

# **Organ-spezifische Funktion des Adaptorproteins PID1 für den postprandialen Energiestoffwechsel**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im  
Fachbereich Biologie, Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Lucia M. Krott**  
aus Hamburg

Hamburg 2016

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2013 bis Mai 2016 im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Heeren angefertigt. Prof. Dr. Kathrin Dausmann betreute diese Arbeit im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Jörg Heeren
2. Gutachter/in: Prof. Dr. Kathrin Dausmann

Datum der Disputation: 15. Juli 2016

## Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Postprandialer Energiestoffwechsel .....	1
1.1.1 Postprandialer Glukose-Stoffwechsel .....	1
1.1.2 Postprandialer Lipid-Stoffwechsel.....	2
1.1.2.1 Morphologie und Funktion der Fettgewebe .....	4
1.1.2.2 Einfluss des Endocannabinoid (EC) System auf die Fettgewebe .....	6
1.2 Bedeutung von LDL-Rezeptor (LDLR) Familie für den Energiestoffwechsel.....	7
1.2.1 Aufbau und Funktion der Lipoproteine .....	7
1.2.1.1 Endogener Lipidmetabolismus .....	8
1.2.1.2 Reverser Cholesterin Transport (RCT).....	9
1.2.2 Mitglieder der LDLR Familie .....	9
1.2.2.1 Bedeutung vom LDLR.....	10
1.2.2.2 Bedeutung vom LDLR-related protein 1 (LRP1).....	11
1.2.3 Regulation durch PTB Adaptorproteine .....	12
1.2.3.1 LDLR und ARH .....	14
1.2.3.2 LRP1 und <i>phosphotyrosine interacting domain containing 1</i> (PID1).....	14
1.3 Pathophysiologie.....	15
1.3.1. Diabetes: Ausmaß und Entstehung .....	15
1.3.1.1 Bedeutung von LRP1 für Typ 2 Diabetes .....	16
1.3.2 Atherosklerose: Ausmaß und Entstehung.....	16
3.2.2.1 Bedeutung von LRP1 für Atherosklerose .....	18
2 FRAGESTELLUNG .....	19
3 MATERIAL UND METHODEN .....	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Arbeitsgeräte .....	22
3.1.2 Chemikalien.....	23
3.1.3 Gebrauchsmaterial .....	24
3.1.4 Kits und Reagenzien .....	25

## Inhaltsverzeichnis

3.1.5 Medien, Puffer und Lösungen.....	26
3.1.6 Verwendete Antikörper .....	28
Tabelle 3.1.6.1: Primäre Antikörper.....	28
Tabelle 3.1.6.2: Sekundäre Antikörper .....	29
3.1.7 Verwendete TaqMan® Sonden.....	29
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Protein-Bestimmung mittels Lowry .....	29
3.2.1.1 SDS-PAGE .....	29
3.2.1.2 Western Blot .....	30
3.2.1.3 Indirekte Immunodetektion .....	30
3.2.2 Radioaktive Markierungen .....	30
3.2.2.1 <sup>125</sup> I- Markierung von Triglyzerid-reichen Lipoprotein <i>Remnants</i> (TRLR) .....	30
3.2.2.2 Radioaktive Markierung von Glukose und Fettsäuren .....	31
3.2.3 Lipoprotein-Isolation aus Plasmen mittels Ultrazentrifugation .....	31
3.2.4 Lipoproteinprofil-Bestimmung mittels FPLC .....	31
3.2.5 Triglyzerid- und Cholesterin-Bestimmung .....	32
3.2.6 Freie Fettsäuren (FFA)-Bestimmung .....	32
3.2.7 RNA Isolierung aus Gewebe und Zellen .....	32
3.2.8 Umschreibung mRNA in cDNA mittels RT-PCR.....	33
3.2.9 Quantitative <i>Realtime</i> PCR.....	33
3.2.10 Mausmodelle: Gewebespezifische PID1 <i>knockout</i> Mäuse .....	33
3.2.10.1 Generierung LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäuse .....	34
3.2.10.2 Genotypisierung mittels PCR .....	35
3.2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	36
3.2.11 Zellbiologische Methoden .....	37
3.2.11.1 Differenzierung <i>stromal vascular fraction</i> (SVF) Zellen zu primären braunen Adipozyten.....	37
3.2.11.2 Trennung der SVF Zellen von reifen Adipozyten .....	37
3.2.11.3 Zell-Stimulation mit CL316,243 .....	38
3.2.11.4 Zell-Stimulation mit Insulin .....	38

## Inhaltsverzeichnis

3.2.11.5 Indirekte Immunfluoreszenz .....	38
3.2.11.6 Isolierung primärer Hepatozyten .....	38
3.2.11.7 Endozytose-Experiment von <sup>125</sup> Iod-markierten TRLR.....	39
3.2.12 Metabolische Analysen.....	39
3.2.12.1 Oraler Glukose-Toleranztest (OGTT).....	39
3.2.12.2 Oraler Fett-Toleranztest (OFTT).....	40
3.2.12.3 Organ-Aufnahme radioaktiv markierter Glukose und Fettsäuren .....	40
3.2.12.4 Intravital Mikroskopie .....	40
3.2.12.5 <i>Western Type</i> Diät Studie .....	41
3.2.12.6 Atherosklerose-Studien.....	41
3.2.13 Tierhaltung .....	42
3.2.14 Statistik.....	42
4 ERGEBNISSE .....	43
4.1 Fettgewebe-spezifische PID1 <i>knockout</i> Mäuse.....	43
4.1.1 <i>In vitro</i> Differenzierung der SVF aus dem iBAT zu primären braunen Adipozyten	43
4.1.1.1 Charakterisierung der primären braunen Adipozyten anhand akuter CL-316,243 Stimulation.....	44
4.1.2 Einfluss der BAT Aktivierung auf EC Rezeptor Genexpression <i>in vivo</i> .....	45
4.1.3 Insulin-Stimulation primärer brauner Adipozyten von wt und PID1 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	47
4.1.4 Glut4, LRP1 und PID1 Nachweis in SVF und reifen Adipozyten von Fettgewebe- spezifischen PID1 <i>knockout</i> Mäusen.....	48
4.1.5 OGTT und postprandiale <sup>3</sup> H-Deoxyglukose-Aufnahme mit Fettgewebe-spezifischen PID1 <i>knockout</i> Mäusen .....	49
4.2 Leber-spezifische PID1 <i>knockout</i> Mäuse .....	50
4.2.1 Nachweis von LRP1 in Lebern von LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäusen, <sup>-/+</sup> Insulin.....	51
4.2.2. LRP1 und PID1-abhängige Aufnahme von TRLR in primäre Hepatozyten.....	52
4.2.2.1 <sup>125</sup> I-TRLR-Aufnahme Abhängigkeit von LRP1 .....	52
4.2.2.2 <sup>125</sup> I-TRLR-Aufnahme in primäre Hepatozyten in Abhängigkeit von PID1 .....	53
4.2.3 Plasmalipide der LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäuse.....	54

## Inhaltsverzeichnis

4.2.3.1 Plasmalipide LDLR <i>knockout</i> Weibchen mit einem heterogenen Leber-spezifischen PID1 <i>knockout</i> (LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>+/-d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> ) .....	54
4.2.3.2 Plasmalipide weiblicher LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäuse .....	55
4.2.3.3 Plasmalipide männlicher LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäuse.....	56
4.2.4 Western-Type Diät Studie mit LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäusen .....	57
4.2.4.1 Plasmalipide weiblicher LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäuse nach WTD58	
4.2.4.2 Plasmalipide männlicher LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäuse nach WTD .....	59
4.2.4.3 Leberlipide LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäuse nach WTD .....	60
4.2.5 Atherosklerosestudien mit weiblichen WTD gefütterten LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Mäusen .....	61
4.2.6 OFTT mit LDLR <sup>-/-</sup> PID1 <sup>d/d</sup> flox Albumin cre <sup>-/+</sup> Männchen.....	64
5 DISKUSSION .....	66
5.1 Die <i>feedback</i> Regulation der BAT Aktivierung über das EC System .....	66
5.2 Rolle von PID1 für die Glut4 Lokalisation und Glukose-Aufnahme im Fettgewebe .....	67
5.3 Die Rolle von PID1 für die LRP1 vermittelte Lipoprotein-Aufnahme .....	70
5.3.1 „ <i>shedding</i> “ Hypothese .....	77
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	79
6.1 Summary .....	80
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	81
8 DANKSAGUNG .....	90
9 ANHANG .....	91
9.1 Abkürzungsverzeichnis .....	91
9.2 Gefahrenstoffe .....	95
9.3 Publikation: „ <i>Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation</i> “ .....	98
Eidesstattliche Versicherung .....	

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Postprandialer Energiestoffwechsel

Der postprandiale Stoffwechsel beschreibt die Prozessierung von Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen nach deren Aufnahme aus der Nahrung. Die koordinierte Regulation dieser Stoffwechselwege in den verschiedenen beteiligten Organen wird insbesondere durch das anabol wirkende Hormon Insulin bewerkstelligt.

#### 1.1.1 Postprandialer Glukose-Stoffwechsel

Nach der Nahrungsaufnahme (postprandial) werden die Kohlenhydrate und Mehrfachzucker, wie z.B. das Disaccharid Saccharose von intestinalen  $\alpha$ -Glukosidasen im Jejunum zu Einfachzuckern wie Glukose und Fruktose abgebaut. Die Glukose wird daraufhin über einen aktiven Transport mittels der  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase sodium-glucose cotransporters}$  (SGLT-1) in die Enterozyten aufgenommen. Ein Teil der Glukose wird als Energieträger in den Enterozyten zu Laktat verstoffwechselt und als solches an die Pfortader abgegeben, der Großteil wird jedoch an der basolateralen Seite über den Glukosetransporter Glut2 in die Zirkulation freigesetzt (Lefebvre and Scheen, 1999). Nachfolgend wird Glukose-abhängig in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas das anabole Hormon Insulin ausgeschüttet, welches Glukose-senkend wirkt und der postprandialen Hyperglykämie entgegenwirkt (Poloz and Stambolic, 2015), sodass postprandial sowohl eine Hyperglykämie als auch eine Hyperinsulinämie im Serum vorliegt. Um dem Blutzucker-Anstieg entgegenzuwirken, nimmt, neben dem Fettgewebe und dem Muskel, auch die Leber vermehrt Glukose via Glut2 auf und speichert sie zunächst in Form von Glykogen (Moore et al., 2012). Zusätzlich wird die endogene Glukose-Synthese, die s.g. Glukoneogenese, in den Hepatozyten gesenkt, indem die hepatische Wirkung des katabol-wirkenden Hormons Glukagon durch Insulin abgeschaltet wird (Chen et al., 1999). Insulin inhibiert die Lipolyse im Fettgewebe und stimuliert gleichzeitig die Aufnahme freier Fettsäuren in die peripheren Gewebe. Viele Säugetier-Zellen haben einen konstant hohen Glukosebedarf und deswegen Glukosetransporter, die konstitutiv in der Plasmamembran vorhanden sind (Glut1- 3). Die metabolisch aktiven Gewebe wie Fettgewebe und Muskel produzieren, neben Glut1, den Glukosetransporter Glut4, welcher Insulin-vermittelt zu einer schnellen und vermehrten Glukose-Aufnahme führt. Dies ist ein physiologisch hochrelevanter Prozess, da Beeinträchtigungen in diesem Ablauf die Bildung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes (T2D) beeinflussen (Bryant et al., 2002). Basal ist Glut4 perinuklear in sogenannten *Glut4 storage vesicles* (GVS) lokalisiert, die noch weitere Proteine wie die *insulin-responsive aminopeptidase* (IRAP) und den *sorting* Rezeptor Sortillin, aber auch das *LDL-receptor related protein1* (LRP1) enthalten (Jedrychowski et al., 2010). Die postprandiale Insulin-Stimulation führt zu der Translokation von Glut4 an die Plasmamembran, und führt zu einer vermehrten Glukose-Aufnahme. Insulin führt, nach der Bindung des Hormones an den Insulin-Rezeptor

