren gezeigt.

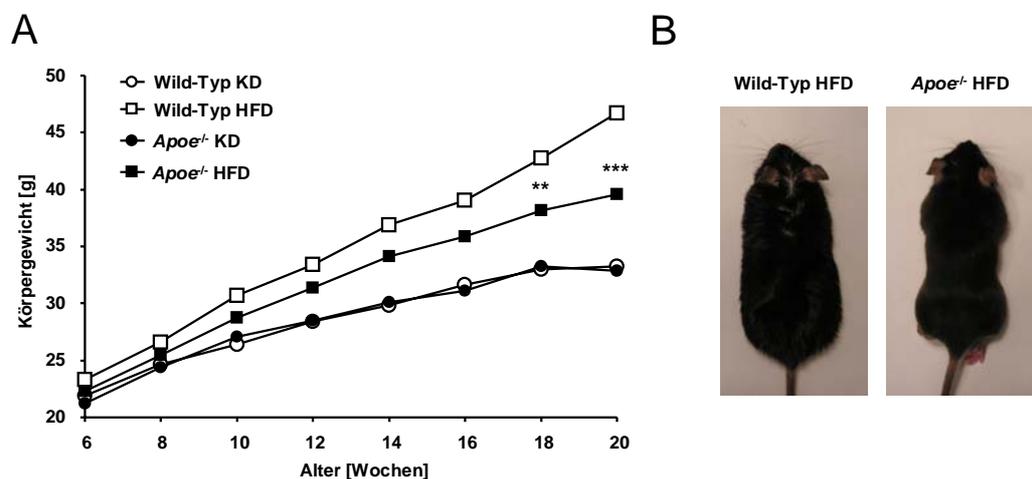


Abb. 3.1.: Gewichte der Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tiere im Verlauf der Fütterungsstudie

A: Während Tiere auf der Kontrolldiät nach 18 Wochen ihr endgültiges Körpergewicht erreicht haben, nehmen die Tiere auf HFD weiterhin zu. Dabei zeigen die *ApoE*^{-/-}-Tiere eine deutlich verminderte Gewichtszunahme ($n=14$; $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***). **B:** Dieser Gewichtsunterschied zwischen Wild-Typ- und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD ist auch makroskopisch zu erkennen.

Wie erwartet nehmen die Wild-Typ-Tiere rasch an Gewicht zu (Abb. 3.1A), wobei die Tiere auf KD mit 18 Wochen ausgewachsen sind (Gewicht im Alter von 20 Wochen: ca. 32 g). Auf HFD jedoch sind die Tiere deutlich schwerer und zeigen keine Begrenzung in der Zunahme des Körpergewichts während der Fütterungsperiode (Gewicht im Alter von 20 Wochen: ca. 46 g). In ApoE-defizienten Mäusen, denen dasjenige Gen, das für ApoE kodiert, fehlt, ist auf KD kein Unterschied im Körpergewicht im Vergleich zum Wild-Typ. Betrachtet man jedoch den Verlauf auf HFD, so liegt die Gewichtskurve deutlich unter

derjenigen des Wild-Typs, mit einem Gewicht im Alter von 20 Wochen, das bei ca. 39 g liegt. Dieser Unterschied lässt sich auch makroskopisch am Aussehen der Mäuse erkennen (Abb. 3.1B).

Dass tatsächlich eine Adipositas, d.h. eine Fettleibigkeit vorliegt, konnte nicht-invasiv mittels in vivo μ CT festgestellt werden. In Abb. 3.2 sind repräsentative Aufnahmen aus der μ CT-Messung dargestellt. Je dichter ein Gewebe desto heller ist der Kontrast im Bild (Knochenwirbel erscheinen weiß, Fett ist relativ dunkel). Es ist zu erkennen, dass die HFD im Wild-Typ sowohl eine drastische Zunahme an viszeralem als auch an subkutanem Fett induziert (siehe Abb. 3.2A). Nimmt man die Bauchdecke als Begrenzung so kann diese Zunahme durch die Farbgebung in Abb. 3.2B sichtbar gemacht und Bestimmung der Fläche zur Quantifizierung genutzt werden (Abb. 3.3). Die Akkumulation von weißem Fettgewebe ist in den *ApoE*^{-/-}-Tieren vermindert.

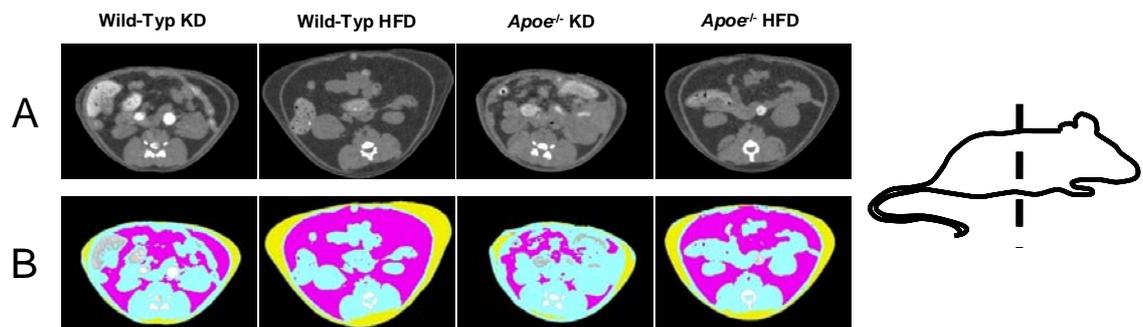


Abb. 3.2.: Bestimmung der Körperkomposition in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tiere nach HFD/KD-Fütterung mittels in vivo μ CT

A: Nach 19 Wochen wurden die Tiere unter Narkose einer in vivo μ CT-Messung unterzogen.
B: Anhand der Bauchdecke kann innerhalb (abdominal-viszeral, pink dargestellt) und außerhalb (subkutan, gelb dargestellt) liegendes Fettgewebe unterschieden werden.

Im Alter von 20 Wochen wurden die Tiere sakrifiziert und die Organe zur Gewichtsbestimmung und für weitere Analysen entnommen (Abb. 3.3). Das Gewicht der Leber, eines der wichtigsten Organe im Energiestoffwechsel, ist weder durch den Genotyp der Tiere noch durch deren Fütterung deutlich beeinflusst. Anders verhält sich dagegen die Masse an epididymalen und subkutanen Fettgewebe, die die Ergebnisse der μ CT-Messung bestätigt – ApoE-defiziente Tiere zeigen eine stark abgeschwächte Adipositas.

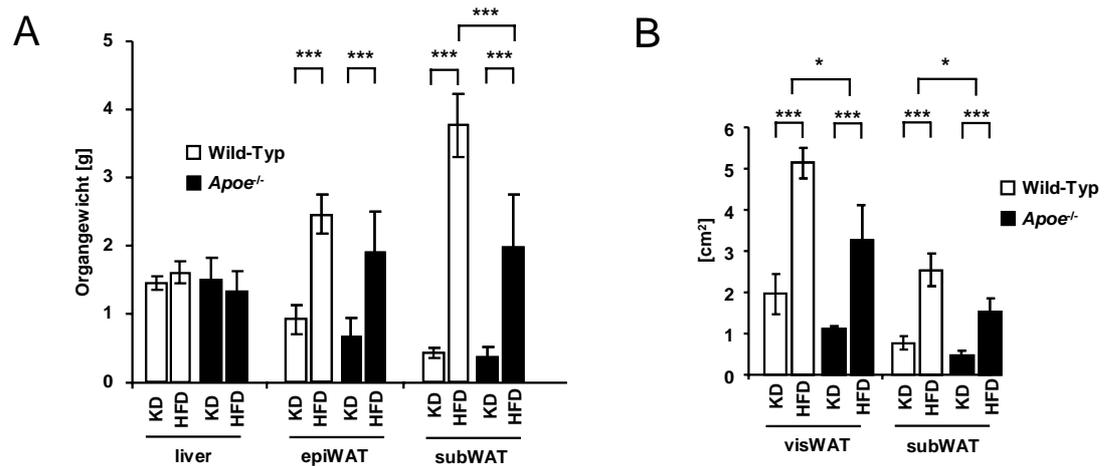


Abb. 3.3.: Leber- und Fettmasse in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung – Vergleich zur Quantifizierung mittels μ CT

A: Nach 20 Wochen wurden die Organe entnommen. Während das Gewicht der Leber nicht durch die HFD verändert ist, nehmen die Fettgewebe massiv an Gewicht zu. Dabei nehmen *ApoE*^{-/-}-Tiere deutlich weniger zu (n=6; $P < 0,001$: ***). **B:** Im Vergleich dazu die Quantifizierung mittels μ CT: der Befund aus der μ CT-Messung lässt sich anhand der Organentnahme bestätigen und auf das viszerale Fettgewebe erweitern (n=4; $P < 0,05$: *, $P < 0,001$: ***).

3.2.: Analyse der Serumparameter und Insulinresistenz in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Die enorme Ansammlung von Fettgewebe ist mit einer Änderung der Spiegel einer Vielzahl von Lipoproteinen, Hormonen, Zytokinen und vor allem Glukose verbunden. In den HFD-gefütterten Wild-Typ-Tieren verändern sich die Blutlipide in Richtung Hypercholesterolämie mit keiner Änderung in den TAG-Spiegeln (Tab. 3).

	Wild-Typ		ApoE ^{-/-}	
	KD	HFD	KD	HFD
Cholesterol [mg/dl]	141 ± 25	188 ± 19 ^{***}	444 ± 75 ^{###}	376 ± 95 ^{###}
TAG [mg/dl]	54 ± 11	55 ± 15	104 ± 43 ^{###}	83 ± 24 ^{##}
Glucose [mg/dl]	137 ± 26	179 ± 25 ^{***}	114 ± 31 [#]	153 ± 29 ^{***#}
Insulin [mU]	0.6 ± 0.3	3.7 ± 1.9 ^{***}	0.8 ± 0.6	2.1 ± 1.1 ^{***#}
Leptin [ng/ml]	6.1 ± 6.4	26.6 ± 9.9 ^{***}	3.1 ± 2.2	18.9 ± 8.9 ^{***#}
Adiponektin [µg/ml]	32.9 ± 5.8	34.6 ± 8.7	28.4 ± 5.0	33.8 ± 5.3

Tab. 3.: Serumparameter in Wild-Typ und ApoE^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurden die für den Energiestoffwechsel wichtigsten Serumparameter bestimmt. Die ApoE^{-/-}-Tiere zeichnen sich wie erwartet durch eine Hypercholesterolämie aus, wobei auch die Wild-Typ-Tiere erhöhte Cholesterolwerte nach HFD aufweisen. Die HFD-induzierte Hyperglykämie ist bei ApoE^{-/-}-Tieren weniger stark ausgeprägt, ebenso wie die Hyperinsulinämie und -leptinämie. Die Adiponektin-Level sind nicht signifikant verändert (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und ApoE^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***; KD Wild-Typ vs. ApoE^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. ApoE^{-/-} $P < 0,05$: #, $P < 0,01$: ##, $P < 0,001$: ###).

In den ApoE-defizienten Tieren liegt erwartungsgemäß auf KD schon eine Hypercholesterolämie vor, die sich nach HFD kaum verändert. Gleiches gilt für die TAG-Spiegel; es liegt also unabhängig von der Diät eine kombinierte Hyperlipidämie durch Akkumulation von ApoE-freien Lipoproteinpartikeln vor. Im Menschen sind mit der Adipositas oft Erhöhung von Glukose (Hyperglykämie), Insulin (Hyperinsulinämie), Leptin und eine Erniedrigung von Adiponektin verbunden. Diese Veränderungen sind auch im Wild-Typ auf HFD zu beobachten: Glukose, Insulin und Leptin sind stark erhöht. Nur Adiponektin liegt noch im Bereich der Tiere auf KD. In allen Belangen zeigen die ApoE^{-/-}-Tiere eine abgeschwächte Erhöhung von Glukose, Insulin und Leptin – Adiponektin ist sogar leicht erhöht.

Ein weiteres Hauptmerkmal der Adipositas ist die Insulinresistenz, d.h. eine verminderte Signalwirkung des Insulins. Dies hat zur Folge, dass Glukose nach der Aufnahme länger im Blut verbleibt. Um zu testen, wie sich die vier Gruppen in Bezug auf Glukoseaufnahme verhalten, wurde im Alter von 19 Wochen ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt, ein Verfahren, dass auch beim Menschen ein standardisiertes Maß zur Bestimmung der Glukosetoleranz ist (Abb 3.4).

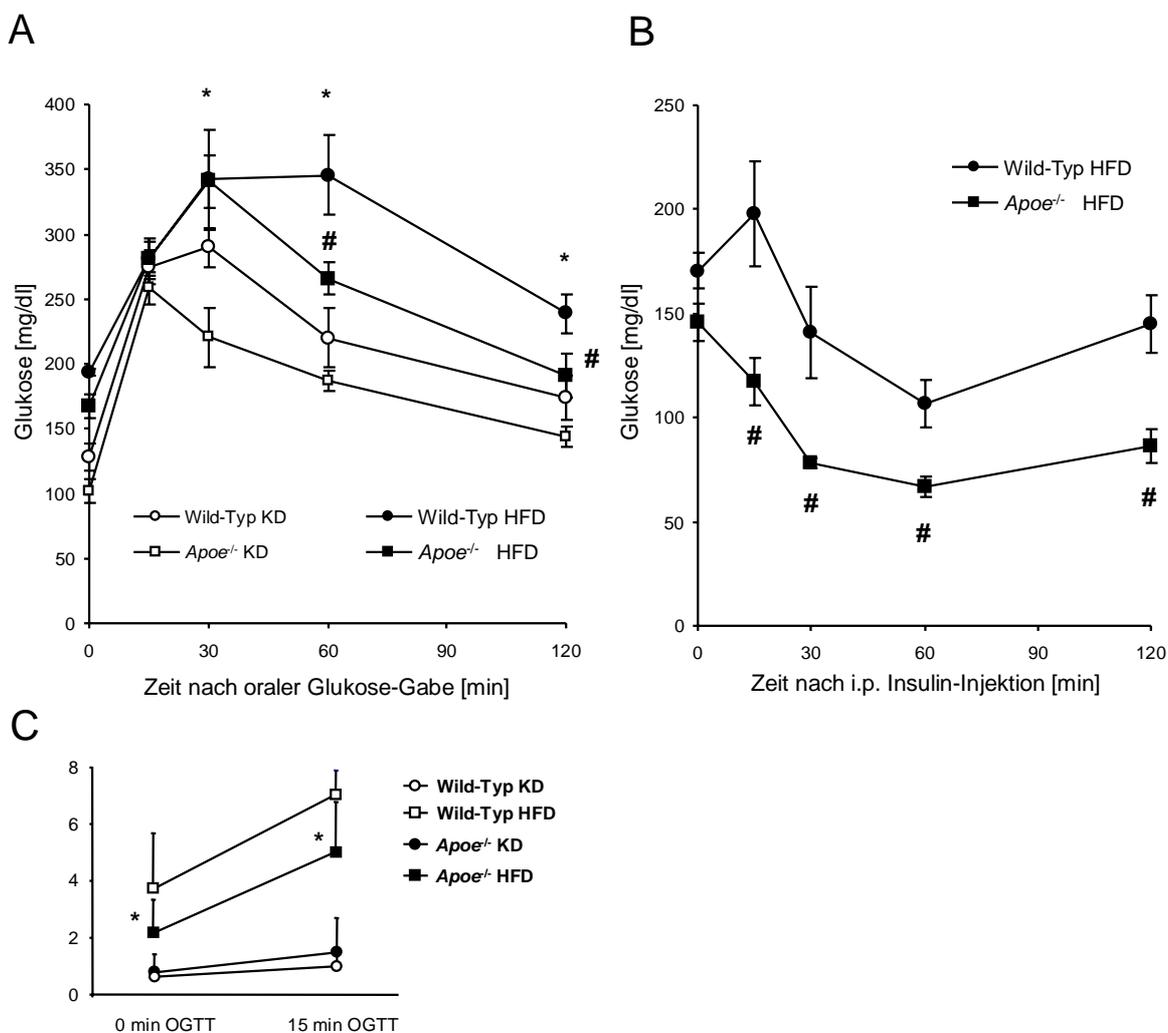


Abb. 3.4.: Oraler Glukose- und Insulintoleranztest in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

A: Nach 20 Wochen wurde den Tieren oral 1,5 mg/kg Glukose verabreicht. Bei den HFD-gefütterten Tieren liegt eine Hyperglykämie vor, die jedoch bei *ApoE*^{-/-}-Tiere abgeschwächt ist. Im Verlauf des Tests klären die KD-gefütterten Tiere die Glukose wesentlich schneller als die HFD-Tiere; im Vergleich zu den Wild-Typ-Tieren sind die *ApoE*^{-/-}-Tiere durch eine beschleunigte Glukoseentfernung aus dem Blut gekennzeichnet. **B:** Nach Injektion von 1 U/kg Insulin sinkt die Blut-Glukose in den *ApoE*^{-/-}-Tiere Tieren deutlich schneller. **C:** Der Insulinanstieg ist in den *ApoE*^{-/-}-Tiere auf HFD erniedrigt. (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und *ApoE*^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,05$; *, KD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} $P < 0,05$; #)

Nach der oralen Gabe steigt die Glukose im Blut in allen Gruppen an (Abb. 3.4A). Die Aufnahme in die Gewebe ist jedoch stark unterschiedlich zwischen KD und HFD, derart, dass die KD-gefütterten Tiere die maximale Konzentration nach 15 min, die HFD-gefütterten Tiere nach 30 min zeigen, d.h. die Aufnahme der Glukose ist verzögert. Auch das Maximum, das im Blut gemessen werden kann, ist stark unterschiedlich (KD: ca. 275 mg/dL vs. HFD: ca. 345 mg/dL). Die *ApoE*^{-/-}-Tiere zeigen auf beiden Diäten eine höhere Insulinsensitivität, die Glukose wird schneller aufgenommen als im Wild-Typ.

Die verlangsamte Aufnahme der Glukose kann zum einen durch eine abgeschwächte Insulinwirkung aber auch durch eine verringerte Ausschüttung des Insulins verursacht werden. Um ersteres zu testen, wurden den HFD-gefütterten Tieren im Alter von 19 Wochen Insulin intraperitoneal injiziert und die Abnahme der Glukose-Konzentration verfolgt (Abb. 3.4B). Die Glukose wird in den *ApoE*^{-/-}-Tiere schneller aufgenommen; sie haben eine höhere systemische Insulinsensitivität. Um diesen Befund zu bestätigen, wurde die Erhöhung der Insulinkonzentration nach Glukose-Gabe gemessen. Die Messung spiegelt die Ergebnisse aus Glukose- und Insulintoleranztest wieder (Abb. 3.4C).

Die oben genannten Teilergebnisse dieser Studie wurden kürzlich publiziert (Bartelt et al., 2010).

3.3.: Auswirkung der HFD auf den Lipidstoffwechsel der Leber in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren

Die Leber ist die zentrale Plattform für den systemischen Transport von exo- und endogenen Lipiden aus Nahrung und Fettgewebe. Lipide gelangen als freie Fettsäuren vom Fettgewebe zur Leber und von dort als TAG in Lipoproteinen wieder in die Peripherie. Eine weitere pathophysiologische Komplikation der Adipositas ist die (alkoholunabhängige) Verfettung der Leber (Steatose oder *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFL), die im schweren Fall auch mit einer chronischen Entzündung verbunden sein kann (Steatohepatitis, *non-alcoholic steatohepatitis*, NASH). Um zu erfassen, wie sich die HFD auf den Lipidstoffwechsel der Leber auswirkt, wurde zunächst die makroskopische und biochemische Lipidakkumulation analysiert (Abb. 3.5).