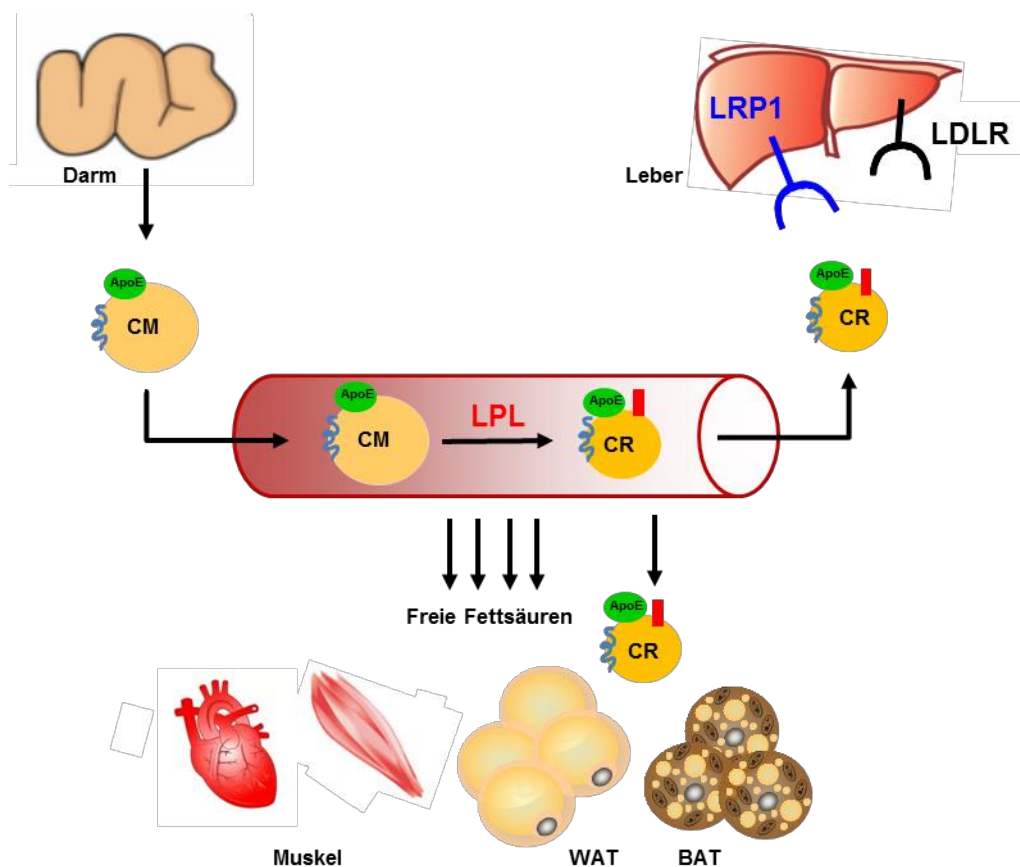
(IR) in der Plasmamembran, zu einer Signalkaskade und damit zu einer Aktivierung der *3-phosphoinositide kinase* (PDK1) durch *das insulin receptor substrate* (IRS), welches an die intrazelluläre Domäne des Insulin-Rezeptors bindet. Die PDK1 phosphoryliert und aktiviert daraufhin die Proteinkinase B bzw. AKT, welche im weiteren Verlauf das *Rab GTPase-activating protein* (GAP) AS160 via Phosphorylierung aktiviert und somit die Translokation von Glut4 induziert (Poloz and Stambolic, 2015). Die Glut4 vermittelte Glukose-Aufnahme ins Fettgewebe führt unter anderem zu der Bildung des Glukose-responsiven und lipogen-wirkenden Transkriptionsfaktors ChREBP $\beta$ , sodass die ChREBP $\beta$  Expression ein Indikator für Insulinsensitivität und Glukose-Homöostase darstellt. Im Fettgewebe reguliert ChREBP $\beta$  die Glykolyse und die *de novo lipogenesis* (DNL). Bei der DNL wird überschüssige Glukose bzw. dessen Abbauprodukt Acetyl-CoA über Citrat in Fettsäuren umgewandelt und letztendlich in Form von Triglyzeriden in den Lipid *droplets* der Adipozyten gespeichert. Die zwei zentralen Enzyme der DNL sind die Acetyl-CoA Carboxylase und die Fettsäure Synthase (Fasn), jedoch sind noch weitere Enzyme sowie *fatty acid elongase 6* (Elovl6), oder *Stearoyl-CoA desaturase* (Scd1) involviert (Herman et al., 2012).

### 1.1.2 Postprandialer Lipid-Stoffwechsel

Der postprandiale Lipid-Stoffwechsel beschreibt den exogenen Transport der Nahrungslipide im Organismus. Die Lipide werden zunächst im Dünndarm durch Gallensäuren in Mizellen emulgiert, bevor sie mittels Lipasen und Esterasen gespalten werden. Die entstandenen Monomere (Monoglyzeride, Fettsäuren) werden über Fettsäuretransporter wie CD36 und *fatty acid transport protein* (FATP) aufgenommen (Iqbal and Hussain, 2009), während Cholesterin über das *Niemann-Pick C1-like protein 1* (NPC1L1) in die Epithelzellen der Darmmukosa transportiert wird (Wang and Song, 2012). In den Enterozyten werden die aufgenommenen Lipide zu Cholesterylestern, Triglyzeriden und Phospholipiden verestert. Zusammen mit dem Strukturprotein Apolipoprotein (Apo) B48 werden diese komplexen Lipide mit Hilfe des *microsomal transfer protein* (MTP) zu Chylomikronen (CM) verpackt und über die Lymphe und den Duktus thoracicus in den Blutkreislauf abgeben. In der Blutzirkulation werden den CM weitere Apolipoproteine, wie ApoE und ApoC2, von *high density* Lipoprotein (HDL) übertragen. Die Anwesenheit von ApoC2 aktiviert die Lipoprotein-Lipase (LPL), welche an der Endotheloberfläche von Fett- und Muskelgewebe gebunden ist. Die LPL hydrolysiert die Triglyzeride der CM und verbleibt als strukturelle Komponente der Lipoproteine an den Partikeln, um die spätere Aufnahme in die Leber zu vermitteln (Heeren et al., 2002). Durch die LPL vermittelte Hydrolyse werden die peripheren Organe mit freien Fettsäuren (FFA) versorgt und die CM zu weniger Triglyzerid-reichen Chylomikronen *Remnant* (CR) Partikeln abgebaut (Daniels et al., 2009). Die Aufnahme der freien Fettsäuren ins Fett- und Muskelgewebe erfolgt über Transmembran Rezeptoren wie CD36 (Pepino et al., 2014). Durch den Verlust der



Triglyzeride sind die CR nun mit ApoE angereichert und werden über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Leber aufgenommen. Zunächst gelangen die Partikel über die Sinusoide durch das fenestrierte Endothel in den sogenannten *Space of Dissé* der Leber. Nach weiterer Prozessierung durch die hepatische Lipase (HL) (Mahley and Huang, 2007) interagieren ApoE und LPL mit den Lipoprotein-Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie (Daniels et al., 2009) (Heeren et al., 2002), oder Heparansulfat Proteoglykanan (HSPG) (Foley, 2013) und führen damit zur Rezeptor vermittelten Endozytose der CR. Zudem konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass postprandiale Partikel auch vom braunen (Bartelt et al., 2011) und weißen (Schlein et al., 2016) Fettgewebe aufgenommen werden können. Der postprandiale Lipid-Stoffwechsel ist in der folgenden Abbildung 1.1.2 zusammengefasst.



**Abb.1.1.2 Schematische Darstellung des postprandialen Lipid-Stoffwechsels**

Die CM werden im Darm gebildet und in die Zirkulation abgegeben. In der Peripherie werden die Triglyzeride der CM von der Endothel-ständigen Lipoprotein Lipase (LPL) hydrolysiert, sodass freie Fettsäuren an die Muskel- und Fettgewebe als Energiezufuhr abgegeben werden und sich die CM zu weniger Triglyzerid-reichen CR umwandeln. Die LPL verbleibt auf den CR und vermittelt, zusammen mit ApoE, die Aufnahme der CR in die Leber. Dabei erkennt LRP1 die LPL und ApoE, während der LDLR nur ApoE erkennt. In speziellen Stoffwechselsituationen können die CR Partikel zusätzlich auch von den Zellen des braunen und weißen Fettgewebes aufgenommen werden.

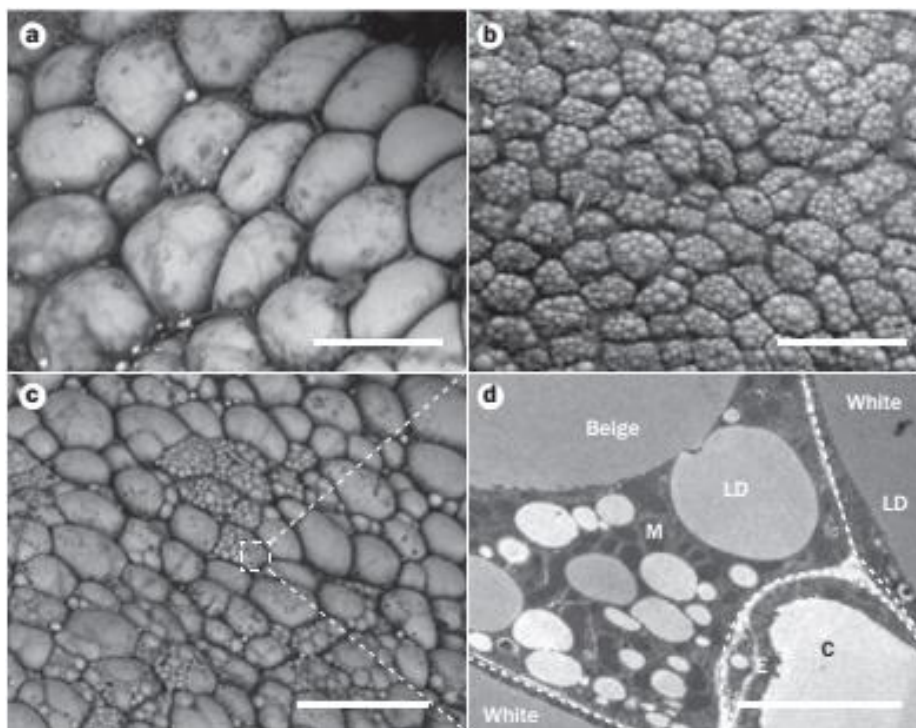
### 1.1.2.1 Morphologie und Funktion der Fettgewebe

Säugetiere besitzen weißes und braunes Fettgewebe, welches sich in Funktion und Aufbau, aber auch in seinen Vorläuferzellen voneinander unterscheidet (Seale et al., 2008). Das klassische weiße Fettgewebe (WAT) nimmt freie Fettsäuren direkt (Goldberg et al., 2009) oder über Triglyzerid-reichen Lipoproteine (TRL), wie z.B. den CM (Schlein et al., 2016), auf und speichert sie in Form von Triglyzeriden. Auf Grund der Speicherfunktion haben weiße Fettzellen einen großen Lipid *droplet*, wenig Mitochondrien und einen peripher lokalisierten Zellkern. Im Unterschied zu weißen Adipozyten dienen klassische braune Fettzellen der Energiegewinnung und besitzen deswegen multilokuläre Lipid *droplets* und eine hohe Mitochondrien-Dichte. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur werden die ins braune Fettgewebe (BAT) aufgenommenen Fettsäuren genutzt, um Wärmeenergie zu erzeugen. Dieser Prozess nennt sich adaptive Thermogenese und wird durch Kälte induziert (Cannon and Nedergaard, 2004). Essentiell für die Thermogenese und spezifisch für das braune Fett ist das *uncoupling protein 1* (Ucp-1), welches in der Mitochondrienmembran der braunen Adipozyten lokalisiert ist. Durch Kälte-Exposition wird Noradrenalin im sympathischen Nervensystem freigesetzt, das daraufhin die  $\beta$ 3-Rezeptoren der braunen Fettzellen aktiviert. Analog dazu kann der  $\beta$ 3-spezifische Agonist CL316,243 (CL) verwendet werden, welcher ebenfalls zu BAT Aktivierung führt (Cannon and Nedergaard, 2004; Krott et al., 2016). Die extrazelluläre Stimulation der G-Protein gekoppelten  $\beta$ 3-Rezeptorens aktiviert intrazellulär die Adenylatzyklase, welche die Bildung vom zyklischen AMP (cAMP) aus ATP induziert. Der cAMP-Anstieg führt zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits das *cAMP response element binding protein* (CREB) phosphoryliert (Thonberg et al., 2002) und den *p38 mitogen-activated-protein kinase* (p38 MAPK) Signalweg induziert. Als Folge dessen erfolgt die Transkription nuklearer Faktoren wie z.B. dem *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$*  (Pgc1 $\alpha$ ), um die mitochondriale Biogenese und die Ucp-1 Expression zu erhöhen (Cao et al., 2004). Im Weiteren wird die *hormone sensitive lipase* (HSL) durch die PKA phosphoryliert und verursacht daraufhin die Lipolyse der Triglyzeride aus den Lipidtropfen. Die dadurch freigesetzten freien Fettsäuren aktivieren einerseits Ucp-1 und dienen andererseits der Atmungskette als Substrat. Die Verbrennung der Fettsäuren in der Atmungskette führt zu einem Konzentrationsunterschied der Protonen zwischen Intermembranraum und der Mitochondrien-Matrix. In den braunen Adipozyten wird die Energie des Protonengradientens nicht für die ATP Synthese verwendet, sondern mittels Ucp-1, einem H<sup>+</sup>-Transporter, entkoppelt und in Wärme umgewandelt. In Folge wird ein Großteil der Nahrung und der O<sub>2</sub> Menge aus dem Blut ins braune Fett aufgenommen und verbrannt, um mehr Wärme zu erzeugen (Cannon and Nedergaard, 2004).

Neben Pgc1 $\alpha$  und Ucp-1 gibt es noch weitere BAT Aktivierungsmarker. Dazu gehört z.B. die Deiodinase2 (Dio2), welche Thyroxin (T4) zu Trijodthyronin (T3) umwandelt und ebenfalls über

den p38MAPK Weg induziert wird (Martinez-deMena and Obregon, 2005). Oder auch die *fatty acid elongase 3* (Elovl3), mit der Funktion, gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren von C20-C24 zu verlängern. Elovl3 wird ebenfalls durch Kälte im BAT hochreguliert und scheint eine Rolle in der Triglyzerid Formation und frühen Bildung der Lipidtropfen zu spielen (Jorgensen et al., 2007).

In kleinen Nagetieren und Säuglingen war braunes Fett und dessen metabolische Bedeutung schon länger bekannt, neues Interesse erlangte es aber durch dessen Nachweis im erwachsenen Menschen anhand von *positron emission tomography* (PET) (Nedergaard et al., 2007) (van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Weitere Untersuchungen zeigten, dass ein Großteil des braunen Fetts im erwachsenen Menschen nicht dem klassischen braunen Adipozyten entspricht, sondern die Gensignatur von beigen Adipozyten aufweist (Sharp et al., 2012). Beige Fettzellen sind ebenfalls Kälte- oder CL-induziert, exprimieren auch Ucp-1 und ähneln dem braunen Fett in Funktion und Morphologie. Interessanterweise werden beige Fettzellen jedoch in weißen Fettgeweben gebildet, durch s.g. *browning*. Das inguinale bzw. das subkutane weiße Fettdepot (subWAT) ist in Mäusen am meisten untersucht und hat, aufgrund der Größe, die höchste Kapazität beige Fettzellen hervorzubringen (Rosenwald et al., 2013). Zum einen können die beigen Adipozyten im weißen Fett aus Vorläuferzellen via *de novo* Differenzierung entstehen (Wang et al., 2013), zum anderen aus der Transdifferenzierung von weißen zu beigen Adipozyten (Rosenwald et al., 2013). Letzteres erfolgt bi-direktional, da durch Wärme-Adaption auch ein „*whitening*“ der beigen Adipozyten stattfinden kann (Rosenwald et al., 2013). In der folgenden Abbildung 1.1.2.1. sind die morphologischen Charakteristika von weißen, beigen und braunen Adipozyten gezeigt.



**Abb.1.1.2.1 Elektronenmikroskopie-Bilder zeigen die morphologischen Merkmale der verschiedenen Fettgewebe.**

A. Weiße Adipozyten aus dem subWAT. B. Braune Adipozyten aus dem iBAT. C. Beige Adipozyten im WAT. D. Die vergrößerte Aufnahme der beige Fettzelle zeigt eine erhöhte Mitochondrien Dichte. Bild adaptiert nach (Bartelt and Heeren, 2014)

### 1.1.2.2 Einfluss des Endocannabinoid (EC) System auf die Fettgewebe

Das Endocannabinoid (EC) System spielt sowohl über die Appetitkontrolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme als auch über die Regulation des Energieverbrauchs eine bedeutende Rolle im Energiemetabolismus. Das System besteht aus den EC Rezeptoren (CB1/Cnr1, CB2/Cnr2), den endogenen Lipid-Liganden (AEA, 2-AG) und dessen Synthese- und Degradations-Enzymen. Vor allem die zentrale, aber auch die lokale Regulation des EC Systems in den peripheren Geweben ist für dessen Funktion entscheidend (Silvestri and Di Marzo, 2013) (Matias et al., 2006).

Bei übergewichtigen oder hyperglykämischen T2D Patienten ist ein überaktives EC System im viszeralen Fettdepot und Serum nachzuweisen (Matias et al., 2006). Zudem korrelieren in *diet-induced obesity* (DIO) Mäusen erhöhte Endocannabinoid Level mit vermehrter Fett-Akkumulation und Insulinresistenz (Silvestri and Di Marzo, 2013). Die chronische Behandlung von DIO-Mäusen mit dem CB1 Antagonisten SR141716 erhöht die Insulin-vermittelte Glukose-Aufnahme, die BAT Thermogenese und den Energieverbrauch, was eine Reduktion des Körpergewichts zur Folge hat (Bajzer et al., 2011). Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren sind CB1<sup>-/-</sup> Mäuse schlanker, zeichnen sich durch weniger Fettmasse aus und sind resistent gegenüber DIO (Boon et al., 2014). Neben dem zentralen Nervensystem ist CB1 auch in den Fettgeweben exprimiert und wird während der Adipogenese hochreguliert. Zellkulturstudien

belegen einen direkten Einfluss des EC Systems auf Fettzellen. Auf Signalwegebene führt die Aktivierung von CB1 in Adipozyten intrazellulär zur Inhibierung der Adenylatzyklase und senkt damit die cAMP Level (Perwitz et al., 2010). Die Stimulation des CB1 Rezeptors in braunen Fettzellen senkt Adiponektin-Level und inhibiert die Thermogenese (Perwitz et al., 2006). Hingegen führt die Blockade von CB1 in braunen Fettzellen zu einem Anstieg der Ucp-1-Proteinmenge, vermehrter Wärmeproduktion durch Entkopplung und induziert die Lipolyse via cAMP/PKA *signalling* (Boon et al., 2014). In weißen Fettzellen verursacht die Inhibition von CB1 mit dem selektiven Agonisten Rimonabant eine Transdifferenzierung von weißen zu beige Fettzellen. Dabei steigt der CB1 Gehalt kompensatorisch und konzentrationsabhängig zur Agonisten-Konzentration (Perwitz et al., 2010).

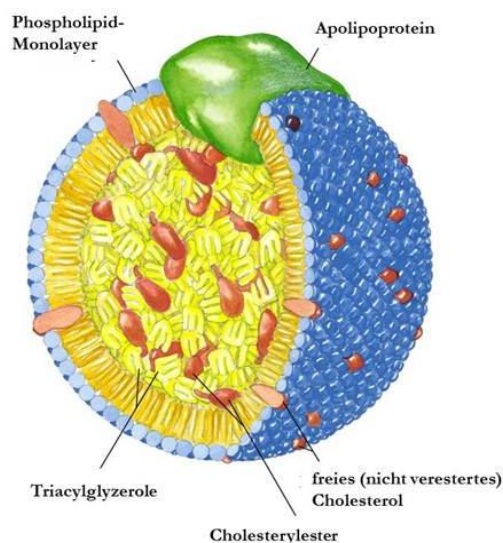
## **1.2 Bedeutung von LDL-Rezeptor (LDLR) Familie für den Energiestoffwechsel**

Wie bereits im Kapitel 1.1.2 für den postprandialen Lipid-Stoffwechsel beschrieben, ermöglichen die hepatischen Rezeptoren der LDLR Familie die Aufnahme zirkulierender Lipoproteine und sind somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Lipid Homöostase. Defekte im LDLR gehören zu den häufigsten Ursachen der familiären Hypercholesterinämie (FH) und dessen Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen wurde bereits umfangreich nachgewiesen (Austin et al., 2004; Goldstein and Brown, 1978). Allerdings scheinen auch die anderen LDLR Mitglieder das Lipoprotein-Gleichgewicht und die Atherosklerose zu beeinflussen, sodass die LDLR Familienmitglieder potentielle Ziele für Wirkstoffentwicklungen gegen metabolische Erkrankungen darstellen.

### **1.2.1 Aufbau und Funktion der Lipoproteine**

Lipoproteine transportieren wasserunlösliche Fette und fettlösliche Vitamine wie z.B. Vitamin A, D, E und K durch den Organismus und dienen der Zellversorgung. Der Aufbau der Lipoproteine besteht aus einem äußeren amphiphatischen Phospholipid-*Monolayer* mit freiem Cholesterin, welcher den hydrophoben Kern aus Triglyzeriden, Cholesterylestern und Vitaminen umgibt (Abbildung 1.2.1). Die Lipoproteine werden anhand der Größe und Dichte in verschiedene Klassen unterteilt. Die Triglyzerid-reichen, großen und weniger dichten Lipoproteine sind die Chylomikronen (CM) (75-1200nm, <0,95 kg/l) und die *Very Low Density* Lipoproteine (VLDL) (30-80nm, 0,95-1,019kg/l). Im Gegensatz dazu sind die *Low Density* Lipoproteine (LDL) (18-25nm, 1,019-1,063 kg/l) und die *High Density* Lipoproteine (HDL) (5-12 nm, 1,063-1,210 kg/l) kleiner und cholesterinreicher. Die *Intermediate Density* Lipoproteine (IDL) sind ein Abbauprodukt der VLDL und liegen größenmäßig zwischen den VLDL und LDL. Während die LDL das Cholesterin zu den Zellen transportieren, sind die HDL für den Abtransport vom Cholesterin zuständig (Feingold and Grunfeld, 2000a). Die bereits erwähnten Apolipoproteine haben verschiedene Funktionen. Zum einen sind sie strukturell so ist

ApoB-48 das Strukturprotein der CM, ApoB-100 der VLDL und LDL oder ApoA-I das der HDL. Zum anderen sind sie funktionell. So vermittelt z.B. ApoE die Bindung der CM und VLDL an die Lipoprotein Rezeptoren (Feingold and Grunfeld, 2000a).



### **Abb.1.2.1 Aufbau der Lipoproteine**

Die hydrophoben Lipide (Triglyceride, Cholesterylester) und Vitamine sind von einem amphipatischen Phospholipid-Monolayer umhüllt, in den freies Cholesterin und die strukturgebenden und funktionellen Apolipoproteine eingebettet sind. Bild adaptiert nach <http://www.bioguo.org>.

#### **1.2.1.1 Endogener Lipidmetabolismus**

Neben dem postprandialen Lipid-Stoffwechsel der Nahrungslipide gibt es ebenso einen endogenen Lipid-Stoffwechsel. Der endogene Lipid-Transport erfolgt prinzipiell wie der exogene, jedoch stellt der endogene Transport die Organversorgung vor allem im nüchternen Zustand sicher. Wie im exogenen Transport werden Triglyzerid-reiche Lipoproteine (TRL) in die Zirkulation abgegeben (VLDL), in der Peripherie hydrolysiert und dann über Rezeptor vermittelte Endozytose wieder aufgenommen. VLDL werden mit Hilfe des *microsomal transfer protein* (Sirtori et al., 2014) in der Leber synthetisiert und enthalten neben den Lipiden das stukturgebende ApoB-100 sowie ApoE und ApoCs. In der Zirkulation werden die VLDL via LPL zunächst zu IDL hydrolysiert, welche durch die Proteine Cholesterinester-Transferprotein (CETP) und *phospholipid transfer protein* (PLTP) zu LDL werden (Tall et al., 1985; von Eckardstein et al., 2001). Durch die Bindung von ApoB100 an den LDLR, welcher in jeder Körperzelle exprimiert ist, erfolgt die Endozytose via *clathrin coated pits* (CCP). Während beim LDLR ein Recycling zurück zur Plasmamembran stattfindet, werden die LDL über Endosomen zu den Lysosomen transportiert, welche saure Lipase und Proteasen enthalten. Hier werden die Cholesterinester zu freiem Cholesterin abgebaut und über die Niemann Pick Transporter NPC1 und NPC2 aus den Lysosomen transportiert (Deffieu and Pfeffer, 2011; Kanerva et al., 2013). Das freie Cholesterin wird entweder zur Plasmamembran oder zum endoplasmatischen

Retikulum gebracht, wo es anhand eines negativen *feedback* Mechanismus via SREBP die Genexpression vom LDLR reguliert (Brown and Goldstein, 1997)

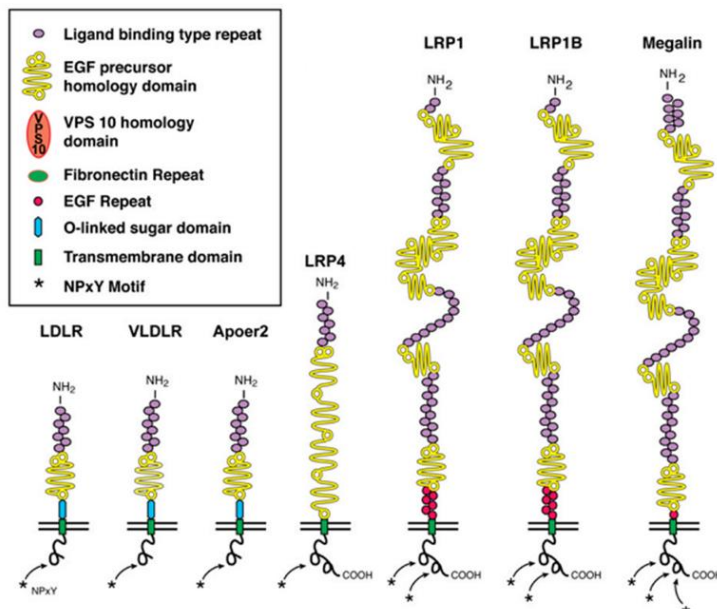
### 1.2.1.2 Reverser Cholesterin Transport (RCT)

Beim reversen Cholesterin Transport wird Cholesterin aus den peripheren Geweben zurück zur Leber transportiert. Im Gegensatz zu anderen Zellen exprimieren gewebeansässige Makrophagen s.g. *scavenger* Rezeptoren (SR-A, SR-B1), welche veränderte Lipoproteine erkennen (Goldstein et al., 1979; Kzhyshkowska et al., 2012). Da diese Rezeptoren Cholesterin-unabhängig reguliert sind (also kein *feedback loop*), kann es zur Überladung der Makrophagen mit modifizierten LDL (chemisch, oxidativ) kommen (Kzhyshkowska et al., 2012). Als Folge werden Cholesterylester in zytoplasmatischen Tröpfchen eingelagert, wodurch sich die Makrophagenmorphologie ändert und sie zu sogenannten Schaumzellen werden. Die Ablagerung von Schaumzellen in Gefäßwänden ist pathophysiologisch und markiert das Anfangsstadium von Atherosklerose markiert (Yu et al., 2013).