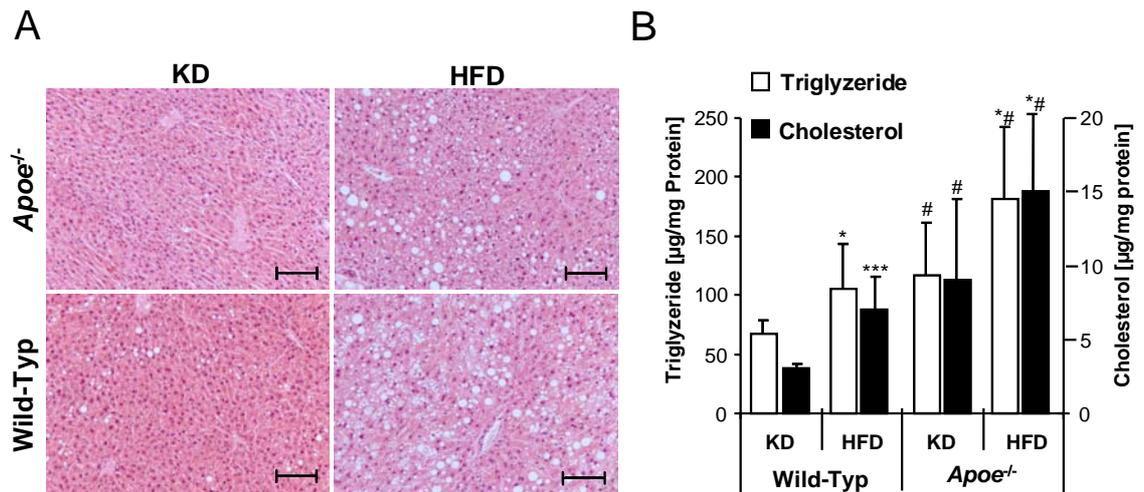


Abb. 3.5.: Lipidakkumulation in der Leber von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

A: Nach 20 Wochen wurden die Leber entfernt und in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Histologie analysiert. Schon basal zeigen die *ApoE*^{-/-}-Tiere eine höhere Lipidakkumulation, zu erkennen an den feinen kreisrunden Einlagerungen, welche sich nach HFD erweitern. **B:** Die makroskopische Analyse lässt sich auch durch biochemische Quantifizierung bestätigen. Sowohl Leber-TAG als auch -cholesterol sind bei beiden Diäten in den *ApoE*^{-/-}-Tieren höher (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und *ApoE*^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,05$; *, $P < 0,001$: ***; KD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} $P < 0,05$; #, Balken 100 µm).

In der Histologie ist deutlich zu erkennen, dass die HFD-Fütterung sowohl in Wild-Typ- als auch in ApoE-defizienten Tieren eine Ansammlung von Lipiden verursacht (Abb. 3.5A). Auffällig ist weiterhin, dass die ApoE-defizienten Tiere auch auf KD schon eine erhöhte Lipidkonzentration im Lebergewebe haben. Durch Quantifizierung mittels biochemischer Methoden (Abb. 3.5B), lässt sich die HFD mit vermehrter Akkumulation von sowohl TAG als auch Cholesterol assoziieren. Die ApoE-defizienten Tiere weisen schon auf KD TAG- und Cholesterolspiegel auf, wie der Wild-Typ auf HFD. Es lässt sich zusammenfassen, dass in den *ApoE*^{-/-}-Tiere eine Steatose vorliegt – sowohl auf KD als auch auf HFD.

3.4.: Entzündungsreaktion in der Leber von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Ansammlungen von Lipiden außerhalb des Fettgewebes (ektopye Fettablagerungen) stellen unphysiologische Prozesse dar, auf die der Körper wie auf etwas Fremdes reagiert. Folgerichtig werden durch ektopye Lipidakkumulation Zellen des Immunsystems (ins Besondere Makrophagen, aber auch einige Klassen der T-Lymphozyten) angezogen und aktiviert. Zum einen produzieren Kupfferzellen in der Leber, die sich dort unabhängig vom Entzündungsgrad befinden, pro-inflammatorische Zytokine (TNF α , IL-6), zum anderen

locken auch Hepatozyten nach exzessiver Lipidbelastung durch MCP-1 weitere Monozyten aus der Blutbahn an, die im Verlauf zu Makrophagen (CD68⁺/Emr1⁺) reifen. Diese Prozesse lassen sich phänomenologisch anhand von Markermolekülen, die von beteiligten Zellen exprimiert werden, detektieren. Zu diesem Zweck wurde von Lebergewebe im Alter von 20 Wochen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels der Taqman-Technologie auf die Expression relevanter Gene hin untersucht (Abb. 3.6).

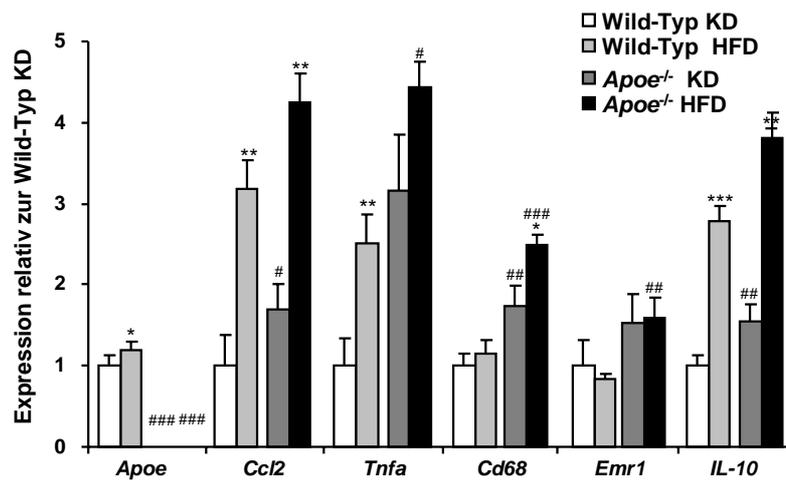


Abb. 3.6.: Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern in der Leber von Wild-Typ und Apoe^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde die Leber entfernt, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Taqman-Analyse wurde die Expression der unten genannten bestimmt. Es ist deutlich, dass Lipidgehalt mit erhöhter Expression von sowohl pro-inflammatorischen (*Ccl2*, *Tnfa*) als auch dem anti-inflammatorischen Gen *Il-10* korreliert: Die Entzündungsmarker sind im Apoe^{-/-}-Hintergrund auf beiden Diäten erhöht. Auffällig ist jedoch, dass durch die HFD im Wild-Typ keine erhöhte Expression *Cd68* und *Emr1* zu detektieren ist (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und Apoe^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,05$; *, $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***; KD Wild-Typ vs. Apoe^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. Apoe^{-/-} $P < 0,05$: #, $P < 0,01$: ##, $P < 0,001$: ###).

Neben der Bestätigung, dass in Apoe^{-/-}-Tieren keinerlei Apoe-Expression zu detektieren ist, korreliert Lipidbelastung mit der Expression von *Tnfa*, *Cd68* und *Emr1*, d.h. auch schon auf KD ist in den Apoe^{-/-}-Tieren eine Entzündungsreaktion in der Leber festzustellen (jedoch stärker wie bei den Wild-Typ-Tieren auf HFD), die durch die HFD noch verstärkt wird. Anders verhält es sich mit *Ccl2* und *Cxcl10*, die nur durch die HFD in beiden Genotypen induziert werden. Das Muster der hepatischen Entzündung spiegelt nicht die Lipidkonzentrationen wieder, d.h. Steatose korreliert nicht zwangsläufig mit pro-inflammatorischen Zellen und/oder Zytokinen und darüber hinaus auch nicht mit Apoe-Expression.

3.5.: Fettsäureanalytik der Gesamt- und Phospholipiden in Lebergewebe von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

In der Leber korreliert der Lipidgehalt nicht zwangsläufig mit der Entzündungsantwort. Da nicht nur die Gesamtheit der Lipide wichtig für Insulinsensitivität und Entzündungsprozesse ist, sondern auch die Fettsäurezusammensetzung, wurden aus Gesamtlipiden (Abb. 3.7) und Phospholipiden (Abb. 3.8) nach Lipidklassentrennung die Fettsäurekomposition mittels Gas-Chromatographie bestimmt. In der Darstellung der Ergebnisse werden folgende Schwerpunkte gesetzt: die Produkte der $\Delta 9$ -Desaturase, der n-6 und der n-3 Weg der Fettsäurebiosynthese. Darüber hinaus wird diejenige Darstellung gewählt, die Unterschiede für beide Genotypen im Vergleich zur jeweiligen KD verdeutlicht.

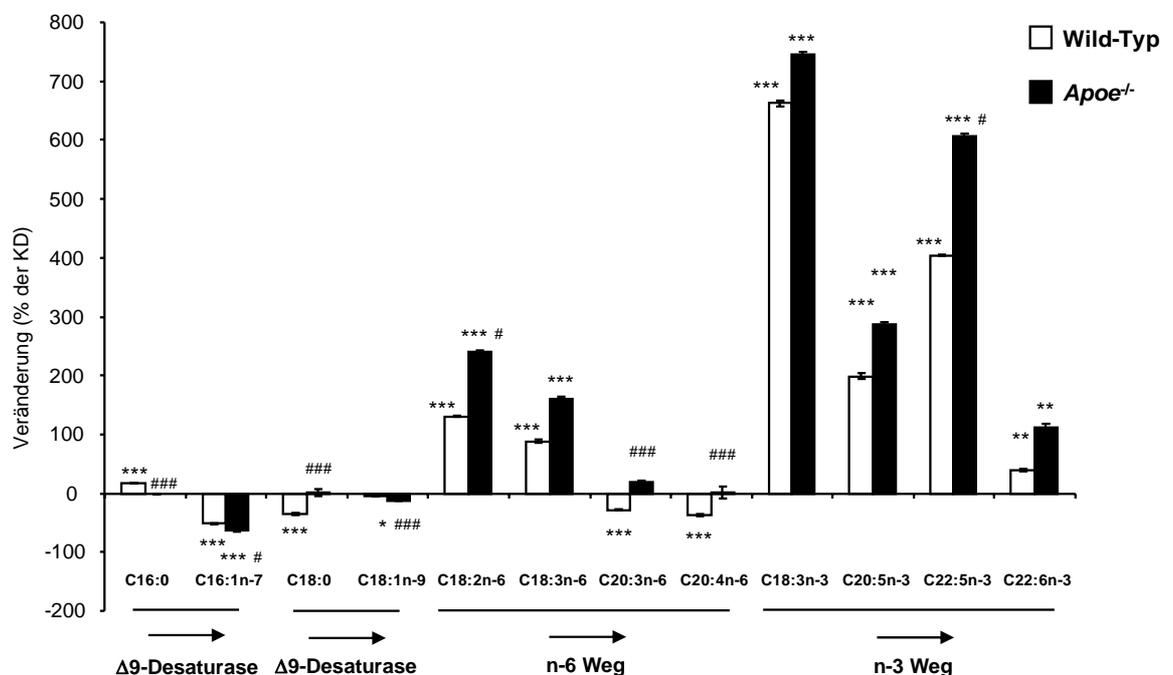


Abb. 3.7.: Veränderung des Fettsäure-Profiles der Gesamtlipide in der Leber von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde die Leber entfernt und die Fettsäurezusammensetzung mittels GC bestimmt. Die Fettsäuren sind als Veränderung zur entsprechenden KD dargestellt. Auffällig sind die Anstiege in C18:2n-6 und C18:3n-6. Darüber hinaus scheint der n-6 Weg in Abhängigkeit von ApoE reguliert zu sein, der n-3 Weg hingegen scheint nur leicht durch ApoE-Abwesenheit modifiziert zu sein. Interessanterweise ist C16:1n-7 durch die HFD erniedrigt, in *ApoE*^{-/-}-Tieren ist diese Abnahme ausgeprägter. (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und *ApoE*^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,01$; **, $P < 0,001$: ***; KD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} $P < 0,05$; #, $P < 0,001$: ###).

Die Produkte der $\Delta 9$ -Desaturase, bei denen eine Doppelbindung eingefügt wurde und zu denen auch C16:1n-7 gehört, sind bei beiden Genotypen in den Gesamtlipiden erniedrigt, stärker jedoch in den *Apoe*^{-/-}-Tieren (Abb. 3.7). Die Anteile von Linolensäure (C18:2n-6) und γ -Linolensäure (C18:3n-3), die in relativ hohen Mengen in dem in der Studie verwendeten Futter enthalten sind, nehmen erwartungsgemäß zu, sowie auch deren weitere Produkte der n-6 und der n-3 Wege bis auf wenige Ausnahmen: in Wild-Typ-Tieren nehmen C20:3n-6 (Dihomo- γ -linolensäure) und C20:4n-6 (Arachidonsäure), im Gegensatz zu *Apoe*^{-/-}-Tieren, wo beide erhöht sind, ab. Bezieht man diese Ergebnisse der Gesamtlipide auf die Zusammensetzung der Phospholipide (Abb. 3.8), so wird deutlich, dass die Gesamtlipide nicht direkt auf andere Lipidklassen zu übertragen sind – sowohl absolut als auch relativ, ins Besondere im Fall von C20:4n-6.

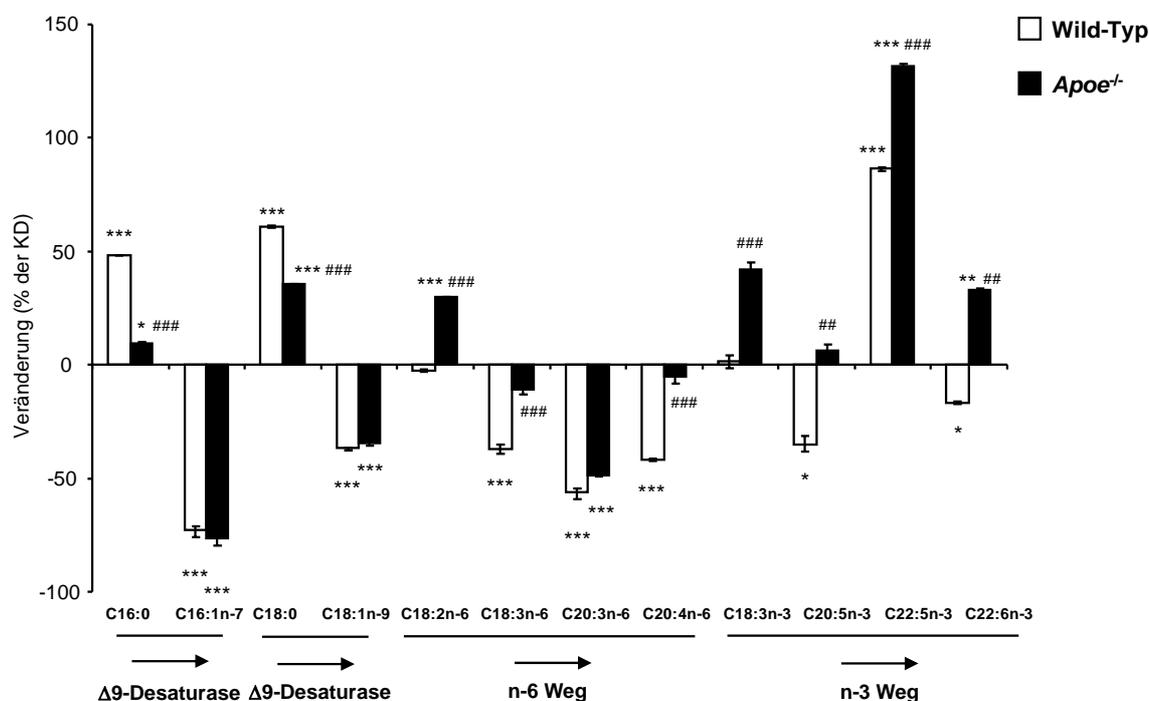


Abb. 3.8.: Veränderung des Fettsäure-Profiles der Phospholipide in der Leber von Wild-Typ und *Apoe*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde die Leber entfernt, die Phospholipide abgetrennt und die Fettsäurezusammensetzung mittels GC bestimmt. Die Fettsäuren sind als Veränderung zur entsprechenden KD dargestellt. Deutlich sind hier die Zunahme an C18:2n-6 und C18:3n-3 im *Apoe*^{-/-}-Hintergrund. Während der n-6 Weg eher abgeschaltet zu werden scheint – ins Besondere Arachidonsäure (C20:4n-6) – nimmt der Anteil der n-3-Fettsäuren in *Apoe*^{-/-}-Tieren eher zu – im Wild-Typ eher ab. (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und *Apoe*^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***; KD Wild-Typ vs. *Apoe*^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. *Apoe*^{-/-} $P < 0,05$: #, $P < 0,01$: ##, $P < 0,001$: ###).

Betrachtet man die Schwerpunkte ($\Delta 9$ -Desaturase-Weg: Produkte in beiden Genotypen gleichermaßen erniedrigt; n-6 Weg: sehr viel stärkere Ansammlung von C18:2n-6 bei herabgesetzten Spiegeln der entsprechenden Produkte; n-3 Weg: im *ApoE*^{-/-}-Hintergrund scheint der gesamte Weg zu akkumulieren), so deutet sich an, dass im Wild-Typ $\Delta 9$ -Desaturase-Produkte (Edukte relativ und absolut stark erhöht) stark verringert sind und somit der Anteil der n-3 und n-6 Wege abnehmen. Bei den *ApoE*^{-/-}-Tieren ist der $\Delta 9$ -Desaturase-Effekt relativ schwächer, C18:2n-6 und n-3 Weg dementsprechend erhöht im Anteil.

Zusammenfassend stellt sich die Situation im Lebergewebe von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren folgendermaßen dar: die Fütterung einer HFD führt sowohl in den Wild-Typ als auch in den *ApoE*^{-/-}-Tieren zur massiven Akkumulation von Cholesterolem und TAG. Diese ektope Fettablagerung ist mit einem deutlichen Anstieg in der Expression der maßgeblichen Entzündungsmarker verbunden, allerdings vorwiegend nur im Wild-Typ. Während das Fettsäureprofil in Gesamt- und Phospholipiden in den Wild-Typ-Tieren zeigt, dass anteilig die Produkte der n-3 und n-6 Wege abnehmen, ist diese Verschiebung in den *ApoE*^{-/-}-Tieren umgekehrt messbar.

Die Teilergebnisse dieser Studie die Leber betreffend wurden in einem Manuskript verwendet, das sich in Vorbereitung zur Publikation befindet (Bartelt et al., 2011).

Neben der Akkumulation von Lipiden in der Leber, ist die Zunahme an weißem Fettgewebe ein wesentlicher Parameter der Fettleibigkeit. Im Folgenden wird dieser Zusammenhang in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung näher beschrieben.

3.6.: Histologie des Fettgewebes von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Die exzessive Akkumulation von Fettgewebe bei Adipositas kann durch eine Zunahme in der Anzahl der Adipozyten (Hyperplasie) oder in ihrem Durchmesser, d.h. in ihrem zellulären Lipidgehalt (Hypertrophie) entstehen. Während hyperplastischem Fettgewebe ein protektiver Effekt auf das T2DM-Risiko zugeschrieben wird, ist Hypertrophie mit verstärkter Insulinresistenz assoziiert. Um die Morphologie der Fettgewebe zu untersuchen, wurden hier die weißen Fettdepots in der Histologie analysiert (Abb. 3.9).