Mit Hilfe der HDL Partikel erfolgt der reverse Abtransport vom Cholesterin aus allen Zellen. Anhand von *ATP-binding cassette Transportern* (ABCA1 und ABCG1) wird das Cholesterin an HDL übergeben und zur Leber transportiert, wo SR-B1 für die selektive Aufnahme der Cholesterylester zuständig ist (Krieger, 1999). In der Zirkulation geben die HDL zusätzlich Cholesterylester an LDL ab (im Tausch gegen Triglyzeride), die über den LDLR ebenfalls in die Leber transportiert werden. Das für den Austausch zuständige Enzym ist Cholesterinester-Transferprotein (CETP), welches beim Menschen vorhanden ist, nicht aber bei Mäusen (von Eckardstein et al., 2001).

### 1.2.2 Mitglieder der LDLR Familie

Der LDLR ist Teil der LDLR Familie und dessen Namensgeber (Brown and Goldstein, 1986). Die LDLR Familie besteht aus insgesamt sieben Rezeptoren: LDLR, VLDLR, Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2)/LRP8, LRP4/ *multiple epidermal growth factor-like domains 7* (MEGF), LRP1, LRP1B und Megalin/LRP2 (siehe Abbildung 1.2.2). Extrazellulär weisen alle Rezeptoren eine oder mehrere Ligandenbindestellen und unterschiedliche *epidermal growth factor (EGF)-receptor-like cysteine-rich* Wiederholungen mit YWTD (Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Asparaginsäure)-Propeller-Domänen auf (*EGF precursor homology* Domänen). Zudem haben alle eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit mindestens einem NPxY (Asparagin-Prolin-x-Tyrosin)-Motiv.



**Abb.1.2.2 Die 7 Mitglieder der LDLR Familie**

Alle LDLR-Rezeptoren haben extrazellulär eine oder mehrere Ligandenbindestellen und EGF precursor homology Domänen, in unterschiedlicher Anzahl. Außerdem haben alle eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit mindestens einem NPxY-Motiv. Bild adaptiert nach (Dieckmann et al., 2010)

**1.2.2.1 Bedeutung vom LDLR**

Der LDLR ist in allen Körperzellen exprimiert und dient der zellulären Lipidversorgung, da er vor allem LDL-Partikel aufnimmt durch Wechselwirkung mit ApoB100, aber auch CR via ApoE aufnehmen kann. Genmutationen, welche die Funktion des LDLR beeinträchtigen, führen zur familiären Hypercholesterolämie (FH). Während die hepatische Aufnahme der CR unverändert ist, akkumuliert bei dieser Erkrankung das LDL-Cholesterin vermehrt im Serum, sodass die Patienten anfälliger für Atherosklerose und dessen Folgeerkrankungen sind (Rohlmann et al., 1998). Bei einem vollständigen Gendefekt des LDLR sterben die Patienten oft sehr früh (unter 20 Jahre) an einem Herzinfarkt (Francke et al., 1984).

Die Genexpression des LDLR wird durch den intrazellulären Cholesteringehalt in einem negativen *feedback loop* kontrolliert. Die Expression des LDLR wird von dem *sterol regulation element binding protein* (SREBP) reguliert. Die SREBPs sind Transkriptionsfaktoren, welche die DNA mit einer basischen *helix loop helix leucine zipper* (bHLH-Zip) Struktur binden (Brown and Goldstein, 1997) und damit eine Vielzahl an Lipid-Stoffwechsel-Genen regulieren (Horton et al., 2002). Als inaktive Vorläuferproteine werden die SREBPs zunächst an die ER Membran gebunden. Hier ist das *insulin induced gene* (INSIG) ansässig, welches durch Bindung vom *SREBP-cleaving-activating protein* (SCAP) die SREBPs im ER zurückhält (Goldstein et al., 2006). SCAP ist sowohl ein Escort als auch ein *sterol sensor* Protein (Brown et al., 2002). Sinkt die intrazelluläre Cholesterinkonzentration, löst sich INSIG von SCAP, welches daraufhin den Transport von SREBP in COPII Vesikeln zum Golgi initiiert. Im Golgi wird SREBP anhand der



*site-1-protease* (S1P) und *site-2-protease* (S2P) gespalten, sodass der N-terminale SREBP Teil aus dem Golgi entlassen werden kann und in den Zellkern geht. Dort bindet es an das *sterol response element* (SRE) und initiiert die Transkription von z.B. dem LDLR oder der HMG-Co Reduktase, dem Schlüsselenzyme der intrazellulären Cholesterinsynthese.

### 1.2.2.2 Bedeutung vom LDLR-related protein 1 (LRP1)

Im Gegensatz zum LDLR ist LDLR-related protein1 (LRP1) kein einfacher *cargo-receptor*, sondern hat eine Vielzahl an Liganden und Funktionen (Feingold and Grunfeld, 2000a).

Die extrazelluläre LRP1 Domäne besitzt mehrere Cystein-reiche *ligand-binding repeats*, welche aus 4 Liganden Cluster (I-IV) von 2, 8, 10 und 11 Wiederholungen bestehen. Die meisten für LRP1 bekannten Liganden binden jedoch an Cluster II und IV. Zwischen den 4 Clustern liegen jeweils s.g. *EGF precursor homology* Domänen aus Cystein reichen EGF Wiederholungen und YWTD Domänen. Der *EGF precursor homology* Domäne nach Cluster IV folgen 6 EGF Wiederholungen und die Transmembrandomäne. Intrazellulär besitzt LRP1 ein proximales und distales NPxY Motiv, wobei letzteres mit einem YxxL (Tyrosin-x-x-Leucin) Internalisierungsmotiv überlappt. Außerdem weist der cytoplasmatische Teil mehrere Phosphorylierungs-sites und zwei Di-Leucin (LL)-Motive auf (Reekmans et al., 2010). Die NPxY Motive wechselwirken einerseits mit der Endozytosemaschinerie, andererseits mit *adaptor* und *scaffold* Proteinen, um Signaltransduktionen zu induzieren (Herz and Strickland, 2001). Mit die größte Gruppe der LRP1 Liganden sind Proteinasen oder Moleküle, die proteolytische Prozesse regulieren. Während ein Großteil der Proteasen im Komplex mit ihren Inhibitoren von LRP1 erkannt werden, wie z.B. die Pan Protease mit dem Inhibitor  $\alpha$ 2M, können Serin- und Metalloproteasen direkt an LRP1 binden (Herz and Strickland, 2001). Weitere LRP1 Liganden sind u.a. Plasminogen Aktivatoren, Lipasen, Gerinnungsfaktoren oder das *amyloide precursor protein* (APP).

LRP1 wird als Vorläuferprotein mit einer Größe von 600kDa gebildet und von dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ansässigen *receptor-associated protein* (RAP) gebunden, um die Bindung zu co-exprimierten LRP1 Liganden zu vermeiden. RAP agiert als Chaperon von LRP1 und anderen LDLR Familienmitgliedern (Herz and Strickland, 2001) und transportiert LRP1 vom ER zum Golgi. Hier dissoziiert RAP von LRP1 ab und wird zurück zum ER recycelt. Im Transgolgi-network (TGN) wird LRP1 von der residieren Endoprotease Furin in 2 Untereinheiten von 515kd ( $\alpha$ -Kette) und 85kd ( $\beta$ -Kette) gespalten, die nicht-kovalent miteinander assoziieren (Willnow et al., 1996). Die  $\alpha$ -Kette beinhaltet den Hauptteil der extrazellulären Liganden-Domänen, während die  $\beta$ -Kette einen kleinen Teil des extrazellulären Bereichs, die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne ausmacht (Reekmans et al., 2010).

In der Leber ist LRP1 ein wichtiger Rezeptor für die postprandiale Aufnahme der CR, da es sowohl ApoE als auch die LPL als Liganden erkennt (Beisiegel et al., 1991; Beisiegel et al., 1989; Heeren et al., 2002). Anders als der LDLR ist LRP1 in Hepatozyten nicht an der Plasmamembran, sondern überwiegend perinuklear lokalisiert. In der postprandialen Phase stimuliert Insulin den Transport von LRP1 an die Plasmamembran, was die vorrangige Aufnahme der CR via LRP1 zur Folge hat (Laatsch et al., 2009). Zudem wurde gezeigt, dass die Insulin-vermittelte Translokation von LRP1 in der Leber von dem NPxYxxL Doppel-Motiv der intrazellulären LRP1 Domäne abhängt (Gordts et al., 2009). Interessanterweise zeigt der induzierte LRP1 Transport-Mechanismus eine Analogie zu der ebenfalls Insulin-vermittelten Glut4 Translokation zur Plasmamembran der Fettgewebe- und Muskelzellen (Laatsch et al., 2009). Nachdem die CR von LRP1 erkannt werden, binden Clathrin und das Adaptorprotein AP-2 an das distale unphosphorylierte NPxYxxL Motiv von LRP1, sodass es zur Rezeptor-vermittelten Endozytose kommt (Guttman et al., 2009) Über das *early endosome* (EE) gelangen LRP1 und die TRLR ins *sorting endosome* (SE), welches sich anschließend zum *late endosome* (LE) entwickelt und später mit dem abbauenden Lysosom fusioniert. Während die Lipidkomponenten der TRLR und große Apolipoproteine wie ApoB im SE verbleiben, gibt es ein Recycling von ApoE, ApoC und der LPL zurück zur Zelloberfläche, um dort re-sezerniert zu werden (Heeren et al., 1999). Zudem wurde gezeigt, dass LRP1 das HDL-induzierte Recycling von ApoE fördert. Die Partikel-Aufnahme über LRP1 verursacht die Akkumulation von ApoE in EE Recycling Kompartimenten, welche dann der HDL Formation als ApoE Pool dient (Laatsch et al., 2012).

Globale LRP1 *knockout* Embryonen sind nicht überlebensfähig, da LRP1 essentiell für die embryonale Entwicklung ist (Herz et al., 1993). Um die Bedeutung von LRP1 als Lipoprotein Rezeptor zu untersuchen, wurden daraufhin induzierbare Leber-spezifische LRP1 *knockout* Mäuse generiert. Die hepatische Depletion von LRP1 führt zu der kompensatorischen Hochregulation des LDLRs in der Leber und zeigt keinen Effekt auf die Plasma Lipoprotein-Homöostase. Der induzierte *knockout* von LRP1 in LDLR<sup>-/-</sup> Lebern verursacht jedoch einen 2-3 fachen Anstieg der Plasma Cholesterin- und Triglyzerid-Werte und die Akkumulation von ApoB48 positiver Lipoproteine verglichen mit LDLR<sup>-/-</sup> Plasmen (Rohlmann et al., 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass LRP1 für die postprandiale Aufnahme der CR wichtig ist, jedoch keine bedeutende Rolle in der Aufnahme ApoB100 positiver Lipoproteine spielt (Heeren et al., 2006).

### 1.2.3 Regulation durch PTB Adaptorproteine

Intrazelluläre Adaptorproteine regulieren über die Bindung an Rezeptoren verschiedene zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion oder die rezeptor-vermittelte Endozytose. Sie enthalten verschiedene Protein-Bindedomänen, welche die Interaktionspartner zusammenführen und damit die Bildung größerer Signalkomplexe ermöglichen (Flynn, 2001).

*Phosphotyrosine-binding* (PTB) Adaptorproteine oder auch PTBs regulieren mehrere physiologische Prozesse wie z.B. die Immunantwort, die neuronale Entwicklung, Zellwachstum und Gewebe-Homöostase. Die physiologische Bedeutung der PTBs wird deutlich durch die Korrelation von PTB-Adaptorprotein Mutationen und erblichen Erkrankungen wie der Hypercholesterinämie, Diabetes, familiären Belastung für Schlaganfall, koronaren Herzerkrankung und Alzheimer (Uhlik et al., 2005). PTBs enthalten ein PTB-Protein-Bindemodul mit einer Präferenz für NPxY Motive. Anders als der Name vermuten lässt, erkennt jedoch die Mehrzahl der PTB-Adaptorproteine nicht das NPxpY (pY= phosphoryliertes Tyrosin) Motiv, sondern das unphosphorylierte NPxY Motiv. Strukturell leitet sich die PTB Domäne von der *pleckstrin homology* (PH) Domäne ab. Die PTB Domäne wird deswegen auch als PH Domäne *superfold* bezeichnet und ist in den 3 prototypischen Mitgliedern der PTBs (IRS, Shc und Dab) konserviert. Eine weitere gemeinsame Struktur ist die Peptid-Bindetasche, eine stark basische Phospholipid Binde-„Krone“. Neben diesen grundstrukturellen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die prototypischen PTB Adaptorproteine jedoch signifikant voneinander (Uhlik et al., 2005).

*Insulin receptor substrate* (IRS)- und *Src homology 2 domain containing* (Shc)-ähnliche PTBs binden phosphorylierte NPxY Motive (Eck et al., 1996) und sind hauptsächlich in die Signaltransduktion von Zytokin-Rezeptoren und Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) involviert (Farooq et al., 1999; Lotti et al., 1996; Uhlik et al., 2005). IRS Familienmitglieder haben neben der PTB Domäne noch eine weitere PH Domäne, womit sie Phosphatidylinositol-Lipide der Plasmamembran binden können (Eck et al., 1996). Ein Beispiel für den IRS Prototypen ist IRS-1, welches durch seine Rolle im Insulin-Rezeptor Signalweg bekannt ist. IRS-1 bindet mit der PTB Domäne an den phosphorylierten IR, wird daraufhin selbst phosphoryliert und aktiviert die intrazelluläre Insulin Signalkaskade (Schmitz-Peiffer and Whitehead, 2003; Yenush et al., 1996) Mutationen in der PTB Domäne von IRS-1 führen demnach zu Beeinträchtigungen im Insulin *signalling* (Yoshimura et al., 1997).

Shc-ähnliche PTBs besitzen eine zusätzliche SH2 Domäne, welche ebenfalls an Phosphotyrosin-Reste bindet (Pelicci et al., 1992). Shc ist bedeutend für den mitogenen d.h. Zellteilung anregenden Signalweg über das Protoonkogen Ras, indem es hilft, das inaktive GDP-gebundene Ras in den aktiven GTP-gebundenen Status zu bringen. Die aktivierte RTK phosphoryliert Shc, welches daraufhin mit Grb2 wechselwirkt. Grb2 bindet dann an Sos, den Ras Guanin Nukleotid Austauschfaktor. Über die PTB Domäne von Shc wird der Komplex aus Shc-Grb2-Sos an die RTK gebunden und in die räumliche Nähe von Ras gebracht, was die Aktivierung von Ras zur Folge hat (Batzer et al., 1995; Ravichandran, 2001).

Adaptorproteine der Disabled (Dab)-ähnlichen PTBs binden an das unphosphorylierte NPxY Motiv und sind für endozytische und exozytische Prozesse bedeutend (Uhlik et al., 2005). Zum Beispiel können Dab1 und Dab2 über die PTB Domäne das FxNPxY Internalisierungs

Motiv von verschiedenen LDLR-*related* Proteinen erkennen (Mishra et al., 2002). Ein weiteres Mitglied ist ARH, welches direkt mit dem LDLR interagiert und auf das im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

### 1.2.3.1 LDLR und ARH

Das Adaptorprotein ARH ist am höchsten in Leber, Niere und Gehirn exprimiert und ist für die Endozytose des LDLR essentiell (Nagai et al., 2003). Es gehört zur Klasse der Dab-ähnlichen PTB Adaptorproteine und vermittelt die Bindung zwischen Rezeptor und den *clathrin coated pits* (CCP) (Mishra et al., 2002). Über die PTB Domäne von ARH wird das intrazelluläre unphosphorylierte NPxY-Motiv des LDLR gebunden. Die Wechselwirkung von ARH mit der Clathrin-Maschinerie erfolgt zum einen mittels einer Clathrin Box-Konsensus-Sequenz (LLDLE), die mit Clathrin Triskelion interagiert. Zum anderen findet auch eine Wechselwirkung von ARH mit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheit von AP2 statt (He et al., 2002). Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose trennt sich ARH vom Endosom und recycelt zurück zur Plasmamembran.

Der Name ARH leitet sich von der autosomal rezessiven Form der Hypercholesterinämie ab, eine Erkrankung, in der die Funktion des ARH Adaptorproteins durch Genmutationen defekt ist (Garcia et al., 2001). In Folge kann ARH nicht mehr an den LDLR binden, sodass keine Verbindung mit AP2 zustande kommt und die LDLR-vermittelte Endozytose bzw. die Aufnahme der LDL Partikel ausbleibt (He et al., 2002).

### 1.2.3.2 LRP1 und *phosphotyrosine interacting domain containing 1* (PID1)

In einem *yeast two-hybrid screen* wurde das Dab-ähnliche PTB Adaptorprotein *phosphotyrosine interacting domain containing 1* (PID1) oder auch NYGGF4 als Interaktionspartner von LRP1 identifiziert (Caratu et al., 2007). Mutationsanalysen zeigen eine spezifische Interaktion zwischen PID1 mit dem distalen NPxY Motiv der intrazellulären LRP1 Domäne, sofern der Tyrosin Rest intakt war (Kajiwara et al., 2010). PID1 wird von 250 Aminosäuren gebildet, hat eine rechnerische molekulare Masse von 28,27 kDa und besteht primär aus einer PTB Domäne (Wang et al., 2006). In H4 Zellen wurde eine zytoplasmatische Lokalisation von PID1 in der perinuklearen Region nachgewiesen, welche mit der LRP1 Lokalisation in diesen Zellen korreliert. H4 Zellen entsprechen einer humanen Neuroglioma Zelllinie, welche häufig in Alzheimer Studien verwendet werden (Kajiwara et al., 2010). Die Wechselwirkung mit LRP1 lässt vermuten, dass PID1 eine Rolle im Lipid-Stoffwechsel spielt. Zudem zeigt PID1 eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu ARH, was eine analoge Funktion von PID1 für die LRP1-vermittelte Endozytose vermuten lässt.

PID1 zeigt im Fettgewebe übergewichtiger Patienten, die meist Insulin-resistent sind, eine erhöhte Expression und gilt somit als „*obesity candidate gene*“. Die Überexpression von PID1

in 3T3-L1 Adipozyten führt zu einer Beeinträchtigung der Insulin-vermittelten GSV Translokation und Glukose-Aufnahme, ohne die basale Glukose-Aufnahme zu beeinflussen (Zhang et al., 2009). In ebenfalls Insulin sensitiven Muskelzellen verursacht der *knockdown* von PID1 einen Anstieg der Insulin-induzierten GSV Translokation und erhöht damit die Glukose-Aufnahme (Zeng et al., 2012). Da LRP1 ebenfalls in den GSV vorhanden ist, könnte der Einfluss von PID1 auf die GSV Lokalisation möglicherweise via Interaktion mit LRP1 stattfinden.

### 1.3 Pathophysiologie

Diät-induziertes Übergewicht entsteht, wenn die Energie-Aufnahme den Energie-Verbrauch übersteigt. Die zusätzlichen Kalorien werden zunächst im Fettgewebe in Form von Triglyzeriden gespeichert, lagern sich jedoch im weiteren Verlauf auch in nicht-Fettgeweben ab (ektope Fettakkumulation) und verursachen damit Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes. Der Lipidtransport und die Lipidverteilung in die verschiedenen Organe via LDLR-Familienmitgliedern sind deswegen von großer Bedeutung. In den folgenden Abschnitten wird speziell auf die Funktion von LRP1 in chronischen metabolischen Erkrankungen eingegangen.

#### 1.3.1. Diabetes: Ausmaß und Entstehung

Typ 2 Diabetes (T2D) ist vor allem durch Hyperglykämie, Insulinresistenz und vermehrter Insulin Sekretion charakterisiert. T2D ist eine verbreitete Erkrankung, die mittlerweile global epidemische Ausmaße hat. Laut der World Health Organization sind geschätzt 3,4 Millionen Tote pro Jahr dem T2D zu zuschreiben, mit steigender Prognose (McNelis and Olefsky, 2014). Übergewicht ist ein Hauptrisikofaktor für T2D, da das Vorkommen von Insulinresistenz mit zunehmendem *body mass index* (BMI), Taillenumfang und Taille-Hüft-Verhältnis zunimmt (Wilcox, 2005).

Insulin wird in der postprandialen Phase aufgrund erhöhter Plasmaglukosespiegel von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas gebildet und ist für die anabolen metabolischen Prozesse zuständig. Die Insulinresistenz ist in den meisten Fällen durch Beeinträchtigungen der intrazellulären Signalkaskade verursacht. Mögliche Mechanismen sind Veränderungen der Insulin-induzierten Signalmoleküle durch Herunterregulation, Defizite oder genetische Polymorphismen. Eine weitere Ursache der defekten Insulin-Antwort ist die Dysfunktion der Insulin-induzierten GSV Translokation in Muskel- und Fettgewebe. Im Fettgewebe stimuliert Insulin die Glukose-Aufnahme, fördert die Lipogenese und hemmt die Lipolyse bzw. die Sekretion von freien Fettsäuren. Durch ein beeinträchtigtes Insulin *signalling* in Adipozyten werden vermehrt freie Fettsäuren in die Zirkulation abgegeben (Wilcox, 2005). Im Fettgewebe selber führt die erhöhte Menge an freien Fettsäuren zur Serin-Phosphorylierung von IRS-1, was die Tyrosin-Phosphorylierung durch Insulin hemmt, sodass die Insulinsensitivität der

Adipozyten weiter abnimmt (Le Marchand-Brustel et al., 2003). Zusätzlich sezernieren die Adipozyten pro-inflammatorische Zytokine wie *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6), welche lokal aber vermutlich auch systemische Insulin inhibierende Effekte haben (Kern et al., 2001). In der Leber führt die Insulinresistenz vor allem zu vermehrter Glukoneogenese und Glukoseabgabe (Roden et al., 2000). Zudem nimmt die Leber mehr freie Fettsäuren auf, wodurch der hepatische Gehalt an Triglyzeriden steigt und die Bildung von VLDL induziert wird (Lewis et al., 1995). Der Anstieg an VLDL Partikeln kann jedoch in der Peripherie nicht abgebaut werden, da die LPL Aktivität ebenfalls Insulin-abhängig reguliert ist (Panarotto et al., 2002). In Folge entsteht die mit der Insulinresistenz einhergehende Hypertriglyzeridämie. Die  $\beta$ -Zellen des Pankreas versuchen der Insulinresistenz mit erhöhter Insulinausschüttung entgegen zu wirken, wodurch eine Hyperinsulinämie entsteht. Im weiteren Verlauf können die  $\beta$ -Zellen die fehlende Insulinsensitivität nicht mehr kompensieren, sodass eine Glukoseintoleranz bzw. Diabetes entsteht (Wilcox, 2005).

#### **1.3.1.1 Bedeutung von LRP1 für Typ 2 Diabetes**

LRP1 ist auch in Fett- und Muskelgeweben exprimiert und Teil der GSV, welche Insulinvermittelt an die Plasmamembran translozieren, analog zu der hepatischen LRP1 Lokalisation (Laatsch et al., 2009). In vitro Studien mit LRP1 knockout Adipozyten deuten auf eine Rolle von LRP1 für die Formation und Funktion der Insulin sensitiven GSV, da der Verlust von LRP1 zu verringerter Glut4 Expression und Proteinmenge, sowie geringere Glukoseaufnahme nach Insulin Stimulation führt (Jedrychowski et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde in Fett-spezifischen LRP1 *knockout* Mäusen ein verbesserter Glukose Stoffwechsel nachgewiesen. Durch den LRP1 Verlust im Fettgewebe hatten die Mäuse signifikant weniger Fetteinlagerung in WAT und BAT. Der verringerte Lipidgehalt in den Fettzellen führte zu vermehrter Aktivierung des Muskelgewebes, um die Körpertemperatur aufrechtzuerhalten. In Folge waren die basalen Plasma Glukose- und Insulinwerte sowie die postprandiale Glukose-Aufnahme aus dem Plasma in den Fett-spezifischen Lrp1 *knockout* Mäusen signifikant verbessert. Zudem waren sie vor Diät induzierter Adipositas, Glukose Intoleranz und Diabetes geschützt. (Hofmann et al., 2007).

#### **1.3.2 Atherosklerose: Ausmaß und Entstehung**

Atherosklerose ist eine progressive, chronisch entzündliche Erkrankung der Arterien, welche durch Akkumulation von Lipiden und fibrösen Bestandteilen in der Intima charakterisiert ist. Die klinischen Manifestierungen der Atherosklerose (vaskuläre Insuffizienz, Herzinfarkt oder Schlaganfall) gehören zu den Hauptursachen von Erkrankungen und Sterblichkeit bei Frauen und Männern. Bekannte Risikofaktoren sind Übergewicht, Typ 2 Diabetes, Erkrankungen des

Lipoprotein-Stoffwechsels oder Bluthochdruck, welche zusammen das sogenannte metabolische Syndrom ausmachen (Feingold and Grunfeld, 2000b).

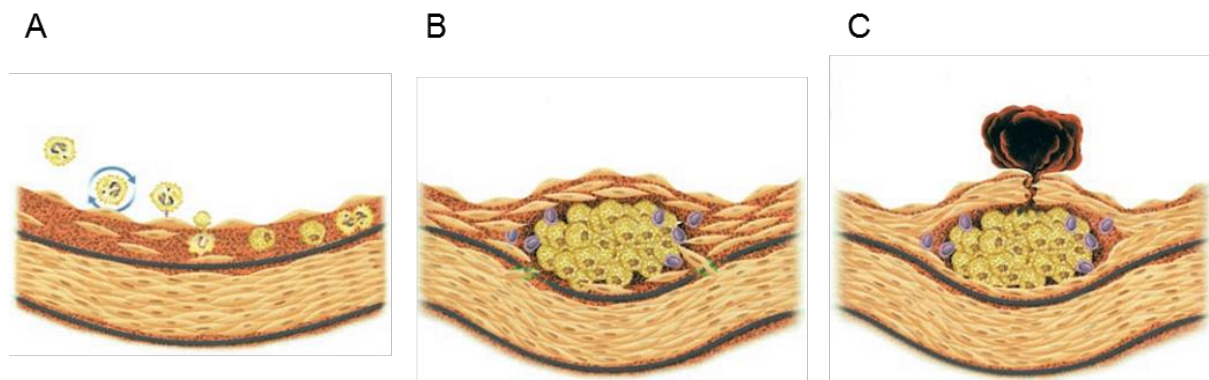
Hyperlipidämie verursacht die Akkumulation modifizierter Lipoproteine in der arteriellen Intima und die Bildung von Schaumzellen (siehe auch den Abschnitt über RCT), was die Entzündung der Intima zu Folge hat und Atherosklerose initiiert. Bestandteile der Lipoproteine, z.B. oxidierte Phospholipide oder pro-inflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , induzieren die Transkription des *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) Adhäsionsmoleküls via NF- $\kappa$ B (Collins and Cybulsky, 2001). VCAM-1 bindet speziell die Leukozyten, welche in frühen Atheromen nachzuweisen sind: Monozyten und T-Lymphozyten. Über VCAM-1 werden als erstes die Monozyten aus der Zirkulation rekrutiert, während T-Lymphozyten erst im späteren Verlauf der Läsion-Entwicklung folgen. Die Monozyten binden adhären an Endothel und migrieren daraufhin zwischen den Endothelzellen in die Tunica intima. Die Migration wird durch s.g. Chemokine hervorgerufen, welche einen Chemokin-Gradienten als „Wegweiser“ für die migrierenden Monozyten bilden. Ein Beispiel dafür ist *monocyte chemotactic protein 1* (MCP1), welches an die CCR Rezeptoren der Monozyten bindet (Gu et al., 1998). In der Intima nehmen die Monozyten dann morphologische Eigenschaften der residierenden Makrophagen an, indem sie z.B. die Expression der *scavenger receptor* (SR-A) erhöhen, und entwickeln sich ebenfalls zu Schaumzellen. Ein bedeutender Aktivator dieser Transformation ist der *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) (Clinton et al., 1992). In Folge bildet sich ein s.g. *fatty streak*, die initiale Läsion der Atherosklerose.