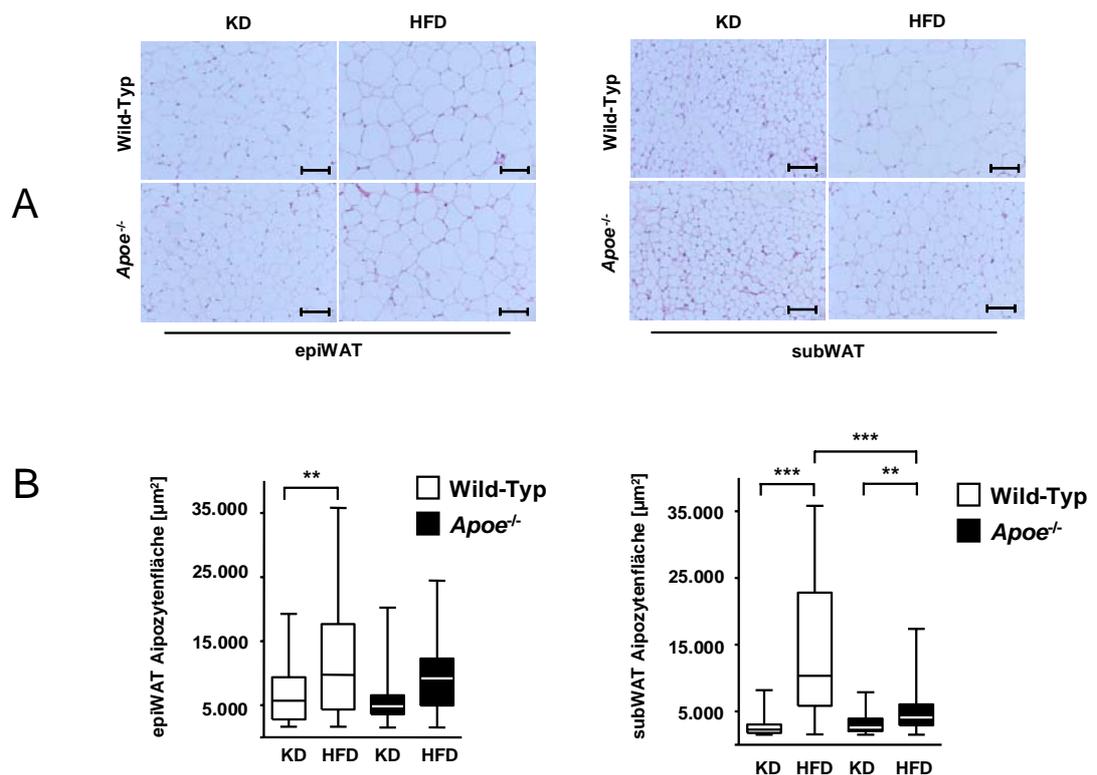


Abb. 3.9.: Histologische Bestimmung der Adipozytengröße im weißen Fettgewebe von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

A: Nach 20 Wochen wurde das Fettgewebe entfernt, in Paraffin eingebettet und die Gewebeschnitte mit HE gefärbt. Die HFD induziert eine deutliche Zunahme im Durchmesser der Adipozyten im Wild-Typ, im subkutanen weißen Fettgewebe (subWAT) stärker als im epididymalen (epiWAT). Die ApoE-defizienten Tiere zeigen eine deutlich geringere Lipidakkumulation. **B:** Dieser Unterschied lässt sich mit Hilfe von ImageJ mit einer *threshold*-Methode quantifizieren. (n=3; $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***)

Die hier verwendete HFD ist bei beiden Genotypen mit Hyperplasie verbunden, wobei sich die geringeren Organgewichte in den *ApoE*^{-/-}-Tieren auch in kleineren Adipozyten wieder spiegeln, ins Besondere in subkutanen Depots (Abb. 3.9A). Dieser Befund lässt sich mit Hilfe der ImageJ-Software quantifizieren und bestätigen (Abb. 3.9B).

3.7.: Entzündungsreaktion im weißen Fettgewebe von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Exzessive Ansammlung von Lipiden im Fettgewebe stellt einen unphysiologischen Prozess dar, auf den der Körper mit einer chronischen Entzündung antwortet. Hier wurde die Expression von Genen bestimmt, die an diesem Prozess beteiligt sind. (Abb. 3.10).

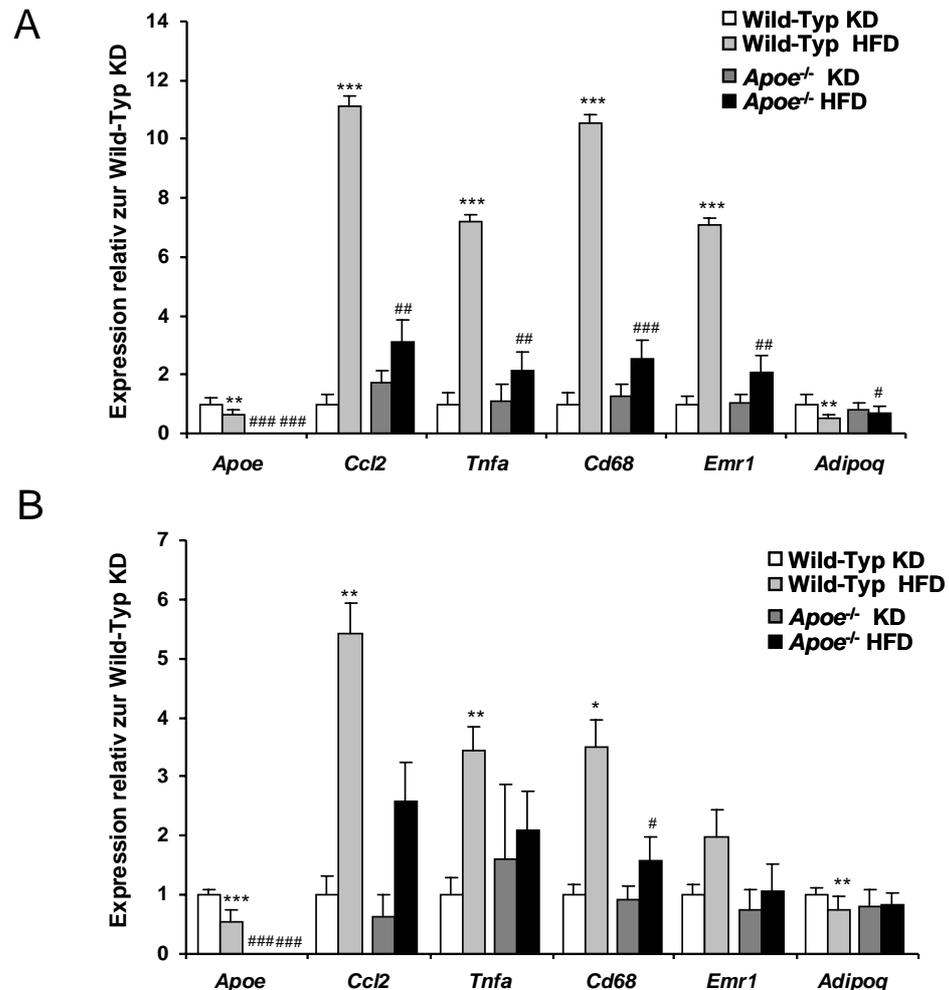


Abb. 3.10.: Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern im weißen Fettgewebe von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde die epididymalen (epiWAT, **A**) und subkutanen (subWAT, **B**) Fettdepots präpariert und mittels Taqman die Expression unten genannter Gene gemessen. Erhöhter Lipidgehalt korreliert mit erhöhter Expression von pro-inflammatorischen Genen (*Ccl2*, *Tnfa*, *Cd68*, *Emr1*), welche im *ApoE*^{-/-}-Hintergrund auf beiden Diäten stark erniedrigt sind. *Adipoq*, das Gen, das für Adiponektin kodiert, ist nur im Wild-Typ weniger transkribiert. (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und *ApoE*^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,05$; *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$; ***; KD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-} $P < 0,05$; #, $P < 0,01$; ##, $P < 0,001$; ###).

Neben der Bestätigung, dass in *ApoE*^{-/-}-Tieren auch im Fettgewebe keinerlei *ApoE*-Expression zu detektieren ist, korreliert Lipidbelastung durch HFD mit der Induktion der Gene *Ccl2*, *Tnfa*, *Cd68* und *Emr1* (Abb. 3.10). In den ApoE-defizienten Tieren ist die Antwort abgeschwächt, sowohl in subWAT (Abb. 3.10A) als auch in epiWAT (Abb. 3.10B). Die Induktion von pro-inflammatorischen Markern ist prinzipiell im epiWAT höher als im subWAT. Obwohl im Serum keine Unterschied in der Adiponektin-Konzentration festzustellen war, findet sich nach HFD zumindest eine erniedrigte Expression des *Adipoq*-Gens, jedoch im subWAT nicht bei ApoE-defizienten Tieren. Zusammengenommen ist ApoE-Defizienz mit stark abgeschwächter Entzündung im Fettgewebe assoziiert.

Zusammenfassend sind Adipozyten nach HFD/KD-Fütterung in den *ApoE*^{-/-}-Tieren kleiner als diejenigen in Wild-Typ-Tieren. Diese verringerte Hypertrophie korreliert mit verringerter Expression von Entzündungsmarkern im Fettgewebe.

Die Teilergebnisse dieser Studie das weiße Fettgewebe betreffend wurden kürzlich publiziert (Bartelt et al., 2010).

In dieser Arbeit sollte schwerpunktmäßig die Bedeutung des ApoE im weißen Fettgewebe analysiert werden. Um die Befunde, die in der Fütterungsstudie gewonnen wurden, weiter zu führen, wurden primäre Adipozytenvorläuferzellen aus dem weißen Fettgewebe von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren isoliert und in vitro in Adipozyten differenziert. Die Methode und vorgenommene Analysen werden im Folgenden vorgestellt.

3.8.: Präparation von primären Adipozyten

Weißes Fettgewebe, das aus Adipozyten, Kapillargefäßen, Makrophagen und den jeweiligen Vorläuferzellen besteht, kann relativ einfach durch Organentnahme gewonnen werden. In den folgenden Experimenten wurde epididymales Fettgewebe verwendet, da in diesen die größten metabolischen Unterschiede zu erwarten sind. Diskrete Fettdepots wurden entnommen, zerkleinert und mit Collagenase behandelt (Abb. 3.11).

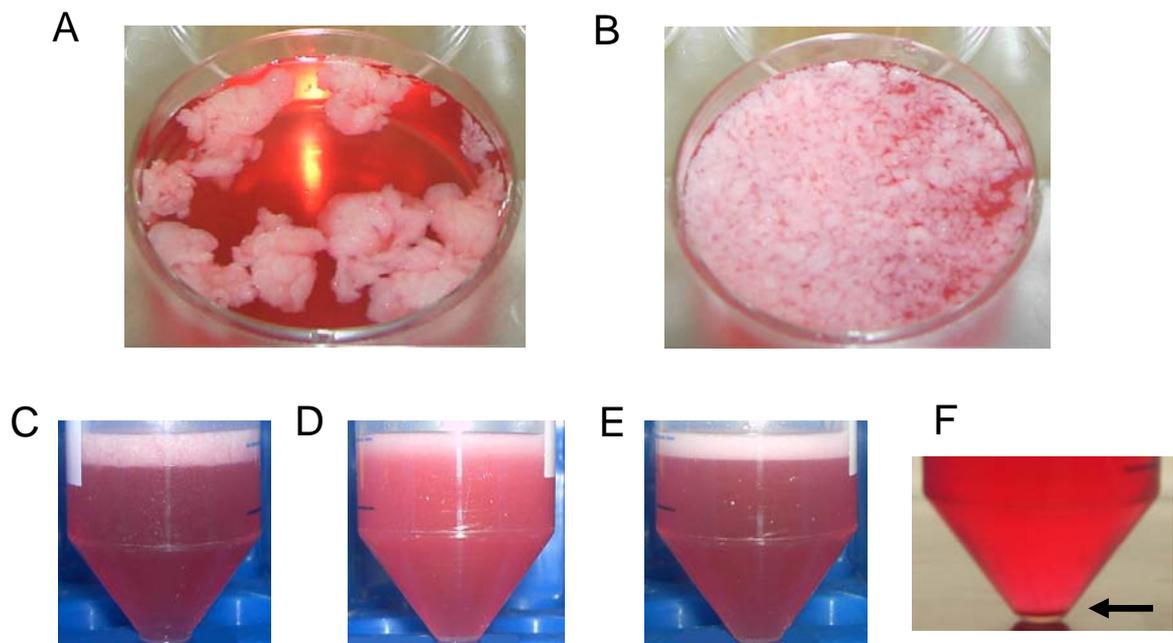


Abb. 3.11.: Präparation von primären Adipozyten

A: Isolierte Depots des weißen Fettgewebes werden fein zerkleinert (**B**) und für 30-60 min mit Collagenase II behandelt (**C**). **D:** Die Zellsuspension wird durch einen 100 µm-Filter filtriert, um größere Gewebestücke abzutrennen. Diese Zellsuspension kann als primäre Adipozyten verwendet oder durch Zentrifugation in Adipozyten und stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) getrennt werden, wobei die Qualität der reifen Adipozyten Schaden nimmt (**E**). Die als Niederschlag vorliegende SVF (Pfeil in **F**) kann nach Lyse der Erythrozyten direkt in Zellkulturflaschen in den entsprechenden Nährmedien propagiert werden.

Der noch recht grobe Zellkuchen flotiert und konnte durch mechanische Einwirkung und Filtration durch ein 100 µm-Netz von Gefäßen u.ä. abgetrennt werden. Es ergibt sich eine Suspension von vereinzelt Adipozyten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei höherer Zentrifugalkraft bildete sich eine flotierende Schicht aus fusionierten Adipozyten und ein roter Niederschlag, der Erythrozyten, Makrophagen und die Adipozyten-Vorläuferzellen enthält. Diese Zellen können in unbehandelten Zellkulturflaschen ausgesät werden und werden adherent. Einen Tag nach dem Aussetzen wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin abgelöst (wobei die Makrophagen entfernt werden) und in der

geeigneten Konzentration ausgesät. Durch eine Abfolge von bestimmten Medien, die die für die Differenzierung nötigen Substanzen enthalten, wird der Übergang von Vorläuferzellen zu Adipozyten erzwungen (Tab. 2 und Abb. 3.12).

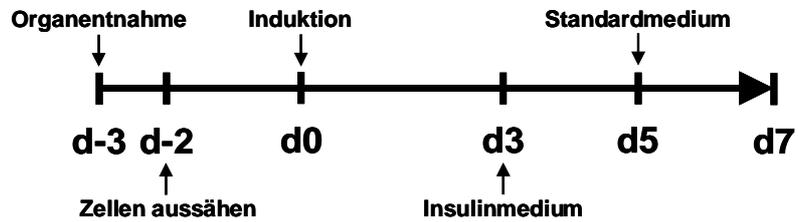


Abb. 3.12.: Differenzierungsschema für primären Adipozyten

Nach der Organentnahme (d-3), wurde die Zellen passagiert (d-2) und die Differenzierung am d0 induziert. Nach Medienwechseln am d3 und d5 wurden die Zellen am d7 für weitere Experimente verwendet.

3.9.: Charakterisierung von primären Wild-Typ und *Apoe*^{-/-}-Adipozyten

Nach sieben Tagen Differenzierung (d7) bilden sich in Wild-Typ-Zellen Lipidtropfen (*lipid droplets*), die charakteristisch für Adipozyten sind (Abb. 3.22). Diese *lipid droplets* können zum einen mit einem Farbstoff für Neutrallipide (Oil-Red-O, Fettrotfärbung) dargestellt werden (Abb. 3.13A), zum anderen kann man mit Hilfe des Programms ImageJ die Größe der *lipid droplets* quantifizieren (Abb. 3.13B). Der augenscheinliche Befund, dass am d7 in den *Apoe*^{-/-}-Zellen weniger *lipid droplets* zu sehen sind, lässt a) sich durch Analyse mit ImageJ bestätigen und b) nach Extraktion des Farbstoffes quantifizieren (Abb. 3.13C).

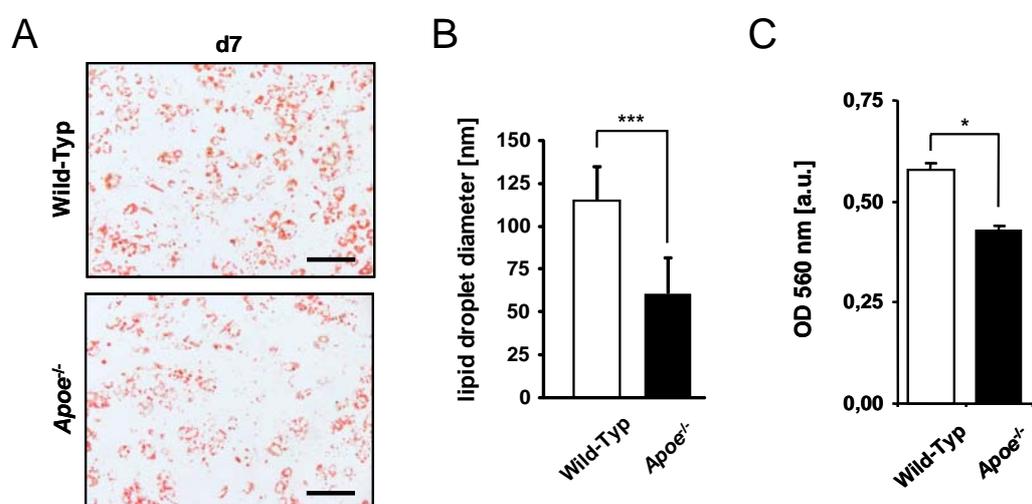


Abb. 3.13.: Lipidakkumulation nach Differenzierung von primären Wild-Typ- und *Apoe*^{-/-}-Adipozyten *in vitro*

A: In der Fettrotfärbung ist zu erkennen, dass die Differenzierung von *Apoe*^{-/-}-Adipozyten mit weniger Einlagerung von Lipiden einher geht. **B:** Mit Hilfe der ImageJ-Software kann die durchschnittliche Größe der Lipidtropfen errechnet werden, die bei *Apoe*^{-/-}-Adipozyten kleiner ist. **C:** Extrahiert man den Fettrotfarbstoff, so lässt sich die Gesamtlipideinlagerung messen, die bei *Apoe*^{-/-}-Adipozyten kleiner ist. (n=3; $P < 0,05$ *, $P < 0,001$: ***)

In der Adipozytendifferenzierung wird ein kompliziertes Programm induziert, das maßgeblich über den Transkriptionsfaktor PPAR γ gesteuert wird und die Expression von u. a. den Genen *Apoe*, *Fabp4*, *Adipoq* und *Slc2a4* mit sich bringt. Wie erwartet, steigert sich in den Wild-Typ-Zellen die Expression der genannten Gene von d0 zu d7 enorm, doch sind im Vergleich zu den Wild-Typ-Zellen in den *Apoe*^{-/-}-Zellen die mRNA-Spiegel deutlich erniedrigt (Abb. 3.14).

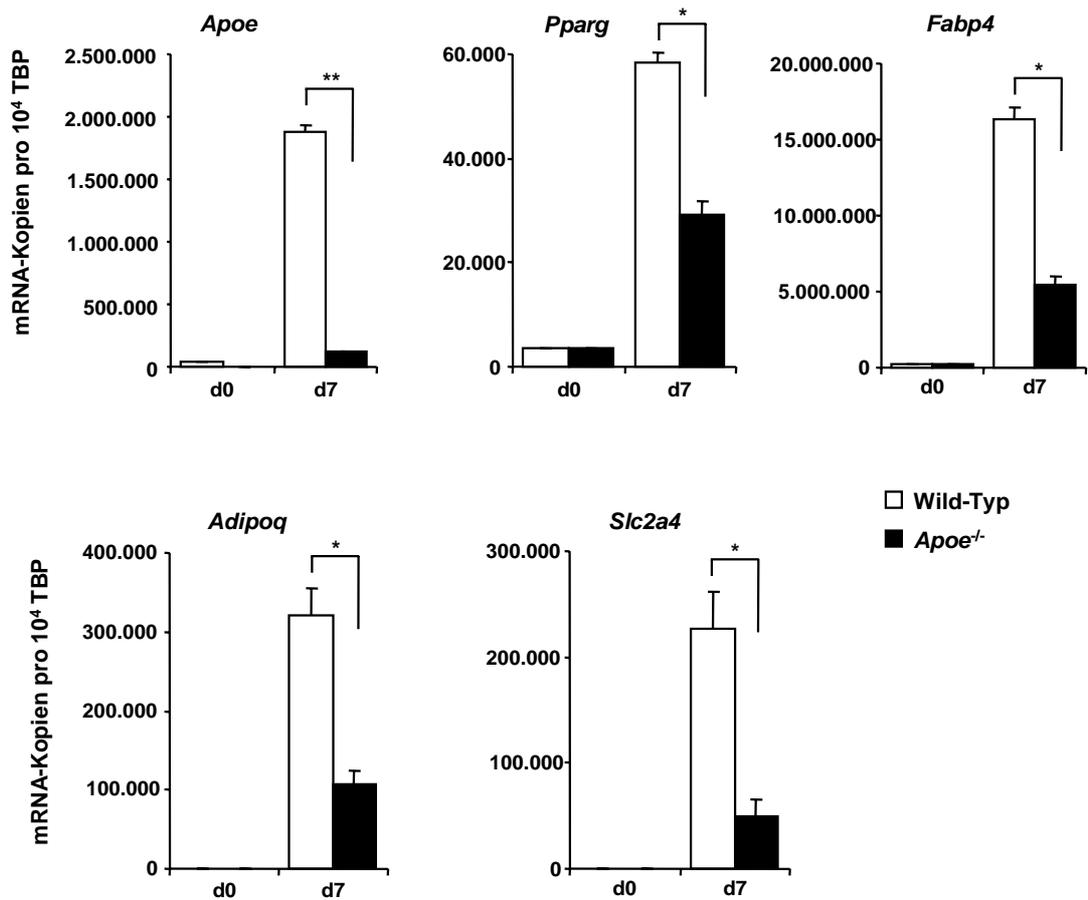


Abb. 3.14.: Expressionsprofil von Adipozytengenen in primären Wild-Typ und *Apoe*^{-/-} Adipozyten

Im Verlauf des Übergangs von Präadipozyt zu reifem Adipozyt wird eine Reihe von Genen induziert, darunter *Apoe*, der für die Adipozytendifferenzierung wichtigste Transkriptionsfaktor *Pparg*, das mengenmäßig häufigste Protein im Fettgewebe aP2 (*Fabp4*), das Adipokin Adiponektin (*Adipoq*) und der insulin-stimulierbare Glukosetransporter GLUT4 (*Slc2a4*). In den ApoE-defizienten Zellen kann erwartungsgemäß keine Expression des *Apoe*-Gens detektiert werden. In Bezug auf alle anderen Gene gilt, dass die mRNA-Spiegel nach Differenzierung stark reduziert vorliegen.

(n=4; $P < 0,05$ *, $P < 0,01$: **)

3.10.: Differenzierung von Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Adipozyten nach Supplementation von ApoE

Um zu testen, ob die defekte Adipozytendifferenzierung in *ApoE*^{-/-}-Zellen zu rekonstituieren ist, wurde exogenes ApoE in das Zellkulturmedium supplementiert (Abb. 3.15). Zunächst wurden dafür Zellkulturüberstände einer ApoE-überexprimierenden Adipozyten-Zelllinie verwendet (siehe 2.14), die während der Differenzierung der Vorläuferzellen mit dem Differenzierungsmedium gemischt wurden. Am d7 wurde die Expression der Adipozytenmarkergene analysiert (Abb. 3.15).

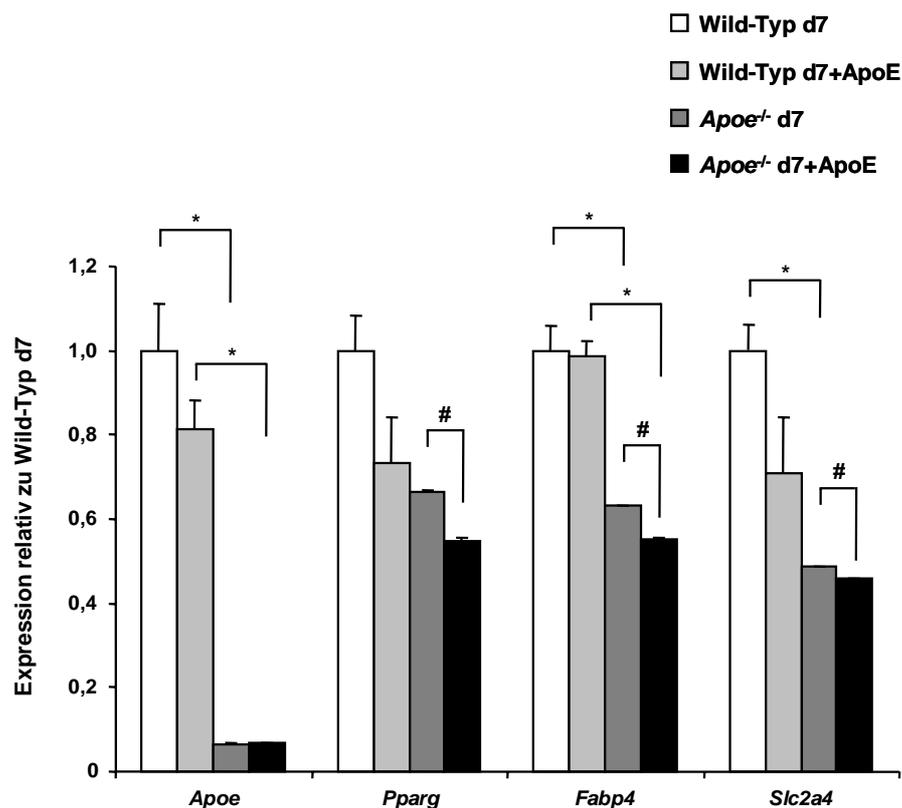


Abb. 3.15.: Effekt von ApoE-Supplementation im Zellkulturmedium auf die Expression von Adipozytengenen in primären Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Adipozyten

ApoE-reiche Überstände wurden von einer ApoE-überexprimierenden Zelllinie gewonnen und für die Kultur der primären Adipozyten verwendet. Die Supplementation von 5 µg/mL ApoE führt nicht dazu, dass die abgeschwächte Genexpression in den ApoE-defizienten Zellen wieder auf Wild-Typ-Niveau angehoben wird. Darüber hinaus scheint das ApoE eher sogar die Adipozytengene in den Wild-Typ-Zellen in ihrer Expression leicht zu inhibieren. (n=2; Wild-Typ vs. *ApoE*^{-/-}: $P < 0,05$; *; - ApoE vs. + ApoE : $P < 0,05$; #)

Die Supplementation führt nicht zu einer Erhöhung der mRNA-Spiegel auf Wild-Typ-Niveau. Auch die Verwendung von ApoE-reichen VLDL zur Supplementation des Zellkulturmediums führt nicht zu einer effektiven Erhöhung (Abb. 3.16).

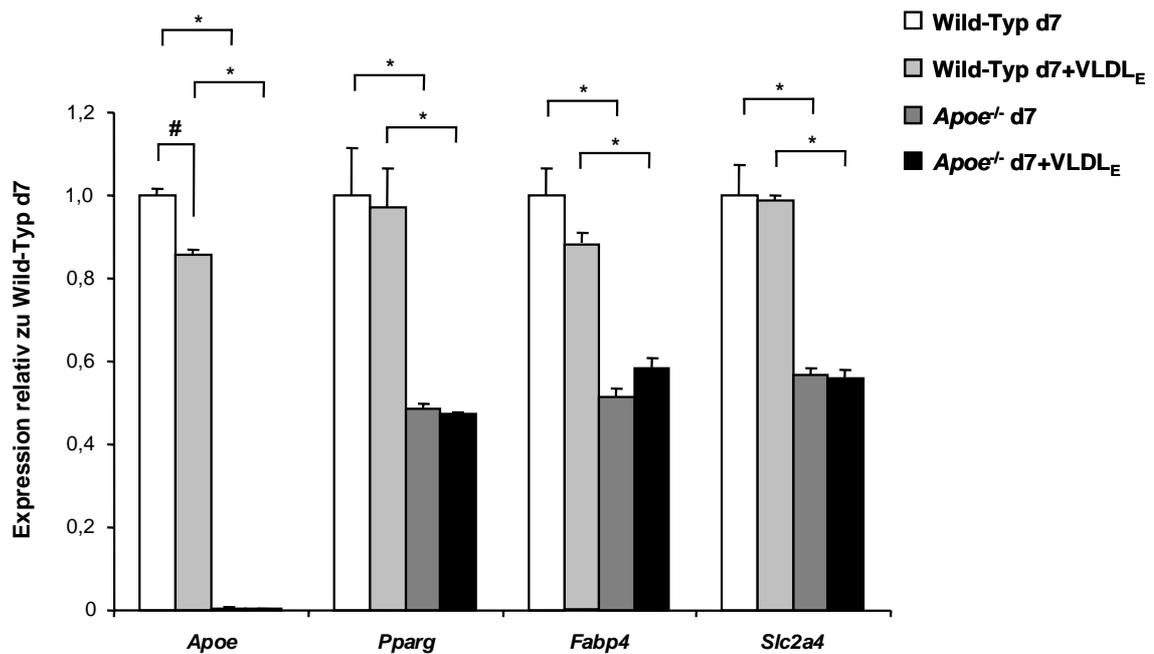


Abb. 3.16.: Effekt von VLDL_E-Supplementation im Zellkulturmedium auf die Expression von Adipozytengenen in primären Wild-Typ und ApoE^{-/-}-Adipozyten

ApoE-haltige VLDL (VLDL_E) wurde aus Plasma durch Ultrazentrifugation gewonnen und während der Differenzierung in das Kulturmedium supplementiert. Die Zugabe führt nicht dazu, dass die abgeschwächte Genexpression in den ApoE-defizienten Zellen wieder auf Wild-Typ-Niveau angehoben wird. (n=2; Wild-Typ vs. ApoE^{-/-}: $P < 0,05$; *: - VLDL_E vs. + VLDL_E: $P < 0,05$; #)

Diese in vitro gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass sich der Phänotyp der ApoE-defizienten Adipozyten nicht durch exogenes ApoE aufheben lässt. Durch die gestörte Differenzierung, könnten für die Entstehung von Insulinresistenz wichtige Adipozytenfunktionen beeinträchtigt sein, ins Besondere die inflammatorische Antwort die durch chronische Überladung mit Lipiden in Adipozyten hervorgerufen wird.

3.11.: Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Wild-Typ und ApoE^{-/-}-Adipozyten nach TNF α -Gabe

Ein Hauptmerkmal der Adipositas-assoziierten Pathophysiologie ist die chronische Entzündungsreaktion, die zwischen Adipozyten und Makrophagen stattfindet. Diese Reaktion wurde durch Stimulation der primären Adipozyten mit TNF α simuliert. Obschon in Wild-Typ-Zellen TNF α zur Produktion von MCP1 (*Ccl2*) und TNF α führt, bleibt diese Antwort in den ApoE^{-/-}-Zellen aus (Abb. 3.17).

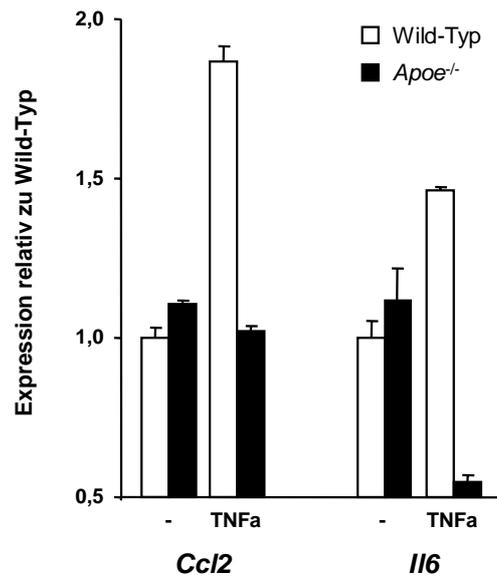


Abb. 3.17.: Reaktion auf TNF α -Stimulation in primären Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Adipozyten

TNF α als pro-inflammatorischer Stimulus wurde für 4 h ins Kulturmedium supplementiert. In Wild-Typ-Zellen wird die Expression von *Ccl2* und *Il6* induziert. In ApoE-defizienten Zellen wird *Ccl2* nicht induziert, *Il6* wird sogar entgegengesetzt reguliert.

Zusammenfassend ist das Fehlen von ApoE in vivo mit einer abgeschwächten Fettleibigkeit, geringerer Hypertrophie von sowohl viszeralen als auch subkutanen Adipozyten und verminderter Expressions von Entzündungsmarkern im weißen Fettgewebe verbunden. In vitro zeigen ApoE-defiziente Adipozyten eine defekte Differenzierung, die sich nicht durch exogenes ApoE wiederaufheben lässt. Dieser Phänotyp ist in den ApoE-defiziente Adipozyten mit einer eingeschränkten Antwort auf TNF α -Stimulation verknüpft. Es lassen sich also in vivo mit in vitro-Ergebnissen korrelieren; in beiden Fällen sind ApoE-defiziente Adipozyten vor exzessiver Lipidakkumulation und deren schädlichen Nebeneffekten relativ geschützt.

Das weiße Fettgewebe ist mit zwei weiteren Geweben eng verwandt: dem braunen Fettgewebe, das jedoch andere Funktionen wahrnimmt und der Knochen, in dem die knochenbauenden Osteoblasten aus den gleichen Vorläuferzellen entstehen wie die Adipozyten. In beiden Geweben könnte ApoE einen starken Effekt auf die Entstehung der Insulinresistenz haben. Im Folgenden wird daher näher auf diese beiden Gewebe eingegangen.

3.12.: Rolle des ApoE im braunen Fettgewebe

Braunes Fettgewebe ist am vaskulären TRL-Stoffwechsel beteiligt, nimmt Fettsäuren zur Speicherung bzw. Verbrennung auf, um seinen Energiebedarf zu decken. In diesem Zusammenhang könnte ApoE die Funktion des BAT durch Änderung a) der chronischen Entzündung oder b) Änderung des Lipidtransports in das BAT beeinflussen. Durch die nervöse, sympathische Aktivierung des BAT nach Kälteexposition wird der Energieumsatz in diesem Gewebe und damit auch die Energiezufuhr erhöht. In seiner Funktion als Lipidtransportmolekül könnte ApoE die Aufnahme von TRL in das BAT beeinflussen. Allerdings sind die mRNA-Level des *ApoE*-Gens nach Aktivierung gesenkt, sowohl in KD- als auch in HFD-gefütterten Tieren (Abb. 3.18).

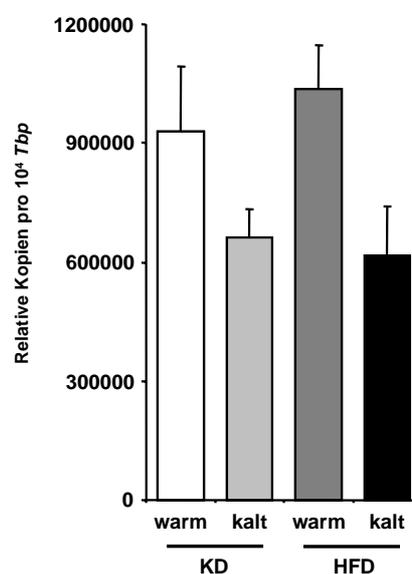


Abb. 3.18.: Expression des *ApoE*-Gens in Abhängigkeit von Adipositas und BAT-Aktivität in Wild-Typ-Tieren

Nach 16 Wochen HFD wurden die Tiere für 24 h bei 4°C gehalten, um das braune Fettgewebe zu aktivieren. Anschließend wurde das interskapulare braune Fettdepot präpariert, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Taqman auf die unten genannte Gene hin vermessen. Die HFD hat keinen starken Effekt auf die Expression des *ApoE*-Gens im Braunen Fettgewebe. Es ist deutlich, dass die Aktivierung des BAT durch Kälte die mRNA-Level des ApoE senkt.

Die in den weißen Fettdepots beobachtete Entzündung nach HFD bzw. die Abschwächung durch das Fehlen des ApoE könnte auch im BAT auftreten. Jedoch lässt sich der Befund in der Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern nicht auf das BAT übertragen (Abb. 3.19).

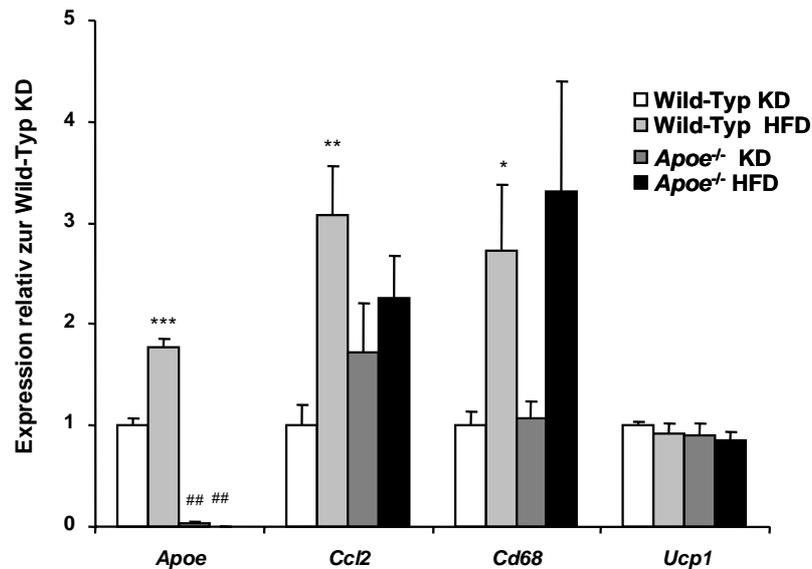


Abb. 3.19.: Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern im braunen Fettgewebe von Wild-Typ und *Apoe*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde das interskapuläre braune Fettdepot präpariert, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Taqman auf die unten genannte Gene hin vermessen. Es ist deutlich, dass erhöhter Lipidgehalt mit erhöhter Expression von pro-inflammatorischen (*Ccl2*, *Cd68*) Genen korreliert, jedoch sind die Entzündungsmarker nicht merklich unterschiedlich zwischen den Genotypen. *Ucp1*, das Gen, das für das wichtigste Protein der *non-shivering thermogenesis* kodiert, ist nicht beeinflusst. (n=6; Wild-Typ: KD vs. HFD und *Apoe*^{-/-}: KD vs. HFD $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***; KD Wild-Typ vs. *Apoe*^{-/-} und HFD Wild-Typ vs. *Apoe*^{-/-} $P < 0,01$: ##)

Zwar nimmt die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *Ccl2* und *Cd68* durch die Fütterung der HFD zu, doch anders als im weißem Fettgewebe gibt es keinen Effekt durch das Fehlen des ApoE in den *Apoe*^{-/-}-Tieren.

Um zu testen, ob ApoE tatsächlich auch den Transport von TRL-Lipiden in das BAT beeinflusst, wurde in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren durch Kälteexposition das BAT aktiviert, radioaktiv-markierte ApoE-freie TRL in die Schwanzvene injiziert und die Organaufnahme nach 15 min analysiert (Abb. 3.20).