Durch die Migration und Akkumulation von *smooth muscle cells* (SMC) entwickeln sich die initialen Läsionen zu komplexeren Atheromen, den s.g. Plaques. In der Intima ansässige Makrophagen sezernieren Wachstumsfaktoren, welche die Replikation der SMC und das Wachstum der Läsion stimulieren. Die SMC migrieren daraufhin aus der Media in die Intima, wo sie Kollagen und andere extrazelluläre Matrix (ECM) Proteine abgeben, sodass sich eine fibröse Kappe um den Plaque bildet (Collins and Cybulsky, 2001).

Die fortgeschrittenen Atherome werden in „stabile“ und „instabile“ Plaques unterteilt. Die „stabilen“ Plaques haben weniger Lipideinlagerungen und sind von einer verhältnismäßig dicken fibrösen Kappe umgeben, wodurch das Gefäßlumen erhalten bleibt. Die instabilen Plaques weisen hingegen wesentlich mehr Lipideinlagerungen auf, die zudem von einer nur sehr dünnen fibrösen Kappe geschützt werden. Zum einen gibt die in den Plaques vorhandene Vielzahl an inflammatorischen Leukozyten Proteasen ab, welche die extrazelluläre Matrix abbauen, zum anderen wird die Kollagen-Synthese in den SMC durch pro-inflammatorische Zytokine gehemmt. Die instabilen Plaques sind dadurch anfälliger für eine Ruptur, was in Folge die Gerinnungskaskade aktiviert und durch den entstehenden Thrombus eine Verringerung des Gefäßlumens verursacht. Verschließt der Thrombus die Koronararterie vollständig, kann

es zum Herzinfarkt kommen (Libby et al., 2002). Der Prozess der Atherosklerose ist in der Abbildung 1.3.2 dargestellt.

Zur Erforschung der Atherosklerose werden häufig hyperlipidämische Mausmodelle verwendet, z.B. ApoE oder LDLR *knockout* Mäuse, da beide Proteine für die Aufnahme der Triglyzerid- und Cholesterinreichen Lipoproteine wichtig sind. In dieser Doktorarbeit wurde mit LDLR *knockout* Tieren gearbeitet. Die LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse haben erhöhte Plasma Cholesterin Werte, auf Grund der LDL Partikel Akkumulation, und entwickeln atherogene Plaques durch die Fütterung mit einer lipidreichen *Western Type* Diät (WTD).



### **Abb.1.3.2 Entstehung Atherosklerose**

**A.** Monozyten werden bei einer Entzündung der Endothelschicht rekrutiert und binden zunächst adhären an die Endothel Oberfläche. Mit Hilfe eines Chemokin Gradienten als „Wegweiser“ migrieren die Leukozyten in die Intima und transformieren zu Makrophagen bzw. Schaumzellen. **B.** In der weiteren Läsions-Entwicklung folgen die T-Lymphozyten den Monozyten und migrieren ebenfalls in die Intima. Zudem wird die Proliferation und Migration von smooth muscle cells (SMC) induziert, welche die Bildung einer fibrösen Kappe induzieren. **C.** Inflammatorische Mediatoren inhibieren die Kollagenbildung und bauen die extrazelluläre Matrix ab. Die fibröse Kappe wird dadurch dünner und der Plaque ist anfälliger für eine Ruptur. Der dadurch entstehende Thrombus kann akute Komplikationen wie einen Gefäßverschluss verursachen. Bild adaptiert nach (Libby et al., 2002)

#### **3.2.2.1 Bedeutung von LRP1 für Atherosklerose**

LRP1 ist ebenfalls für die Aufnahme atherogener Lipoprotein Partikel in die Leber zuständig, sodass die hepatische Depletion von LRP1 in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen zu vermehrter Akkumulation von CR und einem signifikanten Anstieg der Plasmalipide führt (Rohlmann et al., 1998). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Lipoprotein-Aufnahme von dem distalen NPxYxxL Motiv des LRP1 Rezeptor abhängig ist. Die Inaktivierung des NPxYxxL Motivs (LRP1<sup>n2/n2</sup> Mutante) in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen führt ebenfalls zu vermehrter *Remnant* Akkumulation, verglichen mit LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen. Außerdem entwickelten die LDLR<sup>-/-</sup> LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäuse, nach 12 Wochen WTD Fütterung, mehr artherogene Läsionen mit vermehrter SMC und Kollagen-Akkumulation. Demnach hat LRP1 ein wichtiges anti-atherogenes Potential, indem es den Lipoproteingehalt im Plasma reduziert (Gordts et al., 2009).



In einer anderen Studie wurde der atherogene Einfluss des LRP1 Rezeptors unabhängig von seine Funktion im Lipoprotein-Stoffwechsel untersucht. Hierzu wurden APOE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> Doppel-*knockout* Mäuse mit einem induzierbaren Leber-spezifischen LRP1 *knockout* kombiniert, um die ApoE bedingte Lipoprotein-Aufnahme auszuschließen. Der LRP1 Verlust in diesen Mäusen erhöhte vor allem die Plasmawerte der Lipoprotein Lipase, des *coagulator factor VIII*, des Willebrand Faktors und die des Plasminogen Aktivators. Die LRP1 Depletion hatte zudem einen leicht senkenden Effekt auf die Plasma Cholesterinwerte, trotzdem war die Atherosklerose-Entwicklung 2-fach höher als in den APOE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> *littermates*. LRP1 ist also auch unabhängig vom Plasma Cholesterin athero-protektiv, indem es die Plasmalevel pro-atherogener Liganden reduziert (Espirito Santo et al., 2004).

Eine weitere Studie befasste sich mit der atherogenen Rolle von LRP1 in Makrophagen. Dazu wurden LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen LRP1 *knockout* Makrophagen transplantiert. Die Transplantation der LRP1 *knockout* Makrophagen führte, verglichen zur LDLR<sup>-/-</sup> Kontrollgruppe, zu 40% mehr atherogenen Plaques. Dieser Effekt war nicht durch einen Unterschied im Lipoproteinprofil bedingt, sondern durch eine erhöhte inflammatorische Antwort der Makrophagen via MCP-1, TNF $\alpha$  und Metalloprotease 9 Sekretion. LRP1 ist folglich athero-protektiv, indem es die Expression inflammatorischer Marker inhibiert (Overton et al., 2007).

Die SMC Proliferation ist ein bedeutender Schritt in der Entwicklung und Progression atherogener Läsionen. Die Untersuchung von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen mit einem SMC-spezifischen LRP1 *knockout* zeigte eine Überexpression des *plated-derived growth factor* (PDGF) Rezeptor und ein überaktiviertes PDGFR *signalling* in den SMC mit LRP1 Depletion. In Folge war die Integrität der Gefäßwand nicht mehr intakt, die Aorten waren ausgedehnt und geweitet, wodurch die Mäuse sehr viel anfälliger für die Cholesterin-induzierte Atherosklerose waren. Der dahinter vermutete anti-atherogene Mechanismus ist, dass LRP1 einen Komplex mit dem PDGFR in SMC formt, sodass die PDGF vermittelte Migration der SMC suprimiert wird (Boucher et al., 2003).

## 2 FRAGESTELLUNG

Adipositas ist eine weltweite Epidemie mit steigender Tendenz. Durch Überernährung und Mangel an körperlicher Bewegung kommt es zu einer erhöhten Energiespeicherung im Fettgewebe und zu Veränderungen im Stoffwechsel. Begleit- und Folgeerkrankungen von Übergewicht sind Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes, Hypertriglyceridämie und Bluthochdruck. Jede dieser Erkrankungen stellt einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen wie Atherosklerose dar und in Kombination ergeben sie das sogenannte metabolische Syndrom. Für den postprandialen Energiestoffwechsel ist die Insulinresistenz von großer Bedeutung, da diese die Energieversorgung der metabolisch-aktiven Zellen stört und zur Akkumulation von Lipiden und Glukose führt. Das PTB Adaptorprotein *phosphotyrosine interacting domain containing 1* (PID1) konnte als Interaktionspartner von LRP1 nachgewiesen werden (Caratu et al., 2007) und interagiert mit dem distalen NPxY Motiv des LRP1 Rezeptors (Kajiwara et al., 2010). In der Doktorarbeit von Kirstin Albers wurde gezeigt, dass PID1 für die LRP1 Retention in den perinuklearen Kompartimenten der Leber essentiell ist, da der Verlust von PID1 zu einer erhöhten Oberflächen-Dichte von LRP1 in Hepatozyten führt. Globale PID1<sup>-/-</sup> Mäuse weisen neben der veränderten LRP1 Lokalisation eine kompensatorische Hochregulation des LDLR in der Leber auf, sodass die Funktion von LRP1 durch den PID1 Verlust vermutlich verändert ist. Zudem zeigen die globalen PID1 *knockouts* eine verbesserte postprandiale Glukose-Aufnahme in die Fett- und Muskelgewebe verglichen mit wt Mäusen (Doktorarbeit Kistin Albers 2014).

In Anknüpfung an die globalen PID1 *knockout* Maus Daten soll in dieser Doktorarbeit die Bedeutung von PID1 für den postprandialen Energiestoffwechsel in Gewebe-spezifischen PID1 *knockout* Mäusen (Fettgewebe und Leber) untersucht werden. Die Relevanz von PID1 für die Glut4-vermittelte postprandiale Glukose-Aufnahme in Adipozyten wird zunächst in primären braunen Adipozyten aus wt und PID1<sup>-/-</sup> Mäusen, +/- Insulin-Stimulation, definiert. Anschließend soll die postprandiale Glukose-Aufnahme *in vivo* in Fettgewebe-spezifischen PID1 *knockout* Mäusen untersucht werden. Weiterhin soll die pathophysiologische Rolle von PID1 für die LRP1 vermittelte Lipoprotein-Aufnahme, ohne Einfluss des LDL-Rezeptors untersucht, werden. Aus diesem Grund sollten LDLR<sup>-/-</sup> Leber-spezifische PID1 *knockout* Mäuse (LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre-/+ ) generiert werden, um ausschließlich die PID1 abhängige Lipoprotein-Aufnahme in primären Hepatozyten und die postprandiale Triglyzerid *clearance* mit Hilfe entsprechender Toleranz Tests in Mäusen zu untersuchen. Da eine beeinträchtigte LRP1 Funktion in der Leber von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen die Atherosklerose-Entwicklung verstärkt (Gordts et al., 2009), im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, soll in den Doppel-*knockout* Tieren mittels *Western Type* Diät Fütterung Atherosklerose induziert werden. In der

Atherosklerose-Studie wird folglich ermittelt, ob der PID1 Verlust und die veränderte LRP1 Lokalisation einen Einfluss auf die Entstehung von Atherosklerose haben.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Arbeitsgeräte

ABI Prism, 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystem Inc.
Absaugpumpe	SMT
AccuCeck Aviva Messgerät+Teststreifen	Roche
Ätka FPLC- Apparatur	GE Healthcare
β-Szintillationscounter	Perkin-Elmer
CO <sub>2</sub> - Inkubator für Zellkultur	Binder
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad
γ-Counter	Perkin-Elmer
Horizontalschüttler	Heidolph
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	IKA, Labortechnik
Mikrotiterplatten Reader+ Software	GE Healthcare
Mikrowelle	Sharp
Nanodrop	Peqlab
Nikon A1 Laser Scanning Mikroskop	Nikon
Operationsbesteck	Aesculap, Braun
pH-Meter	Mettler
Pipettierhilfe	AccuJet
Spannungsquelle SDS-PAGE	Bio-RAD
Superose-6-Säule (FPLC)	Pharmacia LKB
Thermocycler	Biometra
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Tissue Lyser	QIAGEN
Transferekassette Westerblot	Bio-RAD
Ultrazentrifuge	Beckmann Counter
Vortexer	Heidolph
Waage	Sartorius
Wasserbad	G. für Labortechnik
Westerblot-Apparatur	Bio-Rad
Zeiss LSM710, Laser Scanning Mikroskop	Zeiss