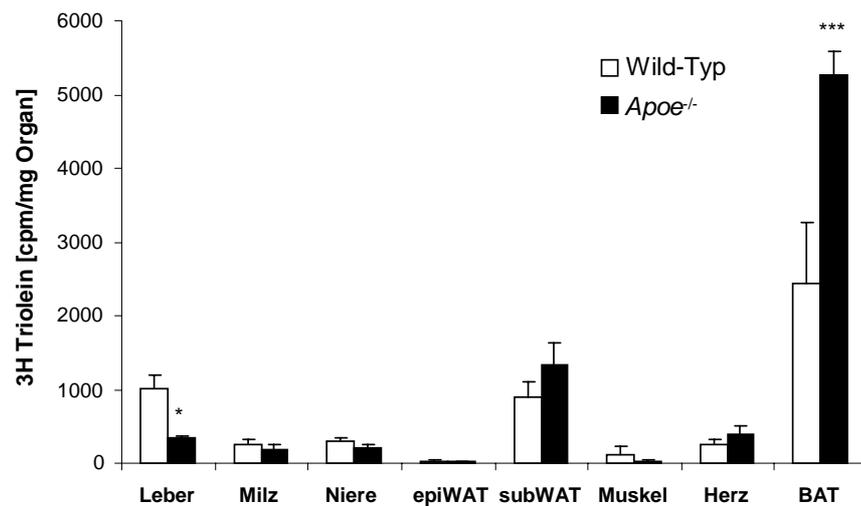


Abb. 3.20.: Aufnahme von TRL in BAT von Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren

Wild-Typ- und ApoE-defiziente Tiere wurden für 24 h bei 4°C gehalten, um das braune Fettgewebe zu aktivieren. Dann wurden ApoE-freie TRL, markiert mit ³H-Triolein, in die Schwanzvene injiziert und die Organaufnahme gemessen. Während die Leberaufnahme verringert ist, ist die Aufnahme in das BAT stark erhöht. (n=6; $P < 0,05$: *, $P < 0,001$: ***)

Es wird deutlich, dass während weniger TRL in die Leber aufgenommen werden, die BAT-Aufnahme stark erhöht ist. Zusammengenommen lassen sich die Effekte, die im weißem Fettgewebe bezüglich der chronischen Entzündung gemacht wurden, nicht auf das BAT übertragen. ApoE scheint in diesem Gewebe keine Effekt zu haben. Folglich sind auch ApoE-Expression nicht verändert und der Lipidtransport in das BAT ist nicht durch ApoE beeinflusst.

Die Teilergebnisse dieser Studie das braune Fettgewebe betreffend wurden kürzlich publiziert. (Bartelt et al., 2011).

Wie bereits oben erwähnt, entstehen neben Adipozyten auch Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Es liegt daher nahe, dass nach HFD/KD-Fütterung auch der Knochen beeinflusst wird. Darauf wird im Folgenden Teil eingegangen.

3.13.: Bedeutung von ApoE für den Knochenstoffwechsel in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Knochenmasse ist häufig in adipösen Patienten verändert, doch als oft nicht konsequent verfolgter Nebenfund bleibt offen, ob tatsächlich ein gerichteter Effekt von Adipositas auf Knochengewebe vorliegt. Da ApoE ein wichtiges Molekül für den Lipidtransport auch in den Knochen ist (Niemeier et al., 2008), wurde die Knochenmasse in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren analysiert.

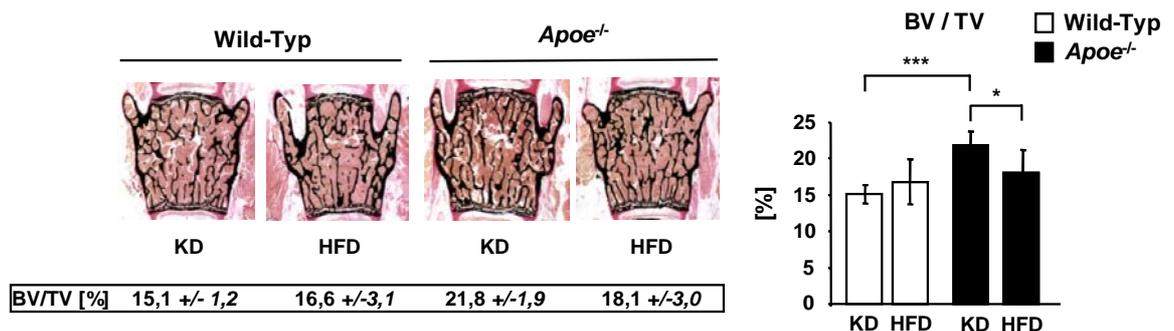


Abb. 3.21.: Histologie des Knochens in Wild-Typ und ApoE^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde das Skelett präpariert, in Ethanol fixiert, in Akrylpolymer eingebettet und Gewebeschnitte von Wirbelkörpern angefertigt. Das Verhältnis von *bone volume* zu *trabecular volume* (BV/TV) wurde mit Hilfe einer histomorphometrischen Software (Osteomatrix) bestimmt. BV/TV, d.h. die Knochenmasse ist auf KD in ApoE-defizienten Tieren stark erhöht. Die HFD ist mit einer Zunahme an Knochenmasse im Wild-Typ verbunden während die HFD-Fütterung eine Reduktion der Knochenmasse verursacht. (n=8; $P < 0,05$: *, $P < 0,001$: ***)

In der Histologie (Abb. 3.21) ist deutlich zu erkennen, dass sich ApoE^{-/-}-Tiere durch erhöhte Knochenmasse (erhöhtes *bone volume/trabecular volume*, BV/TV) auszeichnen, die jedoch nach HFD wieder signifikant abnimmt. In Wild-Typ-Tieren hat die HFD keinen Einfluss auf die Knochenmasse. Analysiert man verschiedene Parameter wie *trabecular number* (Tb.N), *trabecular separation* (Tb.Sp) und *trabecular thickness* (Tb.Th) (Abb. 3.22), so spiegelt sich der Befund aus BV/TV wieder.

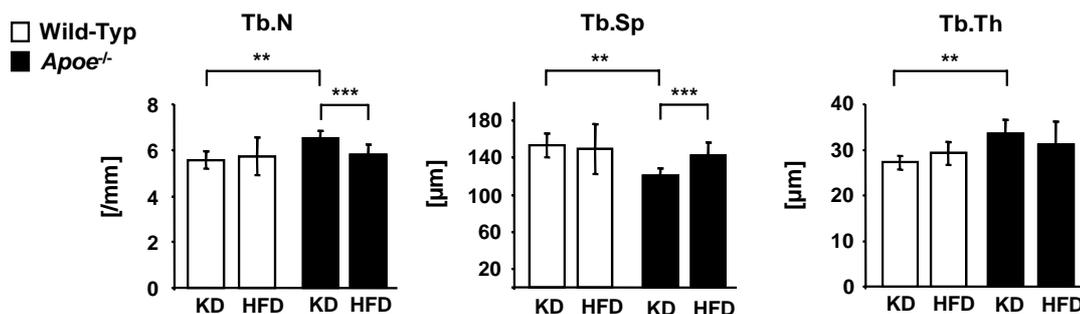


Abb. 3.22.: Histologie des Knochens in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung ff.

Nach 20 Wochen wurde das Skelett präpariert, in Ethanol fixiert, in Akrylpolymer eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt. Die Knochenparameter *trabecular number* (Tb.N), *trabecular separation* (Tb.Sp) und *trabecular thickness* (Tb.Th) wurden mit Hilfe einer histomorphometrischen Software (Osteomatrix) bestimmt. Alle Parameter spiegeln das BV/TV auf KD in ApoE-defizienten Tieren wieder, d.h. die Knochenmasse. Die HFD ist nur mit Veränderungen im *ApoE*^{-/-}-Genotyp verbunden. (n=8; $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***)

Durch 2 Injektionen im Abstand von sieben Tagen eines fluoreszierenden Farbstoffes (Calcein), der sich in der Wachstumsfuge des neugebildeten Knochens einlagert, kann verfolgt werden, wie schnell in vivo Knochen gebildet wird (Abb. 3.23).

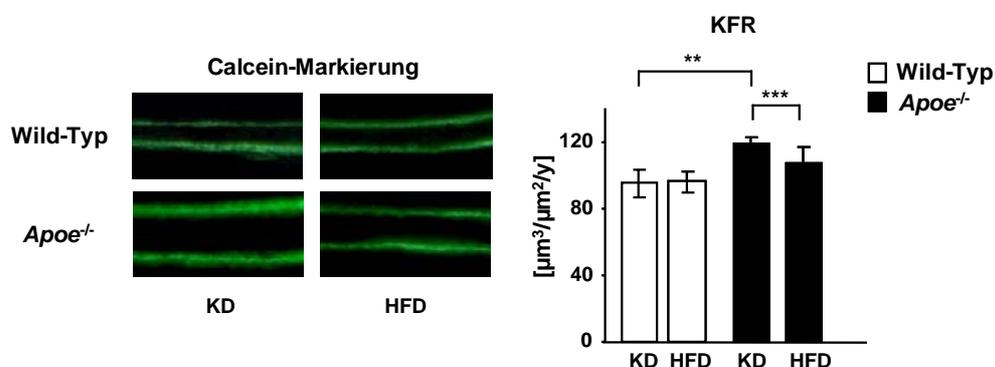


Abb. 3.23.: Knochenformation in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

9 Tage und 2 Tage vor der Präparation des Skeletts wurde intraperitoneal Calcein injiziert. Der Abstand, der sich zwischen beiden Markierungen bildet, stellt die Knochenformationsrate dar, welche hier den Befund des BV/TV wieder spiegelt: Die *ApoE*^{-/-}-Tiere zeigen ein verstärktes Knochenwachstum, das durch die HFD verlangsamt wird. Bei den Wild-Typ-Tieren hat die HFD keinen Effekt. (n=8; $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***)

Die Knochenformationsrate ist bei ApoE-defizienten Tieren deutlich erhöht und wird durch HFD gebremst (Abb. 3.23).

Knochenbildung unterliegt dem Entgegenwirken von Osteoblasten und Osteoclasten. Eine Veränderung dieses Kräfteverhältnisses hätte Konsequenzen für die Knochenmasse. ApoE könnte hier einen Einfluss haben. Zu diesem Zweck wurde histomorphometrisch bestimmt, wie viele Osteoblasten und Osteoclasten pro Knochenperimeter vorhanden sind, und wie viel Knochenoberfläche von diesen Zellen bedeckt wird (Abb. 3.24).

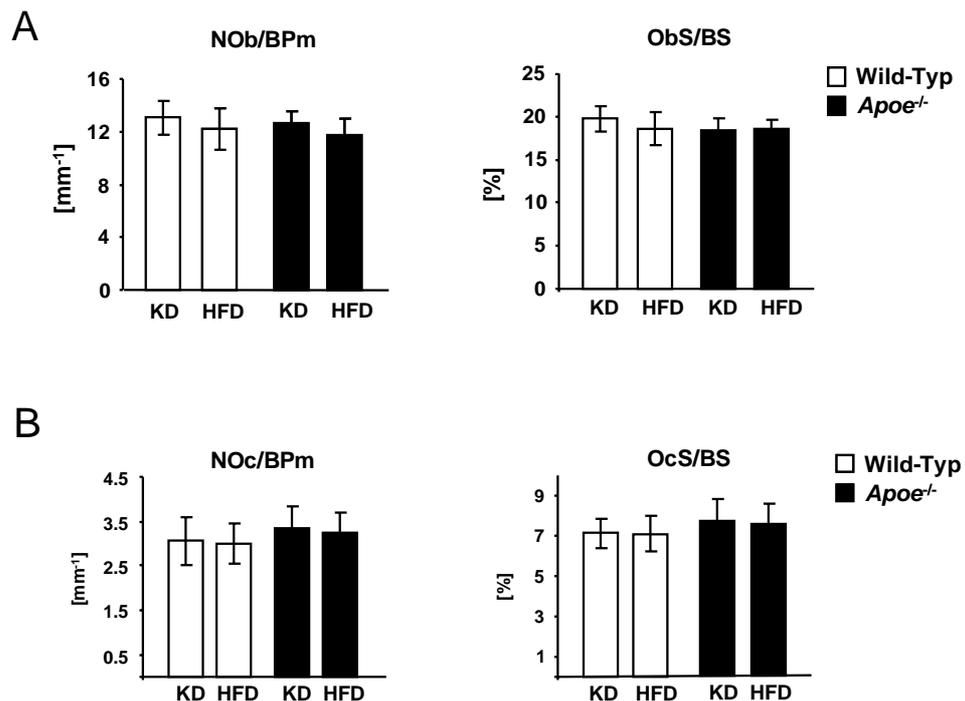


Abb. 3.24.: Bestimmung der Anzahl von Osteoblasten und Osteoclasten in Wild-Typ und ApoE^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde das Skelett präpariert, in Ethanol fixiert, in Akrylpolymer eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt. Die Anzahl und Fläche der Osteoblasten und Osteoclasten wurden mit Hilfe einer histomorphometrischen Software (Osteomatrix) bestimmt. **A:** Weder die Anzahl der Osteoblasten (NOb/BPm) noch deren Oberfläche (Obs/BS) unterscheidet sich zwischen den Genotypen und Diäten. **B:** Gleiches gilt für Osteoclastenanzahl (NOc/BPm) und -oberfläche (OcS/BS).

Nach histomorphometrischer Analyse scheinen weder die Anzahl noch die Oberfläche der Osteoblasten und Osteoclasten verändert in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung (Abb. 3.24).

Eines der wichtigsten Proteine, das ausschließlich von Osteoblasten gebildet wird, ist das Osteocalcin (OCN). Es kann neben der gängigen auch als sogenannte untercarboxylierten Form auftreten. Dieses Hormon wurde zuletzt auch mit einer entscheidenden Funktion im Energiestoffwechsel bedacht (Lee et al., 2007). Daher wurde hier sowohl die Gesamt-OCN als auch die Konzentration des untercarboxylierten OCN Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung im Serum bestimmt (Abb. 3.25).

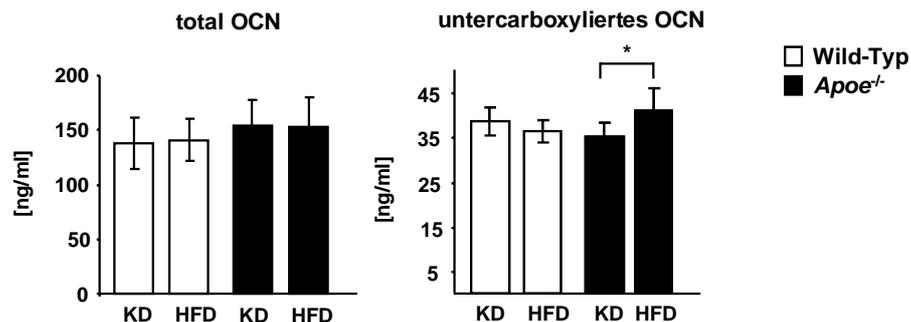


Abb. 3.25.: Serumanalyse der Osteocalcin-Konzentration in Wild-Typ und ApoE^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Nach 20 Wochen wurde Blut entnommen und im Serum mit Hilfe einer ELISA-Methode die Konzentration des Osteocalcins (OCN) und des untercarboxylierten OCN bestimmt. Auch wenn im Gesamt-OCN kein Unterschied festzustellen ist, findet sich nach HFD in den ApoE-defizienten Tieren mehr untercarboxyliertes OCN. (n=8; $P < 0,05$; *)

In unserer Studie zeigen die ApoE-defizienten Tiere leicht erhöhte Osteocalcinspiegel (Abb. 3.25), die allerdings nicht durch HFD verändert sind. Wichtig für die Funktionalität des OCN ist der Carboxyierungsgrad von Glutaminresten, die eine Bindung an Calcium ermöglichen. Hier scheint die HFD in den ApoE-defizienten Tieren das untercarboxylierte OCN zu erhöhen (Abb. 3.25).

Neben den Knochenparametern und der Analyse von Osteoblasten und Osteoclasten, ist das Auftreten von Knochenmarkadipozyten im proximalen Bereich der Tibia ein weiteres Merkmal in diabetischen Modellen. Auch hier könnte ApoE durch die Beeinflussung von Adipozytenentwicklung- und/oder Funktion eine Rolle spielen. Darauf wird im Folgenden eingegangen.

3.14.: Auftreten von Knochenmark-Adipozyten in Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren nach HFD/KD-Fütterung

Osteoblasten und Adipozyten entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Es liegt daher nahe, dass auch im Knochen unter bestimmten Bedingungen Knochenmark-Adipozyten auftreten. Dies ist insbesondere bei adipösen Patienten, die an T2DM leiden, der Fall. Daher wurde hier in der Histologie das Auftreten von Knochenmark-Adipozyten analysiert (Abb. 3.26).

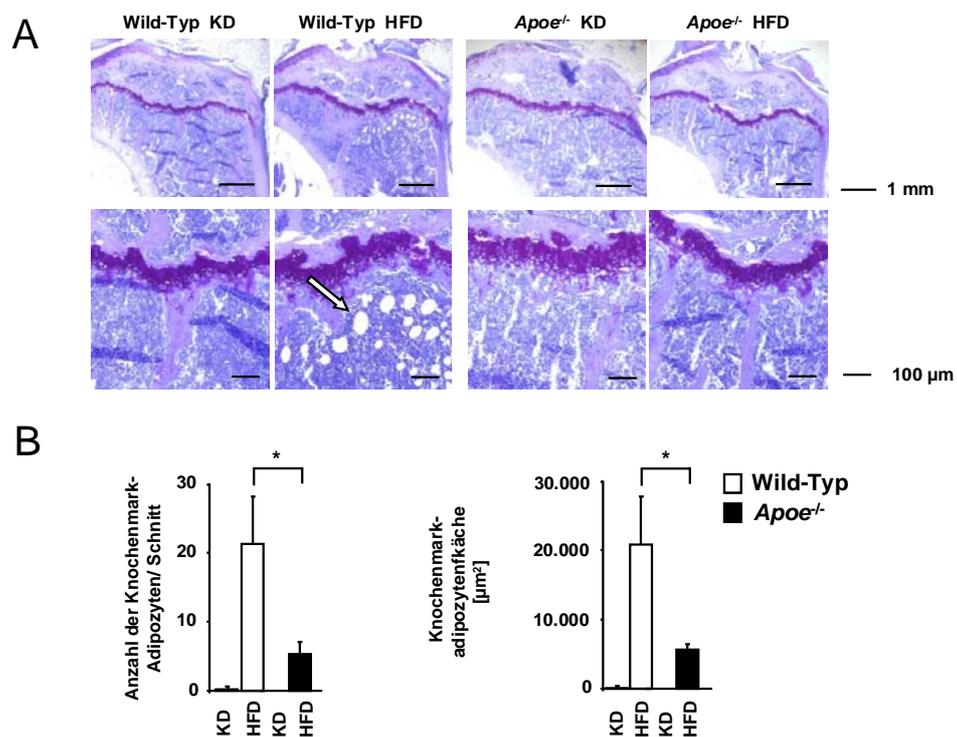


Abb. 3.26.: Darstellung von Adipozyten im Knochenmark der Tibiae in Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD/KD-Fütterung

A: Nach 20 Wochen wurde das Skelett präpariert, in Ethanol fixiert, in Akrylpolymer eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt. Die HFD führt im Wild-Typ zur Ansammlung von Knochenmark-Adipozyten (Pfeil) im proximalen Bereich der Tibia. Im *ApoE*^{-/-}-Hintergrund finden sich nur wenige, deren Fläche deutlich kleiner ist. B: Makroskopische Quantifizierung (n=5; $P < 0,05$: *).

In der Histologie der proximalen Tibia zeigt sich deutlich, dass in den HFD-gefütterten Wild-Typ-Tieren große Adipozyten auftreten (Abb. 3.26). In den *ApoE*^{-/-}-Tieren finden sich allerdings nur im Einzelfall einige wenige. Es wird deutlich das Knochenmark-Adipozyten in ihrer Entstehung analog zu den weißen Fettgeweben außerhalb des Knochens reguliert werden und das ApoE hierbei eine tragenden Rolle spielt.

Die Teilergebnisse dieser Studie den Knochen betreffend wurden kürzlich publiziert (Bartelt et al., 2010).