### 3.1.2 Chemikalien

$^{125}\text{I}$ od	Perkin-Elmer
$^3\text{H}$ -Triolein	Perkin-Elmer
$^3\text{H}$ -Deoxyglukose	Perkin-Elmer
$\beta$ -Glyzerophosphat	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ascorbat	Sigma-Aldrich
Borsäure	Merck
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Serva
$\text{CaCl}_2$ , Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Sigma-Aldrich
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_4\text{S}$ , Dimethylsulfat	Merck
Dexamethanson	Sigma-Aldrich
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Ethanol 96%	Merck
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycin	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
IBMX	Sigma-Aldrich
Insulin	Invitrogen
KCl, Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
KBr, Kaliumbromid	Roth
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Ketamin	Albrecht
Kollagenase NB 8	Serva
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Kupfersulfatpentahydrat	Merck
Laktat	Sigma-Aldrich
$\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Natriumcarbonat	Merck
$\text{NaCl}$ , Natriumchlorid	J.T.Baker
$\text{NaF}$ , Natriumfluorid	Sigma-Aldrich
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
$\text{NaHCO}_3$ , Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich

NaOH, Natriumhydroxid	Merck
NaI, Natriumiodid	Sigma-Aldrich
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> , Natriumkaliumtartrat	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
NaVO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Poteinase K	Invitrogen
Rompun	Bayer
Saponin	Sigma-Aldrich
SDS, Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich
T3	Sigma-Aldrich
TCA, Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich
Tween20	Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich

### 3.1.3 Gebrauchsmaterial

6-/12-/24-Well-Zellkultur-Platten	Nunc™
Coverslips, Glas	MENZEL Gläser
Coverglass	Roth
Filterpapiere	Whatman GmbH
Hyperfilm ECL Detektion	GE Healthcare
Kanülen	Braun
Kollagen-beschichtete 6-/12-/24-Well-Platten	Nunc™
Mikrotiterplatten (96-Well)	Nunc™
Nitrocellulose Transfer-Membran	Whatman GmbH
NuPage Probenpuffer	Invitrogen
NuPage Reducing buffer	Invitrogen
Objekträger	MENZEL Gläser
Parafilm	Brand GmbH
PCR-Tubes	Sarstedt
PD10-Säule	GE Healthcare
Pipetten	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polyallomer-Röhrchen	Beckmann
Protein Marker	GE Healthcare
Reaktionsgefäß 15ml, 50ml	BD Falcon
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml	Eppendorf

Spritzen	Braun
Stabpipetten	Sarstedt
Ultrazentrifugations-Röhrchen	Beckmann
<i>Western Type</i> Diät	ssniff®
Zellsieb 70µm	BD Falcon
β-Counter-Szintillations-Röhrchen	Perkin-Elmer
γ-Counter-Röhrchen	Roth

### 3.1.4 Kits und Reagenzien

Anti/Anti	GIBCO/BRL
BSA-Lösung (Proteinstandard)	PAA Laboratories
Cholesterol-Detektions-Kit	Roche
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Cy5-labelling kit	GE Healthcare
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Scientific
DreamTaq Green Buffer (10x)	Thermo Scientific
DMEM	GIBCO/BRL
ECL-Lösungen A+B	GE Healthcare
FCS (fötales Kälberserum)	GIBCO/BRL
Folin´s Reagenz	Merck
GeneRuler DNA Ladder	Thermo Scientific
Heparin	Braun
Histoclear	VWR
cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Mastermix TaqMan	Eurogentec
NEFA-HR(2)	Wako
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey und Nagel
NuPage MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
PageRuler™Prestained Proteinladder	Thermo Scientific
Paraformaldehyd-Lösung(20%)	Electrom Microscopy Science
PBS, pH 7,4	GIBCO/BRL
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml)	GIBCO/BRL
Percoll	Sigma-Aldrich
Proteininhibitorcocktail Tabletten	Roche
Solvable™	Perkin-Elmer
Szintillationsflüssigkeit	Perkin-Elmer
Triglyzerid-Dedektions Kit	Roche

TRIzol® Reagenz

Trypsin/EDTA

Universal TaqMan MasterMix

Weigert's Iron Hematoxylen

Invitrogen

GIBCO/BRL

Eurogentec

VWR

### 3.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

#### Kulturmedium

DMEM+GlutaMax™ 4,5 g/l Glukose

10% FCS

1% P/S (Adipozyten)

bzw. 2% Anti/Anti (Hapatozyten)

#### Hungermedium

DMEM+GlutaMax™ 1 g/l Glukose

0,1% Fettsäure freies BSA

1% P/S

sterilfiltrieren

#### 10x PBS

400g NaCl

10g KCl

10g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

ad 5 l H<sub>2</sub>O dest., pH 6,9

#### 1x PBS

100ml 10x PBS Puffer

ad 1l H<sub>2</sub>O dest

#### 10x Perfusionspuffer

81,1 g/l NaCl

3,73 g/l KCl

1,63 g/l MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O

2,83 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,543 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

sterilfiltrieren, pH 7,4

#### 1x Perfusionspuffer

100ml 10x Perfusionspuffer

2,1 g/l NaHCO<sub>3</sub>

0,745 g/l EDTA

2,970 g/l Glukose

0,846 g/l Laktat

0,022 g/l Pyruvat

sterilfiltrieren

#### Isolationsuffer

123mM NaCl

5mM KCl

1,3mM CaCl<sub>2</sub>

5mM Glukose

100mM HEPES

ad 1l H<sub>2</sub>O dest.

#### RIPA Puffer

50mM NaF

50mM β-Glycerophosphat

1mM NaVO<sub>4</sub>

1% SDS

1x MiniComplete Proteaseinhib.

in 1x PBS



**PFA Lösung**

4% PFA (aus 20% Stocklösung)  
in 1x PBS

**Lowry Lösung A**

2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,02% Natriumkaliumtartrat  
in 0,1 M NaOH

**SDS Gel Puffer**

1M Tris Bis  
pH 6,6

**10% SDS Trenngel**

10,6ml Gel Puffer  
8ml 40% Acryl  
13,4ml H<sub>2</sub>O dest.  
160µl 10% APS  
40µl TEMED

**WB Transferpuffer**

56,2g Glycin  
1,1 g Tris  
1l Methanol  
ad 4l H<sub>2</sub>O dest.

**10x TBS Puffer**

121g Tris  
400g NaCl  
ad 5l H<sub>2</sub>O dest., pH 7,6

**Narkose Lösung**

2,3ml Rompun (2%)  
1ml Ketanest (10mg/ml)  
6,7ml NaCl

**Lowry Lösung B**

0,5% CuSO<sub>4</sub> Pentahydrat  
5% SDS  
in H<sub>2</sub>O dest.

**SDS Laufpuffer**

25ml NuPage MES Puffer  
ad 500ml H<sub>2</sub>O dest.

**10% SDS Sammelgel**

3ml Gel Puffer  
1,25ml 40% Acryl  
5,5ml H<sub>2</sub>O dest.  
80µl 10% APS  
20µl TEMED

**WB Blockierpuffer**

1x TBS  
0,1% Tween  
10% Milchpulver

**WB Waschpuffer- TBST**

1x TBS  
0,1% Tween

**Sudan IV Färbelösung**

500ml Aceton  
500ml 70% Ethanol  
5g Sudan IV

**KBr Dichtelösung  $\rho=1,019\text{g/ml}$** 

0,9%w/w NaCl  
 10mM Tris/HCl  
 10mM EDTA  
 19,059 g/l KBr  
 pH 8,6

**10x FPLC Puffer**

100mM Tris/HCl pH 8  
 1,5M NaCl  
 100mM EDTA  
 in H<sub>2</sub>O dest.

**5xTBE Puffer**

54g Tris  
 27,5g Borsäure  
 3,7g EDTA  
 ad 1l H<sub>2</sub>O dest.

**Van Gieson Lösung**

10ml Fuchsinrot (1%)  
 140ml Pikrinsäure

**STE Puffer**

2.92g NaCl  
 1,21g Tris-Base  
 5g SDS  
 3,72g EDTA  
 ad 500ml H<sub>2</sub>O dest., pH 7,4

**1xFPLC Puffer**

100ml 10x FPLC Puffer  
 ad 1l H<sub>2</sub>O dest.  
 sterilfiltrieren

**1xTBE Puffer**

100ml 5x TBE Puffer  
 900ml H<sub>2</sub>O dest.

**Anilinblau**

50ml Anilinblau (1%)  
 100ml Essigsäure (0,5%)

**3.1.6 Verwendete Antikörper****Tabelle 3.1.6.1: Primäre Antikörper**

Primäre Antikörper	Anwendung +Verdünnung	Hersteller
anti $\beta$ -Aktin	WB 1:10000	BD
anti P-Akt	WB 1:1000	Cell Signalling
anti Total Akt	WB 1:1000	Cell Signalling
anti Glut1	WB 1:750	Abcam
anti Glut4	WB 1:1000, IF 1:500	R&D Systems
anti LRP1	WB 1:10000	Epitomics
Cy5 anti LRP1	IVM 0,1mg/Maus	Epitomics

**Tabelle 3.1.6.2: Sekundäre Antikörper**

Sekundäre Antikörper	Anwendung + Verdünnung	Hersteller
Ziege $\alpha$ Kaninchen HRP	WB 1:5000	Jackson Immuno Research
Ziege $\alpha$ Maus HRP	WB 1:5000	Jackson Immuno Research
Esel $\alpha$ Maus-Alexa Fluor	IF 1:1000	Jackson Immuno Research

### 3.1.7 Verwendete TaqMan® Sonden

**Tabelle 3.1.7: TaqMan® Sonden für Real-time PCR**

Gen	Assay
mApoE	Mm00437573_m1
mCHREBP $\beta$	AlVI4CH (eigenes Design)
mCxcl1	Mm00433859_m1
mFasn	Mm00662319_m1
mLdlr	Mm00440169_m1
mLrp1	Mm00464608_m1
mPid1	Mm01245502_m1

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Protein-Bestimmung mittels Lowry

Anhand der Methode nach Lowry wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Der Proteinstandard (BSA-Verdünnungsreihe) und die Proben wurden mit Lösung C (Lösung A und B im Verhältnis 50:1) versetzt, invertiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde Folin-Reagenz (Verdünnung 1:2 mit H<sub>2</sub>O dest.) hinzugegeben. Die Platte wurde erneut invertiert und 20-30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 760nm gemessen. Anhand der Standardreihe konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### 3.2.1.1 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglichte die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe (Laemmli, 1979). Zunächst wurde ein 10% SDS Gel gegossen, auf welches die denaturierten Proteinproben geladen wurden. Das Gel wurde in eine Gelkammer gespannt und mit SDS Laufpuffer bis zum Ansatz gefüllt. Die Proteinproben wurden mit 4xProbenpuffer (NuPAGE, Invitrogen) auf 1xProbenpuffer und mit 10x Reduzierungspuffer (NuPAGE, Invitrogen) auf 1x Reduzierungspuffer gebracht und anschließend für 10 min bei 60°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Gleiche Mengen Protein (meistens 20 $\mu$ g/ml) und die PageRuler™ Prestained Protein Ladder wurden auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte für 100 min bei 170V.

### 3.2.1.2 Western Blot

Anhand der Western Blot Methode wurden die, in der SDS-PAGE nach Größe getrennten, Proteine über ein elektrisches Feld auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, um die Proteine mittels Antikörper-Detektion nachzuweisen. Die Nitrocellulose-Membran, 2 Schwämme und 4 Filterpapiere wurden zunächst in Transferpuffer eingelegt, bevor die Transferkassette aufgebaut wurde. Als Unter- und Auflage wurden jeweils ein Schwamm und 2 Filterpapiere verwendet, dazwischen wurden das SDS-Gel und die Nitrocellulose-Membran positioniert. Die Transferkassette wurde anschließend in die Transferkammer, welche mit Transferpuffer gefüllt war, überführt. Hierbei war wichtig, dass die Nitrocellulose-Membran zwischen der Anode und dem Gel war, sodass die negativ geladenen Proteine auf die Membran übertragen wurden. Der Transfer erfolgte entweder bei 200 mA über Nacht, oder bei 400 mA für 2 Stunden.

### 3.2.1.3 Indirekte Immunodetektion

Die Proteine wurden auf der Nitrocellulose-Membran mittels primärer Antikörper, sekundärer Peroxidase-gekoppelten Antikörper und die dadurch verursachte Chemilumineszenz auf Fotofilmen nachgewiesen. Nach dem Blotting wurde die Membran zunächst mit 1xTBST gewaschen und 30 Minuten in Blockierpuffer geschüttelt, um die unspezifischen Antigenbindestellen zu sättigen. Anschließend wurde die Membran mit dem Antigen-spezifischen primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x für 15 Minuten bei RT in TBST gewaschen, bevor der sekundäre *Horseradish-Peroxidase* (HRP)-gekoppelte Antikörper in Blockierpuffer hinzugefügt wurde. Nach 90 min Inkubation bei RT wurde die Membran erneut 3 x gewaschen. Mit Hilfe von ECL (*enhanced chemiluminescence*) erfolgte der visuelle Nachweis der Proteinbanden. Hierzu wurde die Reaktionslösung mittels ECL-Lösung A und B im Verhältnis 10:1 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angesetzt und für ca. 3 Minuten auf die Membran gegeben. In dieser Zeit setzte die HRP das in der Lösung enthaltene Luminol in Chemilumineszenz um, was später zur Schwärzung des Fotofilms führte. Die Membran wurde in eine Filmkassette überführt und in der Dunkelkammer mit einem Fotofilm bedeckt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Fotofilme entwickelt und fixiert.