4. Diskussion

Die Verbreitung von Adipositas und ihren schädlichen Wirkungen wie T2DM und kardiovaskuläre Erkrankungen nehmen weltweit zu. Daher ist es nötig, die molekularbiologischen und biochemischen Mechanismen, die diesen Erkrankungen zu Grunde liegen, zu verstehen und aus diesem Wissen neue Therapieansätze zu verwirklichen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des ApoE, einem wichtigen Molekül im systemischen Lipidtransport, bei der Entstehung der Adipositas im Mausmodell untersucht. Nach Induktion der Fettleibigkeit in *ApoE*^{-/-}-Tieren und entsprechenden Wild-Typ-Kontrollen, wurden die pathophysiologischen Konsequenzen auf organischer und zellulärer Ebene untersucht. Die dabei gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.1.: Abgeschwächte Fettleibigkeit in *ApoE*^{-/-}-Tieren

Die Hochfett-diät induziert eine Zunahme an weißem Fettgewebe, primär durch Aufnahme von Fettsäuren, die aus Lipoproteinen-TAG herausgelöst und reesteriert in *lipid droplets* der Adipozyten gespeichert werden. In *ApoE*^{-/-}-Tieren ist die Akkumulation von weißem Fettgewebe abgeschwächt (Abb. 3.2, Abb. 3.3, Abb. 3.9). Maßgeblich für die Entstehung von Adipositas ist die Energiebilanz, d.h. wie hoch ist die körperliche Energieverbrennung durch beispielsweise physische Aktivität im Vergleich zu Energieaufnahme durch Nahrung ist. Eine positive Energiebilanz führt über längere Zeiträume unweigerlich zu Übergewicht (Rosen und Spiegelman, 2006). Neben physischer Aktivität kann aber auch effektiveres Verbrennen von Kalorien zu einer negativen Energiebilanz führen, nur ist dieser Grundumsatz zwischen *ApoE*^{-/-}-Tieren und Kontrollen nicht unterschiedlich (Hofmann et al., 2008). Eine weitere Möglichkeit die Energiebilanz zu beeinflussen, liegt in der neuronalen Kontrolle der Nahrungsaufnahme. In Bereichen des Gehirns, in denen die Steuerungselemente für Nahrungsaufnahme (Coll et al., 2007) liegen, wird festgelegt, wann ein Sättigungszustand erreicht ist. In *ApoE*^{-/-}-Tieren wurde allerdings auch an dieser Stelle kein Einfluss des ApoE festgestellt (Karagiannides et al., 2008). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass die mildere Adipositas weder durch erhöhten Grundumsatz noch durch niedrigere Nahrungsaufnahme verursacht wird. Neben der deutlich geringeren Masse an weißem Fettgewebe, sind in den *ApoE*^{-/-}-Tieren auch die wichtigsten Serumparameter nach HFD weniger stark verändert (Tab. 3), ein Umstand der sehr wahrscheinlich direkt mit der weißen Fettmasse und Insulin korreliert. Deutlich wird weiterhin, dass das verwendete Adipositas-Modell nicht mit einem diabetischen gleichzusetzen ist. Zum einen sind die Insulinkonzentrationen im Wild-Typ nur stark erhöht, die Produktion ist daher noch nicht zum Erliegen gekommen. In dem verwendeten Modell liegen auch keine Erhöhung der TAG bzw. deutliche Erniedrigung des

Adiponektins vor, Merkmale, die weithin in übergewichtigen Patienten mit T2DM verbreitet sind (Van Gaal et al., 2006; Despres und Lemieux, 2006). Nichtsdestotrotz liegen alle anderen Befunde der Adipositas vor.

Systemisch betrachtet, ergibt sich grundsätzlich folgendes Szenario. Im Vergleich zur Kontrolldiät nimmt der Wild-Typ stark an Fettgewebe zu, was mit der pathophysiologischen Erhöhung der Serumparameter einhergeht und ultimativ mit verschlechterter Glukosetoleranz und Insulinsensitivität (Abb. 3.4). Erst nach HFD kann eine exotop Lipidakkumulation in der Leber (Abb. 3.5) beobachtet werden. In den ApoE-defizienten Tieren liegt schon auf Kontrolldiät eine milde Verfettung der Leber vor, die sich auf HFD noch verstärkt und Merkmale der NASH zeigt (Abb. 3.5 und 3.6). In der Peripherie zeigt sich im Vergleich zum Wild-Typ eine abgeschwächte Adipositas und zusammengenommen – im Vergleich zum Wild-Typ – eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität. Mit anderen Worten sind die Lipide in den beiden Mausmodellen nach HFD unterschiedlich verteilt, allerdings mit großer Auswirkung auf die Insulinresistenz, der treibenden Kraft hinter der Entstehung des T2DM. Anhand der Umverteilung zwischen Leber und Peripherie soll die Rolle des ApoE in den Organe im Einzelnen diskutiert werden.

4.2.: Rolle des ApoE in NASH

Die Leber in ApoE-defizienten Tieren zeigt eine verstärkte Lipidakkumulation, verstärkt noch durch HFD (Abb. 3.5). Dieser Beobachtung können zwei prinzipielle Rollen des ApoE zu Grunde liegen. Zum einen kann die Kapazität der Peripherie (ins Besondere weißes Fettgewebe), Lipide zu speichern vermindert sein und es kommt zum „Überlaufen“ der Lipide in andere Organe (ektotop Lipidakkumulationen). Zum anderen kann ApoE bei der Reifung und Sekretion von TAG-reichen VLDL in Hepatozyten notwendig sein, so dass sein Fehlen den Export von Lipiden vermindert. Die Leber hat per se eine hohe Kapazität, Lipide zu speichern, ohne dabei großen Schaden zu nehmen (Fabbrini et al., 2009). Sobald hier der Endpunkt überschritten wird, kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion, die sowohl durch Hepatozyten als auch durch Kupffer-Zellen vermittelt wird. Beide Zelltypen produzieren ApoE, wobei die Hepatozyten mengenmäßig das Gros des Plasma-ApoE bereitstellen. Auch wenn ApoE an der Synthese von VLDL beteiligt ist, so scheint sein Fehlen die Rate, mit der Lipide aus der Leber exportiert werden, nicht zu beeinflussen, sondern eher für die Struktur bzw. Größe der Partikel wichtig zu sein (Mensenkamp et al., 2001). Es liegt daher nahe, dass die Leber in der Lage ist, Lipide zu exportieren, wenn auch eventuell in etwas geringeren Umfang. In Kupffer-Zellen produziertes ApoE scheint für den Aktivitätsgrad wichtig zu sein, der Art, dass Cholesterolsammlung eine pro-inflammatorische Antwort provoziert. Dieser Prozess ist demjenigen in Makrophagen sehr ähnlich und lässt die Frage offen, ob ohne ApoE die

Kupffer-Zellen die Einlagerung von Lipiden in Hepatozyten über die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen beeinflussen. Kompletter Verlust der Makrophagen fördert tatsächlich Lipidspeicherung in Hepatozyten (Clementi et al., 2009). Es wäre also interessant, aus ApoE-defizienten und Wild-Typ Lebern Kupffer-Zellen zu isolieren und in Zellkultur das inflammatorische Potential in Abhängigkeit von ApoE zu charakterisieren. Neben seiner Funktion als Lipidtransportmolekül, hat ApoE durch Bindung an Rezeptoren auch Signaleigenschaften (Getz und Reardon, 2009). Darunter fällt ins Besondere die Beeinflussung der Proliferationsrate in *vascular smooth muscle cells* und somit der Entstehung von Atherosklerose. In Bezug auf die Leber ist allerdings nichts bekannt, was auf eine Beteiligung des ApoE an Signalen, die eine Steatose beeinflussen, hindeutet. Analysiert man das Fettsäure-Profil in der Leber, so wird deutlich das ein prinzipieller Unterschied zwischen Wild-Typ und *ApoE*^{-/-}-Tieren vorliegt. Nach HFD sind die Gesamtfettsäuren im n-6-Weg in den *ApoE*^{-/-}-Tieren erhöht (Abb. 3.7), in den Phospholipiden jedoch erniedrigt, ins Besondere der Anteil des Arachidonat (Abb. 3.8). Umgekehrt verhält es sich mit dem n-3-Weg. Man kann aus diesem Profil schließen, dass in den *ApoE*^{-/-}-Tieren der Einbau von n-6-Fettsäuren in die Phospholipide zurückgeht, der Einbau von n-3-Fettsäuren aber zunimmt. Fettsäuren in den Phospholipiden sind oft Vorläufer für die Synthese von höheren Signalmolekülen wie denjenigen aus den Stoffklassen der Endocannabinoide, Prostaglandine und Leukotriene (Di, V, 2008). Darüber hinaus wurde sowohl in Maus- als auch in Humanstudien gezeigt, dass sich mehrfach ungesättigte Fettsäuren, ins Besondere die n-3-Fettsäuren Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure, nicht nur vorbeugend sondern auch im Krankheitsfall äußerst günstig für den Stoffwechsel auswirken (Harris, 2010). Es liegt daher nahe, dass von diesem Aspekt aus die NASH in den *ApoE*^{-/-}-Tieren vergleichsweise vorteilhaft ist.

4.3.: Rolle des ApoE im weißen Fettgewebe

Adipositas ist in *ApoE*^{-/-}-Tieren mit geringerer Fettmasse verbunden (Abb. 3.2 und 3.3). Gemessen am durchschnittlichen Adipozytendurchmesser (Abb. 3.9) kann davon ausgegangen werden, dass verglichen mit dem Wild-Typ sowohl die Adipozyten im epiWAT als auch diejenigen im subWAT relativ weniger hypertroph sind. Dies stimmt auch mit den Spiegeln der wichtigsten Adipokine, Leptin und Adiponektin überein (Tab. 3). Da Adiponektin einen direkten Einfluss auf die Insulinsensitivität in Muskel und in Leber hat (Iwabu et al., 2010), liegt es nahe, dass sich dieser Umstand vorteilhaft auf die Glukosetoleranz in den *ApoE*^{-/-}-Tieren auswirkt. In Kombination mit der relativ geringeren Hypertrophie der Adipozyten, die auf zellulärer Ebene direkt Insulinsensitivität beeinflusst (Hotamisligil, 2006; Hotamisligil, 2010), kann die verbesserte Glukosetoleranz erklärt werden. Dazu kommt auch, das ApoE wichtig für die inflammatorische Reaktion in Makrophagen sein könnte, ein Umstand der schon für Kupffer-Zellen in der Leber unter

4.2 diskutiert wurde. Verringertes inflammatorisches Potential würde die zelluläre Insulinresistenz in Adipozyten abschwächen (Hotamisligil, 2006; Hotamisligil, 2010). Nichtsdestotrotz liegt in den *ApoE*^{-/-}-Tieren NASH vor, wobei es unklar bleibt, ob a) eine NASH mit hepatischer Insulinresistenz verbunden ist und b) ob periphere oder hepatische Insulinresistenz im System qualitativ wichtiger ist. Obwohl es keinen direkten experimentellen Beweis gibt, nimmt man an, dass NASH, die auch häufig in adipösen Patienten beobachtet wird (Fabbrini et al., 2009), zur Entstehung der systemische Insulinresistenz beiträgt. Weiterhin gilt es als vorteilhaft, im Therapieverlauf ektoper Lipidakkumulation (z. B. in Herz, Leber und Muskel) zu vermeiden und Lipide anstatt dessen „sicher“ verpackt im Fettgewebe zu speichern – unter der Voraussetzung, dass Hyperplasie an Stelle von Hypertrophie vorliegt. Im Gegensatz zu einigen experimentellen Modellen (Kim et al., 2007), in denen gezeigt wurde, dass die Abnahme ektoper Lipidakkumulation bei gleichzeitiger Zunahme an weißem Fettgewebe vorteilhaft für Insulinsensitivität ist, liegt in *ApoE*^{-/-}-Tieren nach HFD genau das entgegengesetzte Bild vor: weniger weißes Fettgewebe bei gleichzeitiger NASH verbessert die systemische Insulinsensitivität im Vergleich zum Wild-Typ. An diesem Punkt gibt es zwei elementare Fragen: 1. ist die NASH in den *ApoE*^{-/-}-Tieren von Vorteil im Vergleich zum Wild-Typ? Und 2. Was führt zur geringeren Akkumulation von weißem Fettgewebe? Die erste Frage lässt sich wohl – in Anbetracht der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse – positiv beantworten. Um diese Hypothese zu bestätigen, können sogenannte *hyperinsulinemic-euglycemic-clamp studies* durchgeführt werden, in denen direkt die Glukose-Produktion der Leber und der Einfluss des Insulins hierauf gemessen werden kann. Darüber hinaus kann über proteinbiochemische Methoden in Leberlysaten direkt verfolgt werden, wie der Zustand von Proteinen des Insulinsignalweges ist. Diese Ergebnisse würden Aufschluss darüber geben, ob die NASH bei weniger weißem Fett in den ApoE-defizienten Tieren im Vergleich zum Wild-Typ (weniger NASH, hypertrophes Fettgewebe) von Vorteil für systemische Insulinresistenz ist.

Für die Beantwortung der zweiten Frage liegen zwei Möglichkeiten nahe: a) durch die fehlende Funktion des ApoE im vaskulären Lipidtransport nimmt das Fettgewebe in den ApoE-defizienten Tieren weniger Lipide auf oder b) es gibt mehr Lipide ab, bzw. kann sie nicht effizient speichern. Die Aufnahme aus der Zirkulation in das Gewebe wurde von Hofmann et al (Hofmann et al., 2008) als defekt beschrieben, allerdings sprechen die Daten aus Abb. 3.13 dafür das keine Verminderung in der Aufnahme weder in weißes (epi und subWAT) noch in braunes (BAT, siehe 4.4) Fettgewebe vorliegt. Für die Variante b), dass also mehr Lipide abgegeben bzw. nicht gespeichert werden, sprechen einige experimentelle Hinweise, die hier in vitro in primären Adipozyten gewonnen wurden. Zum einen ist in *ApoE*^{-/-}-Zellen die Lipidakkumulation gestört (Abb. 3.22), was vermutlich auf einen Fehler im Differenzierungsprogramm zurückzuführen ist (Abb. 3.23). Auch wenn

der Effekt von primären Adipozyten *in vitro* nicht direkt auf die *in vivo*-Situation übertragbar ist, wo mehrere Zelltypen in einer 3D-Organisation ein Organ bilden, das mit anderen Organen im Stoffaustausch steht, liegt ein Zusammenhang nahe. Überraschenderweise konnte das Expressionsprofil der Adipozyten weder mit rekombinanten ApoE noch mit ApoE-haltigen VLDL wiederhergestellt werden (Abb. 3.24 bzw. Abb. 3.25). Dies deutet auf eine Rolle des endogenen ApoE, d.h. in den Adipozyten hergestellten, innerhalb der Adipozyten hin.

Huang et al (Huang et al., 2009) untersuchten weiterhin, ob die rezeptorvermittelte Endozytose über Lipoproteinrezeptoren unterschiedlich ist, doch wurde in dieser Studie vernachlässigt, dass a) per se ein Defekt in der Differenzierung vorlag und b) das in der physiologischen *in vivo*-Situation Adipozyten nicht mit TRL in Kontakt treten, da im weißen Fettgewebe das Endothel der primäre Ort der Bindung ist.

Darüber hinaus könnte ApoE über seine Bindungseigenschaften an hydrophobe Oberflächen an *lipid droplets* binden und so die Physiologie der LD beeinflussen. Eine gestörte intrazelluläre Lipolyse kann eine gestörte Lieferung von Fettsäure-Liganden für die PPAR γ -Aktivierung zur Folge haben (Haemmerle et al., 2006; Zimmermann et al., 2009). Diese Aktivierung von PPAR γ ist bedeutsam für seine Funktion, weshalb es möglich erscheint, dass die Freisetzung von freien Fettsäuren direkt mit der physiologischen Funktion gekoppelt ist. Intrazelluläres ApoE könnte demnach über die Modulation der Lipolyse die Aktivierung von PPAR γ und damit die Differenzierung beeinflussen, zumindest in isolierten Adipozyten. Neben geringerer Lipidakkumulation scheint auch die inflammatorische Antwort auf das Zytokin TNF α in ApoE-defizienten Zellen gestört zu sein (Abb. 3.26). Dies kann direkt in der gestörten Differenzierung und damit in einer generell gestörten Funktion dieser Zellen begründet liegen. Eine partielle Resistenz gegen pro-inflammatorische Reize hätte zur Folge, dass die sonst verstärkende Wirkung auf Insulinresistenz nicht auftritt. Zusammen mit der geringeren Lipidbelastung kann somit eine Hypothese generiert werden, wie zelluläre Effekte in primären Adipozyten die *in vivo* beobachtete verbesserte Insulinresistenz in den ApoE-defizienten Tieren erklärt.

4.4.: Rolle des ApoE im braunen Fettgewebe

Die Ergebnisse bezüglich des braunen Fettgewebes sind in ihrer Gesamtheit sehr klar. Obwohl ApoE im BAT produziert wird, findet sich sowohl für die chronische Entzündung nach HFD als auch für die Expression des wichtigsten Proteins der braunen Adipozyten, des UCP 1 , kein signifikanter Unterschied zwischen Wild-Typ- und ApoE-defizienten Tieren (Abb. 3.11). Auch dass das *ApoE*-Gen nach Aktivierung des BAT induziert wird (Abb. 3.12), ist für die Aufnahme von TRL in das BAT, der eigentlichen Funktion des ApoE, nicht von Bedeutung (Abb. 3.13). Allerdings wird deutlich, dass erwartungsgemäß

ApoE sehr wichtig für die Aufnahme von TRL in die Leber ist und dass aufgrund dieser verringerten Leberaufnahme und vermutlich längeren Zirkulation der Partikel die Aufnahme in das BAT sogar erhöht ist. Zusammengenommen scheint das BAT in seiner Funktion nicht durch das Fehlen von ApoE beeinflusst zu sein.

4.5.: Rolle des ApoE im Knochen

Interessanterweise ergibt sich auch eine Erklärung für die HFD-sensitive erhöhte Knochenmasse (Abb. 3.14, 3.15 und 3.16) und die stark verringerte Lipidakkumulation im Knochengewebe der ApoE-defizienten Tieren (Abb. 3.19). Wenn die endogene Expression von ApoE in von mesenchymalen Stammzellen abgeleiteten Adipozyten für Differenzierungsprozesse wichtig ist (siehe oben), so liegt es nahe, dass ähnliches auch für Osteoblasten gilt, die einen gemeinsamen entwicklungsbiologischen Ursprung mit Adipozyten haben (Rosen und Buxsein, 2006). Gemäß dem Modell, dass in der Entwicklung festgelegt wird, ob eine Stammzelle in Adipozyt oder Osteoblast differenziert, kann ApoE das Verhältnis beider zu einander beeinflussen – kurz verschiebt also die Differenzierung in Richtung Osteoblast, was eine gesteigerte Knochenbildung zur Folge hätte (Schilling et al., 2005). Gerade die potentielle Rolle des ApoE im WNT *signalling* unterstützt diese Hypothese: Lipoprotein-Rezeptoren wie LRP5, LRP6 und LRP1 sind am WNT *signalling* beteiligt und binden ApoE. Es kann vermutet werden, dass ApoE die Bindung von WNT-Liganden an Lipoprotein-Rezeptoren verändert und somit die Effektivität der WNT-Moleküle, die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu steuern, beeinflusst. Weiterhin könnte die Effizienz des ApoE hierbei durch die Bindungsstärke an Lipoprotein-Rezeptoren vorgegeben sein. Eine Aktivierung des WNT *signalling* resultiert in der Hemmung der Adipozytendifferenzierung und der Förderung der Osteoblasten-Entwicklung (Ross et al., 2000; Takada et al., 2009), ein Phänotyp, der in den ApoE-defizienten Tieren vorliegt. Jedoch ist die Osteoblastenzahl nicht erhöht (Abb. 3.17), die Menge an untercarboxyliertem OCN jedoch in den ApoE-defizienten Tieren auf HFD schon (Abb. 3.18). In Kombination mit der gesteigerten Knochenformation (Abb. 3.16), deutet dies zumindest auf eine gesteigerte Osteoblasten-Aktivität hin. Auch wenn bis heute unklar ist, welche Faktoren bei der Bildung von untercarboxyliertem OCN eine Rolle spielen, deuten Studien darauf hin, dass diese Form des OCN direkt mit verbesserter Insulinsensitivität verbunden ist (Hwang et al., 2009; Prats-Puig et al., 2010). Tatsächlich liegen in den ApoE-defizienten Tieren auf HFD erhöhte untercarboxylierte OCN-Werte vor, die zumindestens teilweise die im Vergleich zum Wild-Typ verbesserte Insulinsensitivität erklären könnten.

Alle Effekte, die in dieser Studie nach HFD in *ApoE*^{-/-}-Tieren beschrieben werden, sind klinisch relevant. ApoE ist in seinen Isoformen ApoE2 und ApoE4, die veränderte

Liganden-Eigenschaften mit sich bringen, distinkten Krankheitsbildern zugeordnet. Insbesondere die Korrelation mit kardiovaskulären Erkrankungen könnte zumeist potentiellen Einfluss des ApoE auf die Entstehung von Fettleibigkeit überschatten. Laut der oben aufgestellten Theorie, dass Knochen- und Fettmasse der Regulation durch ApoE unterliegen, sollten Individuen, die homozygote Träger des APOE2-Allels sind, einen erniedrigten Körperfettanteil aufweisen und umgekehrt homozygote Träger des APOE4-Allels einen erhöhten und damit auch erniedrigte bzw. erhöhte Risiken, an T2DM zu erkranken. Tatsächlich ist ein Promoterpolymorphismus im APOE-Gen mit Insulinsensitivität im Zusammenhang mit Nahrungslipiden assoziiert (Moreno et al., 2005) und Daten aus Mäusen, die knock-ins der human Isoformen ApoE3 bzw. ApoE4 deuten auf diesen Zusammenhang hin (Arbones-Mainar et al., 2008).

In umgekehrter Weise sollten die Knochenmasse und damit das Auftreten von Osteoporose und -petrose in diesen Populationen beeinflusst sein, obwohl es noch keine Hinweise dazu gibt (Schoofs et al., 2004). Für die Zukunft ist es ratsam, sorgsam klinische Studien zu reevaluieren, um die Wichtigkeit des ApoE in der Entstehung der Insulinresistenz auch im Menschen zu untersuchen. Durch sorgfältige Anamnese könnte der Entstehung von Adipositas und damit verbundenen anderen Erkrankungen vorgebeugt werden, bestenfalls durch einfache Feststellung des APOE-Genotyps und entsprechende medizinische Empfehlungen.

Große Teile der Ergebnisse, die in dieser Promotion erarbeitet wurden, konnten für Manuskripte verwendet werden, die teilweise schon publiziert sind (Bartelt et al., 2010; Bartelt et al., 2011) (siehe 8.7).

Das multifunktionelle 34 kDa Glykoprotein ApoE ist ein Lipidtransportmolekül und wird von vielen verschiedenen Zelltypen produziert. Es vermittelt die Aufnahme von Lipoproteinen, fördert die Ausscheidung von überschüssigem Cholesterol und kann durch die Bindung an Lipoprotein-Rezeptoren Signalfunktion übernehmen. Adipositas, die hieraus entstehende Insulinresistenz und ultimativ Typ 2 Diabetes Mellitus bergen weltweit ein wachsendes Gefahrenpotential für die Gesundheit. Ziel dieser Arbeit war es, die organspezifische Rolle des ApoE für den Stoffwechsel der Leber, des Fettgewebes und des Knochens zu untersuchen und den Bezug zur Entstehung der Insulinresistenz im Mausmodell näher zu beschreiben. Dazu wurde Wild-Typ- und ApoE-defizienten Tieren Hochfettdiät bzw. Kontrolldiät gefüttert und dadurch Adipositas induziert. Die Wirkung des ApoE wurde sowohl systemisch als auch auf Organ- und zellulärer Ebene charakterisiert.

Während der Wild-Typ durch exzessive Akkumulation von weißem Fettgewebe und systemische Insulinresistenz gekennzeichnet ist, sind die *ApoE*^{-/-}-Tieren relativ davor geschützt. Die Adipozyten des weißen Fettgewebes in *ApoE*^{-/-}-Tieren sind durch weniger Lipideinlagerung und verbesserte Leptin- und Adiponektin-Spiegel charakterisiert. Folgerichtig ist nicht nur die schädliche chronische Entzündung im weißen Fettgewebe verringert, sondern auch die Glukosetoleranz signifikant verbessert. Das braune Fettgewebe, das sehr bedeutsam für den Energiestoffwechsel ist, ist nicht durch die Abwesenheit von ApoE beeinflusst. Erstaunlicherweise liegt durch das Fehlen des ApoE eine Steatohepatitis vor, die allerdings durch ein eher vorteilhaftes Fettsäureprofil charakterisiert ist. Die vergrößerte Knochenmasse bei relativ weniger Adipozyten, legt eine Beeinflussung der entwicklungsbiologischen Linie von Osteoblasten und Adipozyten durch ApoE nahe. Diese Hypothese lässt sich durch den Phänotyp von in vitro differenzierten Adipozyten aus *ApoE*^{-/-}-Tieren untermauern, der Art, dass endogenes ApoE für die Adipozytendifferenzierung – und funktion wichtig ist.

ApoE ist im Menschen ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen und der Alzheimer-Krankheit. Darüber hinaus etabliert diese Arbeit ApoE als inversen Regulator von Fettgewebe- und Knochenmasse und dadurch als kritischen Faktor in der Ausprägung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes Mellitus.

Apolipoprotein E (apoE) is multifunctional 34 kDa glycoprotein that is present on all lipoprotein classes except LDL. It mediates the efficient clearance of lipoprotein remnants from the circulation and stimulates reverse cholesterol transport, thus preventing the development of atherosclerosis. Although the vast majority of apoE is produced by the liver its expression has been detected in several other tissues such as osteoblasts and adipocytes. As the prevalence of obesity and its deleterious metabolic consequences is steadily growing, knowledge of underlying molecular mechanisms is required. This work aimed to decipher the role of apoE as a lipid transport molecule for the organ-specific function in liver, adipose tissue and bone with regard to the development of insulin resistance, the driving force in the development of type 2 diabetes.

Therefore, apoE-deficient (*ApoE*^{-/-}) mice and wild-type controls were fed a high-fat diet or control diet to induce obesity. At all parameters *ApoE*^{-/-} mice were protected from excessive weight gain due to reduced white fat accumulation and less chronic inflammation in adipose tissue. Consequently, these mice displayed improved insulin sensitivity. Although highly important for energy metabolism, we observed no changes in brown adipose tissue in *ApoE*^{-/-} mice. Surprisingly, even on control diet and more strikingly on HFD *ApoE*^{-/-} were characterized by fatty liver disease with hallmarks of inflammation. However, the fatty acid profile revealed a remarkable difference to wild-type control with increased levels of n-3 fatty acids, a profile beneficial for insulin sensitivity. In primary *ApoE*^{-/-} adipocytes, differentiation as well as the inflammatory response are impaired, suggesting a molecular defect apart from disturbed lipid transport. Next to adipocytes, bone forming osteoblasts arise from mesenchymal progenitor cells. Here we observe that apoE is an inverse regulator of bone and fat development: while on control diet *ApoE*^{-/-} mice have increased bone mass after HFD these mice have slower rates of bone formation; on wild-type controls is no change in response to diet. This inverse regulation could be based on manipulation of the precursor-to-osteoblast-or-adipocyte transition. Taken together, apoE enhances the accumulation of white adipose tissue, protects from steatosis and is a major regulator of bone formation in relation to diet-induced obesity.

In humans apoE is a major risk factor for atherosclerosis and Alzheimer's disease. In line with this work establishes apoE as an important factor for bone and fat mass development and thus as a critical factor in the development of obesity and insulin resistance.

Amling, M.; Priemel, M.; Holzmann, T.; Chapin, K.; Rueger, J. M.; Baron, R. und Demay, M. B. (1999). Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* *140*, 4982-4987.

Arbones-Mainar, J.M.; Johnson, L.A.; Altenburg, M.K. und Maeda, N. (2008). Differential modulation of diet-induced obesity and adipocyte functionality by human apolipoprotein E3 and E4 in mice. *Int. J. Obesity* *32*, 1595-1605.

Bartelt, A.; Beil, F.T.; Schinke, T.; Roeser, K.; Ruether, W.; Heeren, J. und Niemeier, A. (2010). Apolipoprotein E-dependent inverse regulation of vertebral bone and adipose tissue mass in C57Bl/6 mice: Modulation by diet-induced obesity. *Bone* *47*, 736-45.

Bartelt, A.; Bruns, O.T.; Reimer, R.; Hohenberg, H.; Ittrich, H.; Peldschus, K.; Kaul, M.G.; Tromsdorf, U.I.; Weller, H.; Waurisch, C.; Eychmüller, A.; Gordts, P.L.; Rinninger, F.; Bruegelmann, K.; Freund, B.; Nielsen, P.; Merkel, M. und Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* Jan 23. [Epub ahead of print]

Beisiegel, U.; Weber, W.; Ihrke, G.; Herz, J. und Stanley, K. K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* *341*, 162-164.

Boucher, P.; Gotthardt, M.; Li, W. P.; Anderson, R. G. und Herz, J. (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* *300*, 329-332.

Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* *232*, 34-47.

Brown, M. S.; Kovanen, P. T. und Goldstein, J. L. (1981). Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* *212*, 628-635.

Brunham, L. R.; Kruit, J. K.; Pape, T. D.; Timmins, J. M.; Reuwer, A. Q.; Vasanji, Z.; Marsh, B. J.; Rodrigues, B.; Johnson, J. D.; Parks, J. S.; Verchere, C. B. und Hayden, M. R. (2007). Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat. Med.* *13*, 340-347.

- Cannon, B. und Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* **84**, 277-359.
- Cao, H.; Gerhold, K.; Mayers, J. R.; Wiest, M. M.; Watkins, S. M. und Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* **134**, 933-944.
- Christodoulides, C.; Lagathu, C.; Sethi, J. K. und Vidal-Puig, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol. Metab* **20**, 16-24.
- Clementi, A. H.; Gaudy, A. M.; van Rooijen, N.; Pierce, R. H. und Mooney, R. A. (2009). Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1062-1072.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480.
- Coll, A. P.; Farooqi, I. S. und O'Rahilly, S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell* **129**, 251-262.
- Cypess, A. M.; Lehman, S.; Williams, G.; Tal, I.; Rodman, D.; Goldfine, A. B.; Kuo, F. C.; Palmer, E. L.; Tseng, Y. H.; Doria, A.; Kolodny, G. M. und Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509-1517.
- Despres, J. P. und Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881-887.
- Di, M., V (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 438-455.
- Duan, H.; Lin, C. Y. und Mazzone, T. (1997). Degradation of macrophage ApoE in a nonlysosomal compartment. Regulation by sterols. *J. Biol. Chem.* **272**, 31156-31162.
- Elshourbagy, N. A.; Liao, W. S.; Mahley, R. W. und Taylor, J. M. (1985). Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 203-207.

- Enerback, S. (2010). Human brown adipose tissue. *Cell Metab* *11*, 248-252.
- Fabbrini, E.; Magkos, F.; Mohammed, B. S.; Pietka, T.; Abumrad, N. A.; Patterson, B. W.; Okunade, A. und Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 15430-15435.
- Farmer, S. R. (2009). Obesity: Be cool, lose weight. *Nature* *458*, 839-840.
- FOLCH, J.; ASCOLI, I.; LEES, M.; MEATH, J. A. und LeBARON, N. (1951). Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.* *191*, 833-841.
- Forman, B. M.; Tontonoz, P.; Chen, J.; Brun, R. P.; Spiegelman, B. M. und Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* *83*, 803-812.
- Gao, J.; Katagiri, H.; Ishigaki, Y.; Yamada, T.; Ogihara, T.; Imai, J.; Uno, K.; Hasegawa, Y.; Kanzaki, M.; Yamamoto, T. T.; Ishibashi, S. und Oka, Y. (2007). Involvement of apolipoprotein E in excess fat accumulation and insulin resistance. *Diabetes* *56*, 24-33.
- Gesta, S.; Tseng, Y. H. und Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* *131*, 242-256.
- Getz, G. S. und Reardon, C. A. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S156-S161.
- Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* *343*, 425-430.
- Greenow, K.; Pearce, N. J. und Ramji, D. P. (2005). The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* *83*, 329-342.
- Guilherme, A.; Virbasius, J. V.; Puri, V. und Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 367-377.
- Gusarova, V.; Seo, J.; Sullivan, M. L.; Watkins, S. C.; Brodsky, J. L. und Fisher, E. A. (2007). Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves

conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* **282**, 19453-19462.

Haemmerle, G.; Lass, A.; Zimmermann, R.; Gorkiewicz, G.; Meyer, C.; Rozman, J.; Heldmaier, G.; Maier, R.; Theussl, C.; Eder, S.; Kratky, D.; Wagner, E. F.; Klingenspor, M.; Hoefler, G. und Zechner, R. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* **312**, 734-737.

Hamilton, J. G. und Comai, K. (1988). Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica Sep-Pak columns. *Lipids* **23**, 1146-1149.

Harris, W. (2010). Omega-6 and omega-3 fatty acids: partners in prevention. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **13**, 125-129.

Hatters, D. M.; Peters-Libeu, C. A. und Weisgraber, K. H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 445-454.

Heeren, J.; Beisiegel, U. und Grewal, T. (2006). Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 442-448.

Heeren, J.; Grewal, T.; Jackle, S. und Beisiegel, U. (2001). Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 42333-42338.

Heeren, J.; Grewal, T.; Laatsch, A.; Rottke, D.; Rinninger, F.; Enrich, C. und Beisiegel, U. (2003). Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J. Biol. Chem.* **278**, 14370-14378.

Heeren, J.; Weber, W. und Beisiegel, U. (1999). Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 3)**, 349-359.

Herz, J. und Beffert, U. (2000). Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 51-58.

Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Gorgun, C. Z.; Uysal, K. T.; Maeda, K.; Karin, M. und Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336.

Hofmann, S. M.; Perez-Tilve, D.; Greer, T. M.; Coburn, B. A.; Grant, E.; Basford, J. E.; Tschop, M. H. und Hui, D. Y. (2008). Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes* *57*, 5-12.

Hossain, P.; Kavar, B. und El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N. Engl. J. Med.* *356*, 213-215.

Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* *444*, 860-867.

Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* *140*, 900-917.

Huang, Y. (2010). Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases. *Curr. Opin. Lipidol.*

Huang, Z. H.; Minshall, R. D. und Mazzone, T. (2009). Mechanism for endogenously expressed ApoE modulation of adipocyte very low density lipoprotein metabolism: role in endocytic and lipase-mediated metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* *284*, 31512-31522.

Huang, Z. H.; Reardon, C. A. und Mazzone, T. (2006). Endogenous ApoE expression modulates adipocyte triglyceride content and turnover. *Diabetes* *55*, 3394-3402.

Hussain, M. M.; Kancha, R. K.; Zhou, Z.; Luchoomun, J.; Zu, H. und Bakillah, A. (1996). Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim. Biophys. Acta* *1300*, 151-170.

Hwang, Y. C.; Jeong, I. K.; Ahn, K. J. und Chung, H. Y. (2009). The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res. Rev.* *25*, 768-772.

Ingalls, A. M.; Dickie, M. M. und Snell, G. D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* *41*, 317-318.

Iwabu, M.; Yamauchi, T.; Okada-Iwabu, M.; Sato, K.; Nakagawa, T.; Funata, M.; Yamaguchi, M.; Namiki, S.; Nakayama, R.; Tabata, M.; Ogata, H.; Kubota, N.; Takamoto, I.; Hayashi, Y. K.; Yamauchi, N.; Waki, H.; Fukayama, M.; Nishino, I.; Tokuyama, K.; Ueki, K.; Oike, Y.; Ishii, S.; Hirose, K.; Shimizu, T.; Touhara, K. und Kadowaki, T. (2010).

Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* **464**, 1313-1319.

Karagiannides, I.; Abdou, R.; Tzortzopoulou, A.; Voshol, P. J. und Kypreos, K. E. (2008). Apolipoprotein E predisposes to obesity and related metabolic dysfunctions in mice. *FEBS J.* **275**, 4796-4809.

Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* **4**, 341-348.

Kawamura, A.; Baitsch, D.; Telgmann, R.; Feuerborn, R.; Weissen-Plenz, G.; Hagedorn, C.; Saku, K.; Brand-Herrmann, S. M.; von Eckardstein, A.; Assmann, G. und Nofer, J. R. (2007). Apolipoprotein E interrupts interleukin-1beta signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1610-1617.

Kim, J. Y.; van de, W. E.; Laplante, M.; Azzara, A.; Trujillo, M. E.; Hofmann, S. M.; Schraw, T.; Durand, J. L.; Li, H.; Li, G.; Jelicks, L. A.; Mehler, M. F.; Hui, D. Y.; Deshaies, Y.; Shulman, G. I.; Schwartz, G. J. und Scherer, P. E. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest* **117**, 2621-2637.

Laatsch, A.; Merkel, M.; Talmud, P. J.; Grewal, T.; Beisiegel, U. und Heeren, J. (2009). Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* **204**, 105-111.

Laffitte, B. A.; Repa, J. J.; Joseph, S. B.; Wilpitz, D. C.; Kast, H. R.; Mangelsdorf, D. J. und Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 507-512.

Lee, N. K.; Sowa, H.; Hinoi, E.; Ferron, M.; Ahn, J. D.; Confavreux, C.; Dacquin, R.; Mee, P. J.; McKee, M. D.; Jung, D. Y.; Zhang, Z.; Kim, J. K.; Mauvais-Jarvis, F.; Ducy, P. und Karsenty, G. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* **130**, 456-469.

Lepage, G. und Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**, 114-120.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-874.

Linton, M. F.; Atkinson, J. B. und Fazio, S. (1995). Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* *267*, 1034-1037.

Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.

Lucas, M. und Mazzone, T. (1996). Cell surface proteoglycans modulate net synthesis and secretion of macrophage apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* *271*, 13454-13460.

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* *407*, 233-241.

Mahley, R. W.; Huang, Y. und Rall, S. C., Jr. (1999). Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J. Lipid Res.* *40*, 1933-1949.

Marken Lichtenbelt, W. D.; Vanhommerig, J. W.; Smulders, N. M.; Drossaerts, J. M.; Kemerink, G. J.; Bouvy, N. D.; Schrauwen, P. und Teule, G. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1500-1508.

Mazzone, T. (1996). Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Curr. Opin. Lipidol.* *7*, 303-307.

Mazzone, T.; Chait, A. und Plutzky, J. (2008). Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet* *371*, 1800-1809.

Mazzone, T.; Gump, H.; Diller, P. und Getz, G. S. (1987). Macrophage free cholesterol content regulates apolipoprotein E synthesis. *J. Biol. Chem.* *262*, 11657-11662.

Mazzone, T.; Pustelnikas, L. und Reardon, C. A. (1992). Post-translational regulation of macrophage apoprotein E production. *J. Biol. Chem.* *267*, 1081-1087.

Mensenkamp, A. R.; Havekes, L. M.; Romijn, J. A. und Kuipers, F. (2001). Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E. *J. Hepatol.* *35*, 816-822.

Moreno, J. A.; Perez-Jimenez, F.; Marin, C.; Perez-Martinez, P.; Moreno, R.; Gomez, P.; Jimenez-Gomez, Y.; Paniagua, J. A.; Lairon, D. und Lopez-Miranda, J. (2005). The

apolipoprotein E gene promoter (-219G/T) polymorphism determines insulin sensitivity in response to dietary fat in healthy young adults. *J. Nutr.* **135**, 2535-2540.

Niemeier, A.; Niedzielska, D.; Secer, R.; Schilling, A.; Merkel, M.; Enrich, C.; Rensen, P. C. und Heeren, J. (2008). Uptake of postprandial lipoproteins into bone in vivo: impact on osteoblast function. *Bone* **43**, 230-237.

Parfitt, A. M.; Drezner, M. K.; Glorieux, F. H.; Kanis, J. A.; Malluche, H.; Meunier, P. J.; Ott, S. M. und Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* **2**, 595-610.

Plump, A. S.; Smith, J. D.; Hayek, T.; Aalto-Setälä, K.; Walsh, A.; Verstuyft, J. G.; Rubin, E. M. und Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **71**, 343-353.

Prats-Puig, A.; Mas-Parareda, M.; Riera-Perez, E.; Gonzalez-Forcadell, D.; Mier, C.; Mallol-Guisset, M.; Diaz, M.; Bassols, J.; de Zegher, F.; Ibanez, L. und Lopez-Bermejo, A. (2010). Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children. *Diabetes Care* **33**, 661-663.

Prawitt, J.; Niemeier, A.; Kassem, M.; Beisiegel, U. und Heeren, J. (2008). Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* **314**, 814-824.

Rodbell, M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239**, 375-380.

Rohlfmann, A.; Gotthardt, M.; Hammer, R. E. und Herz, J. (1998). Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J. Clin. Invest* **101**, 689-695.

Rosen, C. J. und Bouxsein, M. L. (2006). Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 35-43.

Rosen, E. D. und MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885-896.

- Rosen, E. D. und Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* *444*, 847-853.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* *340*, 115-126.
- Ross, S. E.; Hemati, N.; Longo, K. A.; Bennett, C. N.; Lucas, P. C.; Erickson, R. L. und MacDougald, O. A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* *289*, 950-953.
- Schett, G.; Zwerina, J. und David, J. P. (2008). The role of Wnt proteins in arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* *4*, 473-480.
- Schilling, A. F.; Schinke, T.; Munch, C.; Gebauer, M.; Niemeier, A.; Priemel, M.; Streichert, T.; Rueger, J. M. und Amling, M. (2005). Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.* *20*, 274-282.
- Schoofs, M. W.; van der, K. M.; Hofman, A.; van Duijn, C. M.; Stricker, B. H.; Pols, H. A. und Uitterlinden, A. G. (2004). ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam study. *J. Bone Miner. Res.* *19*, 1490-1496.
- Schreyer, S. A.; Vick, C.; Lystig, T. C.; Mystkowski, P. und LeBoeuf, R. C. (2002). LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *282*, E207-E214.
- Segrest, J. P.; Jones, M. K.; De Loof, H. und Dashti, N. (2001). Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* *42*, 1346-1367.
- Shore, V. G. und Shore, B. (1973). Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* *12*, 502-507.
- Simonsen, J. L.; Rosada, C.; Serakinci, N.; Justesen, J.; Stenderup, K.; Rattan, S. I.; Jensen, T. G. und Kassem, M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* *20*, 592-596.
- Takada, I.; Kouzmenko, A. P. und Kato, S. (2009). Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *5*, 442-447.

- Terrand, J.; Bruban, V.; Zhou, L.; Gong, W.; El Asmar, Z.; May, P.; Zurhove, K.; Haffner, P.; Philippe, C.; Woldt, E.; Matz, R. L.; Gracia, C.; Metzger, D.; Auwerx, J.; Herz, J. und Boucher, P. (2009). LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* *284*, 381-388.
- Tilg, H. und Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 772-783.
- Tontonoz, P. und Spiegelman, B. M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 289-312.
- Van Gaal, L. F.; Mertens, I. L. und De Block, C. E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* *444*, 875-880.
- Virtanen, K. A.; Lidell, M. E.; Orava, J.; Heglind, M.; Westergren, R.; Niemi, T.; Taittonen, M.; Laine, J.; Savisto, N. J.; Enerback, S. und Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1518-1525.
- Weber, K.; Mock, U.; Petrowitz, B.; Bartsch, U. und Fehse, B. (2010). Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther.* *17*, 511-520.
- Williams, K. J. (2008). Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J. Clin. Invest* *118*, 3247-3259.
- Wilson, C.; Wardell, M. R.; Weisgraber, K. H.; Mahley, R. W. und Agard, D. A. (1991). Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* *252*, 1817-1822.
- Wilson, P. W.; Schaefer, E. J.; Larson, M. G. und Ordovas, J. M. (1996). Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 1250-1255.
- Yancey, P. G.; Yu, H.; Linton, M. F. und Fazio, S. (2007). A pathway-dependent on apoE, ApoAI, and ABCA1 determines formation of buoyant high-density lipoprotein by macrophage foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 1123-1131.
- Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* *13*, 791-801.

- Zannis, V. I.; McPherson, J.; Goldberger, G.; Karathanasis, S. K. und Breslow, J. L. (1984). Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* *259*, 5495-5499.
- Zechner, R.; Moser, R.; Newman, T. C.; Fried, S. K. und Breslow, J. L. (1991). Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *J. Biol. Chem.* *266*, 10583-10588.
- Zhang, S. H.; Reddick, R. L.; Piedrahita, J. A. und Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* *258*, 468-471.
- Zilberberg, A.; Yaniv, A. und Gazit, A. (2004). The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 17535-17542.
- Zimmermann, R.; Lass, A.; Haemmerle, G. und Zechner, R. (2009). Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* *1791*, 494-500.
- Zitzer, H.; Wentz, W.; Brenner, M. B.; Sewing, S.; Buschard, K.; Gromada, J. und Efanov, A. M. (2006). Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* *147*, 3898-3905.

8. Anhang

8.1.: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ApoAI	Apolipoprotein AI
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
BV	<i>bone volume</i>
bzw.	beziehungsweise
C/EBP α	<i>CAAT-enhancer binding protein alpha</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CE	Cholesterolester
CR	<i>chylomicron remnant</i>
CT	<i>Computed Tomography</i>
d.h.	das heißt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s modified eagle medium</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
epiWAT	<i>epididymal white adipose tissue</i>
ESEM	<i>enviromental scanning electron microscopy</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GC	Gaschromatographie
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HDL _E	HDL mit ApoE
HFD	Hochfettdiät
hMSC-TERT	<i>human mesenchymal stem cells engineered with telomerase reverse transcriptase</i>
HSPG	Heparansulfatproteoglykan

i.p.	intra-peritoneal
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IDL	<i>intermediate-density lipoprotein</i>
Il-1 β	<i>interleukin 1beta</i>
IL-6	<i>interleukin 6</i>
JNK	<i>c-Jun-terminal kinase</i>
KD	Kontrolldiät
KFR	Knochenformationsrate
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LRP1	<i>LDLR-related protein 1</i>
LRP5	<i>LDLR-related protein 5</i>
LRP6	<i>LDLR-related protein 6</i>
MCP1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NAFL	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NOb/BPm	<i>number of osteoblasts per bone perimeter</i>
NOc/BPm	<i>number of osteoclasts per bone perimeter</i>
ObS/BS	<i>osteoblast surface per bone surface</i>
OCN	Osteocalcin
OcS/BS	<i>osteoclast surface per bone surface</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PL	Phospholipide
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PS	<i>penicillin/streptomycin</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
subWAT	<i>subcutaneous white adipose tissue</i>
T2DM	Typ2 Diabetes Mellitus
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
Tb.N	<i>trabecular number</i>
Tb.Sp	<i>trabecular spacing</i>
Tb.Th	<i>trabecular thickness</i>
TNF α	<i>tumor necrosis-factor alpha</i>
TRL	<i>triglyceride-rich lipoprotein</i>
TV	<i>trabecular volume</i>
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i>
uOCN	untercarboxyliertes OCN
visWAT	<i>visceral white adipose tissue</i>
VLDL	<i>very low-density lipoprotein</i>
VLDL _E	VLDL mit ApoE
WAT	<i>white adipose tissue</i>
z.B.	zum Beispiel

8.2.: Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1.:	Modell eines Lipoproteins	1
Abb. 1.2.:	Postprandialer Lipoproteinstoffwechsel	3
Abb. 1.3.:	Struktur des Apolipoprotein E	5
Abb. 1.4.:	Entstehung eines atherosklerotischen Plaques	7
Abb. 1.5.:	Chronische Entzündung im weißen Fettgewebe	12
Abb. 1.6.:	Entstehung von Osteoclasten, Osteoblasten und Adipozyten	14
Abb. 1.7.:	Weißes und braunes Fettgewebe	16
Abb. 3.1.:	Gewichte der Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tiere im Verlauf der Fütterungsstudie	25
Abb. 3.2.:	Bestimmung der Körperkomposition in Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tiere nach HFD/KD-Fütterung mittels in vivo μ CT	26
Abb. 3.3.:	Leber- und Fettmasse in Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung – Vergleich zur Quantifizierung mittels μ CT	27
Abb. 3.4.:	Oraler Glukose- und Insulintoleranztest in Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	29
Abb. 3.5.:	Lipidakkumulation in der Leber von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	31
Abb. 3.6.:	Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern in der Leber von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	32
Abb. 3.7.:	Veränderung des Fettsäure-Profiles der Gesamtlipide in der Leber von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	33
Abb. 3.8.:	Veränderung des Fettsäure-Profiles der Phospholipide in der Leber von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	34
Abb. 3.9.:	Histologische Bestimmung der Adipozytengröße im weißen Fettgewebe von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	36
Abb. 3.10.:	Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern im weißen Fettgewebe von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	37
Abb. 3.11.:	Präparation von primären Adipozyten	39
Abb. 3.12.:	Differenzierungsschema für primären Adipozyten	40
Abb. 3.13.:	Lipidakkumulation nach Differenzierung von primären Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten in vitro	41

Abb. 3.14.:	Expressionsprofil von Adipozytengen in primären Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten	42
Abb. 3.15.:	Effekt von ApoE-Supplementation im Zellkulturmedium auf die Expression von Adipozytengen in primären Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten	43
Abb. 3.16.:	Effekt von VLDL _E -Supplementation im Zellkulturmedium auf die Expression von Adipozytengen in primären Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten	44
Abb. 3.17.:	Reaktion auf TNF α -Stimulation in primären Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Adipozyten	45
Abb. 3.18.:	Expression des ApoE-Gens in Abhängigkeit von Adipositas und BAT-Aktivität in Wild-Typ-Tieren	46
Abb. 3.19.:	Expressionsanalyse von Entzündungsmarkern im braunen Fettgewebe von Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	47
Abb. 3.20.:	Aufnahme von TRL in BAT von Wild-Typ und ApoE-defizienten Tieren	48
Abb. 3.21.:	Histologie des Knochens in Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	49
Abb. 3.22.:	Histologie des Knochens in Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung ff.	50
Abb. 3.23.:	Knochenformation in Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	50
Abb. 3.24.:	Bestimmung der Anzahl von Osteoblasten und Osteoclasten in Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	51
Abb. 3.25.:	Serumanalyse der Osteocalcin-Konzentration in Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	52
Abb. 3.26.:	Darstellung von Adipozyten im Knochenmark der Tibiae in Wild-Typ- und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	53
Tab. 1.:	Einteilung der Lipoprotein-Klassen nach Dichte	2
Tab. 2.:	Zusätze und Differenzierungsmedien	21
Tab. 3.:	Serumparameter in Wild-Typ und <i>ApoE</i> ^{-/-} -Tieren nach HFD/KD-Fütterung	28

8.3.: Chemikalien

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	(1/2)-9-16-26-45
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Ethanol	F	11	7-16
Formaldehyd	T	23/24/25-34-40-43	(1/2)-26-36/37/39-45-51
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	(2)-7-16-24/25-26
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Paraformaldehyd	Xn	20/22-36/37/38-40-43	22-26-36/37
Salzsäure	C	34-37	(1/2)-26-45
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	(2)-36/37-62

8.4.: verwendete Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge**Gefahrensymbole**

F	leichtentzündlich
T	giftig
Xn	gesundheitsschädlich
Xi	reizend
C	ätzend

Hinweise auf besondere Gefahren (R-Sätze)

R 11	Leichtentzündlich.
R 14	Reagiert heftig mit Wasser.
R 22	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
R 34	Verursacht Verätzungen.
R 36	Reizt die Augen.
R 37	Reizt die Atmungsorgane.
R 38	Reizt die Haut.
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
R 63	Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen.
R 65	Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

Kombination der R-Sätze

R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 48/20 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.

R 48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.

Sicherheitsratschläge

S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.

S 7 Behälter dicht verschlossen halten.

S 16 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.

S 22 Staub nicht einatmen.

S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden.

S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.

Kombination der S-Sätze

S 1/2 Unter Verschluss aufbewahren.

S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.

S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

8.5.: Danksagung

Für seine in jeder Hinsicht großartige Unterstützung während meiner Arbeit danke ich **Jörg Heeren** sowie allen Mitgliedern des IBMII, ins Besondere **Sandra Ehret, Birgit Henkel, Walter Tauscher, Dorte Wendt** und **Eva-Maria Azzizi**. Ohne sie, die nette Atmosphäre, die vielen Diskussionen und unzähligen kleinen Dinge am Rande wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Weiterhin danke ich **Andreas Niemeier, Timo Beil** und **Thorsten Schinke** für die Einführung in den Knochen und die Hilfe bei dessen Analyse. Ich bedanke mich bei **Ulrike Beisiegel** für die kleinen Hilfestellungen, die meine Arbeit möglich gemacht haben. Darüber hinaus danke ich herzlich **Christian Betzel** für seine Hilfsbereitschaft und Zeit. **Ludger Scheja** hat mir den Weg zum braunen Fett und anderen Menschen gezeigt, **Klaus Tödter** und **Kerstin Röser** haben mich ebenfalls unterstützt.

Mein spezieller Dank gilt **Oliver Bruns** für viele gemeinsam im Labor verbrachte Stunden, die mich in vielerlei Hinsicht bereichert haben (und für seine Spende an das Labor) und **Christine Runge**, auf die man sich immer verlassen kann. Auch **Dorothee Lasrich, Britta Hoffzimmer, Karoline Brügelmann, Leah Eissing** und **Janne Prawitt** sei an dieser Stelle gedankt.

Ebenso geht mein Dank an die **Schering Stiftung** für die Bereitstellung von Personal- und Reisemitteln.

Zuletzt gilt mein ganzer Dank und Stolz auch meiner Familie **Martha, Pablo** und **Jette**, die es mit mir aushalten mussten und mich trotzdem unterstützt haben.

Vielen Dank, ihr seid spitze!

8.6.: Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Alexander Bartelt, geb. 13 September 1982

Eppendorfer Marktplatz 19

20251 Hamburg

Tel.: 040/43183201

E-mail: abartelt@uke.uni-hamburg.de

Frau: Jette Gustafsson, geb. 19 Oktober 1983, Juristin

Kinder: Pablo Gustafsson, geb. 27 April 2005

Martha Gustafsson, geb. 2 November 2008



Bildung

2002-2006 Studium der Biochemie und Molekularbiologie mit den Nebenfächern Immunologie, Tumor- und Neurobiologie und dem Schwerpunkt Molekulare Medizin an der Universität Hamburg (1.0)

2007 Diplom-Arbeit am IBMII: Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bei Prof. Dr. Dr. Beisiegel mit dem Titel Analyse des Lipoproteinstoffwechsels in Hepatoma-Zellen (1.0)

2010 Promotion am IBMII: Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bei PD Dr. Heeren mit dem Titel Rolle des Apolipoprotein E in der Entstehung der Insulinresistenz (summa cum laude)

Auszeichnungen

2007 Diplom-Preis des Freundes- and Förderverein der Chemie e.V. und Universität Hamburg für das beste Diplom des Department Chemie 2007

2007 Diplom-Preis der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. für das beste Diplom in den Lebenswissenschaften 2007

2008 Promotionsstipendium der Schering Stiftung

2009 Young Investigator Award der International Atherosclerosis Society Boston, MA, USA

2010 New Investigator Award der International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) Maastricht, NL

Eingeladene Vorträge

- 2010** A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue, Institute of Metabolic Sciences, MRL, University of Cambridge, UK; host: Prof. A. Vidal-Puig

Vorträge auf internationalen Konferenzen

- 2009** International Symposium on Atherosclerosis 2009 Boston, MA, USA
2010 9th Conference of ISSFAL 2010 Maastricht, NL
2010 European Atherosclerosis Society Congress 2010 Hamburg, GER
2010 European Lipoprotein Club 2010 Tutzing, GER

Poster auf internationalen Konferenzen

- 2007** 58. Mosbacher Kolloquium der GBM: Protein and Lipid Sorting in Health and Disease, Mosbach, GER
2007 76. EAS Congress, Helsinki, FIN
2007 Herbsttagung der GBM: Signal Transduktion in Health and Disease, Hamburg, GER
2007 XV. Lipid Meeting, Leipzig, GER
2008 59. Mosbacher Kolloquium der GBM: Epigenetics - Molecular Principles and Mechanisms, Mosbach, GER
2009 XVI. Lipid Meeting, Leipzig, GER
2010 61. Mosbacher Kolloquium der GBM: Biology of Ageing, Mosbach, GER
2010 1st International Symposium of GRK 1459: Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg, GER

Wissenschaftliche Publikationen

- 2010** **Bartelt A**, Beil FT, Schinke T, Roeser K, Ruether W, Heeren J, Niemeier A.; Apolipoprotein E-dependent inverse Regulation of Vertebral Bone and Adipose Tissue Mass in C57Bl/6 Mice: Modulation by Diet-Induced Obesity, **Bone**. 2010 Oct;47(4):736-45. Epub 2010 Jul 12.
2010 Prawitt J, Beil FT, Marshall RP, **Bartelt A**, Ruether W, Heeren J, Amling M, Staels B, Niemeier A.; Short-term activation of liver X receptors inhibits osteoblasts but long-term activation does not have an impact on murine bone in vivo, **Bone**. 2011 Feb 1;48(2):339-46. Epub 2010 Sep 15.
2011 Cuchet D, Sykes A, Nicolas A, Orr A, Murray J, Sirma H, Heeren J, **Bartelt A**, Everett RD.; PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication, **J Cell Sci**. 2011 Jan 15;124(Pt 2):280-91. Epub 2010 Dec 20.

2011 **Bartelt A**, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gordts PLSM, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J.; Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance, **Nat Med.** 2011 Jan 23. [Epub ahead of print]

Referenzen auf Nachfrage erhältlich

Hamburg, 24.01.11

Alexander Bartelt

8.7.: Wissenschaftliche Publikationen, die aus der Promotion hervorgegangen sind

- 2010** **Bartelt A**, Beil FT, Schinke T, Roeser K, Ruether W, Heeren J, Niemeier A.; Apolipoprotein E-dependent inverse Regulation of Vertebral Bone and Adipose Tissue Mass in C57Bl/6 Mice: Modulation by Diet-Induced Obesity, **Bone**. 2010 Oct;47(4):736-45. Epub 2010 Jul 12.
- 2011** **Bartelt A**, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gordts PLSM, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance, **Nat Med**. 2011 Jan 23. [Epub ahead of print]

8.8.: Wissenschaftliche Manuskripte, die aus der Promotion hervorgegangen sind

- 2011** **Bartelt A**, Orlando P, Mele C, Ligresti A, Toedter K, Scheja L, Heeren J and Di Marzo V.; High-fat diet-induced endocannabinoid tone is dependent on apoE expression: relevance for adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance, **in Revision**

8.9.: Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 24.01.2011

Alexander Bartelt