## 3.2.2 Radioaktive Markierungen

### 3.2.2.1 <sup>125</sup>I- Markierung von Triglyzerid-reichen Lipoprotein Remnants (TRLR)

Um die Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen zu quantifizieren, wurden die Apolipoproteine der TRLR mittels der McFarlane Methode (McFarlane, 1958) mit <sup>125</sup>Iod markiert. Dabei werden die Tyrosinreste der Proteine iodiert.

Als Nachweis der  $^{125}\text{I}$ -markierten Apolipoproteine wurden die  $^{125}\text{I}$ -TRLR delipidiert, die Apoproteine aufgetrennt und auf einem Fotofilm nachgewiesen. Die  $^{125}\text{I}$ -TRLR wurden hierzu im Verhältnis 1:10 mit Chloroform:Methanol (8:5) versetzt, gevortext und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10% SDS bei 60°C für 20 Minuten gelöst. Die  $^{125}\text{I}$ -Apolipoproteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in eine Fotokassette überführt, mit einem Fotofilm bedeckt und ca. 4 Tage bei -80°C gelagert. Durch die  $\gamma$ -Strahlen der  $^{125}\text{I}$ -Apolipoproteine wurde der Film an den entsprechenden Banden geschwärzt. Der Fotofilm wurde anschließend entwickelt und fixiert.

### 3.2.2.2 Radioaktive Markierung von Glukose und Fettsäuren

Zur Quantifizierung der aufgenommenen Glukose und Fettsäuren in die verschiedenen Organe wurde den Mäusen entweder  $^3\text{H}$ -Deoxyglukose oder  $^3\text{H}$ -Triolein gavagiert.

Für die  $^3\text{H}$ -Deoxyglukose Gavage wurden 2ml einer 0,90909 g/ml Glukoselösung mit 300 $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Deoxyglukose (0,037 MBq; Perkin Elmer) zu einer 0,79 g/ml  $^3\text{H}$ -Deoxyglukose-Stocklösung gemischt. Mittels dieser Stocklösung wurde pro Maus 2 mg/g  $^3\text{H}$ -Deoxyglukose in 300 $\mu\text{l}$  (ad NaCl) gavagiert.

Für die  $^3\text{H}$ -Triolein Gavage wurde pro Maus ein Gemisch aus 2 $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Triolein und 200 $\mu\text{l}$  Olivenöl gavagiert.

### 3.2.3 Lipoprotein-Isolation aus Plasmen mittels Ultrazentrifugation

Das Herzblut von, mit 200 $\mu\text{l}$  Olivenöl gavagierten LDLR<sup>-/-</sup> hepatischen Lrp1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde 2 Stunden nach Gavage durch Punktion entnommen und 10 min bei 4°C und 10.000g zentrifugiert. Das daraus erhaltene Plasma, mit einer Dichte von  $\rho=1,006$  g/ml, wurde mit KBr auf eine Dichte von  $\rho=1,21$  g/ml gebracht und in einem SW40 Ultrazentrifugen Röhrchen (Beckmann) unter eine KBr Lösung von  $\rho=1,019$  g/ml mittels einer Kanüle unterschichtet. Anschließend wurde das Plasma über Nacht bei 4°C und 38.000 rpm in einem SW40 Rotor (Beckmann) ultrazentrifugiert. Die nun, wegen ihrer geringen Dichte, an der Oberfläche angereicherten TRLR Partikel wurden mit einer umgebogenen Kanüle abgenommen und über eine PD10-Säule nach Herstellerangaben in 1x PBS umgepuffert. Die Isolation humaner Lipoproteine wurde ebenso durchgeführt, nur mit humanen Plasmaproben.

### 3.2.4 Lipoproteinprofil-Bestimmung mittels FPLC

Die Plasmen eines Genotyps wurden zu gleichen Teilen gepoolt und über eine Spritze in die *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) Apparatur injiziert. Hier erfolgte die Auftrennung der Lipoproteine über eine S6-FPLC- Säule anhand der Partikel-Größe. Im Anschluss wurde

in den verschiedenen Fraktionen, wie in Abschnitt 3.2.1.8 beschrieben, die Triglyzerid- bzw. Cholesterin- Konzentration bestimmt.

### 3.2.5 Triglyzerid- und Cholesterin-Bestimmung

Für die Triglyzerid- und Cholesterin- Bestimmung wurde ein kommerzielles Kit (Roche) und der gleiche Lipid-Standard (Precipath) benutzt. Die Plasma Proben und der Standard wurden zuerst in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert, im Anschluss mit 200µl Triglyzerid- oder Cholesterin- Reagenz versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation kam es zur Hydrolyse der Cholesterylester und Triglyzeride, sodass ein rötlicher Farbstoff als Produkt der Oxidationsreaktion entstand. Anschließend wurde die Extinktion bei 540nm gemessen und der Triglyzerid- bzw. Cholesterin- Gehalt anhand des Standards bestimmt.

### 3.2.6 Freie Fettsäuren (FFA)-Bestimmung

Die nicht-veresterten freien Fettsäuren (NEFA) wurden anhand des NEFA-HR(2) Kits bestimmt. Dazu wurden die Proben und der Standard in eine Mikrotiterplatte pipettiert und im Verhältnis 1:10 mit der Lösung A versetzt. Es folgte eine Inkubation für 3 Minuten bei 37°C, wobei die NEFAs zu Acyl-CoA umgesetzt wurden. Im Anschluss wurde Lösung B im Verhältnis 1:3 zu Lösung A hinzugegeben und 4,5 min bei 37°C inkubiert. Hierbei wurde Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Oxidase zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt, was zusammen mit 2 weiteren Substraten und durch Einwirkung einer Peroxidase zur Bildung eines blau-violetten Farbkomplex führte. Dieser Komplex wurde bei einer Extinktion von 550nm detektiert. Anhand des Standards konnte der freie Fettsäuren Gehalt bestimmt werden.

### 3.2.7 RNA Isolierung aus Gewebe und Zellen

Die RNA wurde aus murinen Gewebe oder Zellen isoliert. Für die Isolation aus Mausgewebe wurde das schockgefrorene Gewebe mit ausreichend TRIzol versetzt und im TissueLyser zerkleinert. Die Zellen wurden hingegen mit 1xPBS gewaschen und lediglich in TRIzol aufgenommen. Die Gewebe- bzw. Zellsuspension in TRIzol wurde in einem 5/1 Volumenverhältnis mit Chloroform versetzt und durch sorgfältiges Vortexen gemischt. Im Anschluss wurden die Proben 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, sodass sich 3 Phasen bildeten. Die untere Phase enthielt die DNA, die mittlere Phase bestand aus Proteinen und in der oberen Phase befand sich die RNA, welche im Anschluss abgenommen und mit gleichem Volumen 70% Ethanol gefällt wurde. Anhand des NucleoSpin RNA II Kit (Macherey und Nagel) wurde im Anschluss die RNA isoliert. Dazu wurde das Ethanol-Gemisch auf eine Säule gegeben und für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die auf der Säule gebundene RNA wurde mit MDB (*membrane desalting buffer*) Puffer gewaschen und erneut 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Um verbliebene DNA zu entfernen, wurden die Säulen nun 15-30 min

mit rDNase inkubiert. Es folgten Waschschriffe mit RA2 und RA3 Puffern, zwischen denen jeweils 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Mit einer zusätzlichen Zentrifugation wurden alle Pufferreste entfernt. Zuletzt wurden jeweils 40µl H<sub>2</sub>O auf die Säulen pipettiert, 5 min bei RT inkubiert und 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

### 3.2.8 Umschreibung mRNA in cDNA mittels RT-PCR

Die Umschreibung der mRNA in cDNA wurde mit Hilfe des *cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 20µl wurden jeweils 400ng RNA zu cDNA umgeschrieben. Die entstandene cDNA wurde 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdunnt und galt als Vorlage für die quantitative *Realtime* PCR.

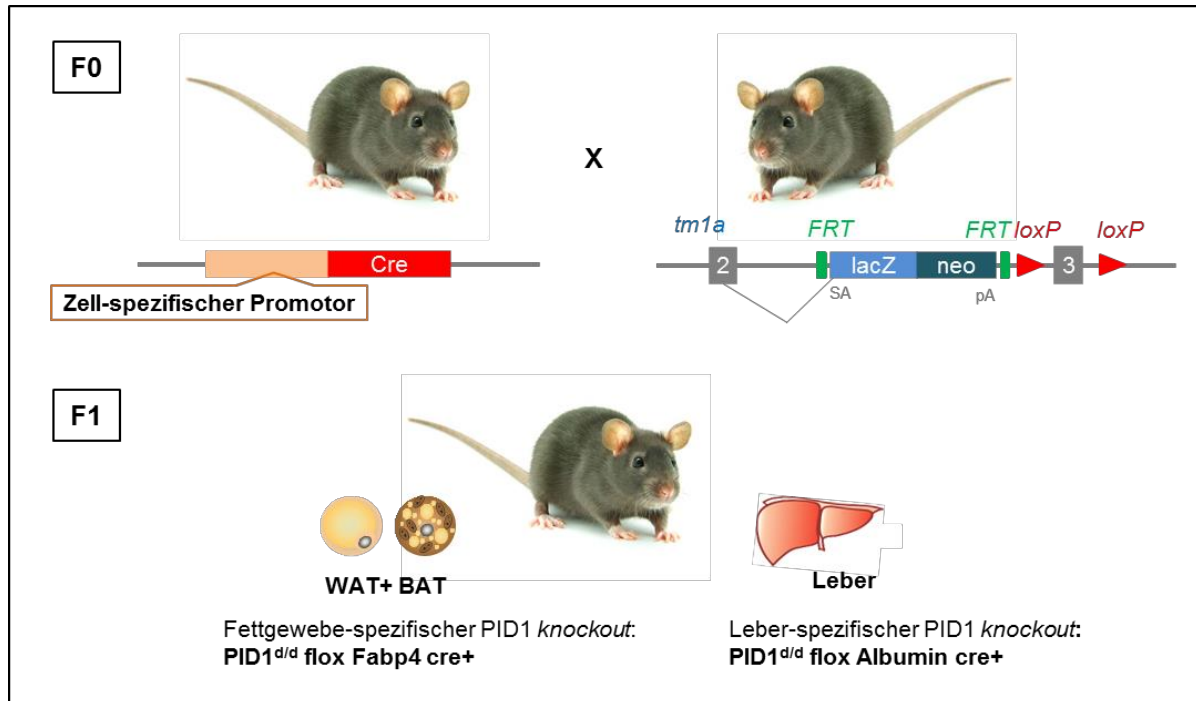
### 3.2.9 Quantitative *Realtime* PCR

Die quantitative *Realtime* PCR misst den PCR Verlauf verschiedener cDNAs und die jeweilige cDNA Quantität. Ermoglicht wird dies durch die Verwendung von *TaqMan Gene Expression Assays* und dem 7900HT Detektionssystem (Applied Biosystems). Die *Taqman* Sonden enthalten einen Reporterflourophor (3`-Ende) und einen Quencher (5`-Ende), welcher durch räumliche Nähe das Floureszenzsignal des Reporterflourophors unterdrückt. Die sequenzspezifische *Taqman* Sonde bindet zwischen den Primern und wird dadurch bei der Primer Extension durch die DNA Polymerase hydrolysiert. Die Hydrolyse der *Taqman* Sonden führt zur Trennung von Reporterflourophor und Quencher, wodurch die Floureszenz durch Anregung gemessen werden kann. Bei steigender Konzentration des Amplifikats durch die PCR kommt es zu vermehrter Hydrolyse der *Taqman* Sonden, sodass auch das Signal vom Reporterflourophor proportional stärker wurde. Für die spätere Analyse wurde der Schwellenwert zum Hintergrundsignal, C<sub>T</sub> (*cycle of treshold*), verwendet, bei dem das Floureszenzsignal das Hintergrundsignal ibersteigt. Die Kalkulation der Genexpression passierte anhand der 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>-Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Als Referenzgen wurde mTbp (*TATAbox binding protein*) verwendet.

### 3.2.10 Mausmodelle: Gewebespezifische PID1 *knockout* Mäuse

Die PID1 *knockout* Mäuse enthalten eine *Knockout-first*-Selektionskassette von KOMP Respiratory Konsortium, die zwischen dem zweiten und dritten Exon des PID1 Gen kloniert ist. Diese Kassette beinhaltet loxP-Sites, welche das Entfernen von Exon3 anhand einer Cre Rekombinase ermoglichen. Beim *Knockout-first* Modell ist das PID1 Genprodukt nicht funktional, da der *Splicing*- Akzeptor der Kassette die Synthese einer funktionalen mRNA beim alternativen *Splicing* verhindert. Durch das Kreuzen mit Mäusen, die nur gewebespezifisch die Cre Rekombinase exprimieren, kommt es einerseits zu dem Herausschneiden von PID1 in

diesem spezifischen Gewebe und andererseits zur Expression von funktionalen PID1 in allen anderen Geweben. Wie in Abbildung 3.2.2.1 gezeigt, wurden in dieser Arbeit Fettgewebe-spezifische ( $PID1^{d/d}$  flox Fabp4 cre+) und Leber-spezifische ( $PID1^{d/d}$  flox Albumin cre+) *knockout* Mäuse verwendet, welche als Tierlinien bereits etabliert waren.



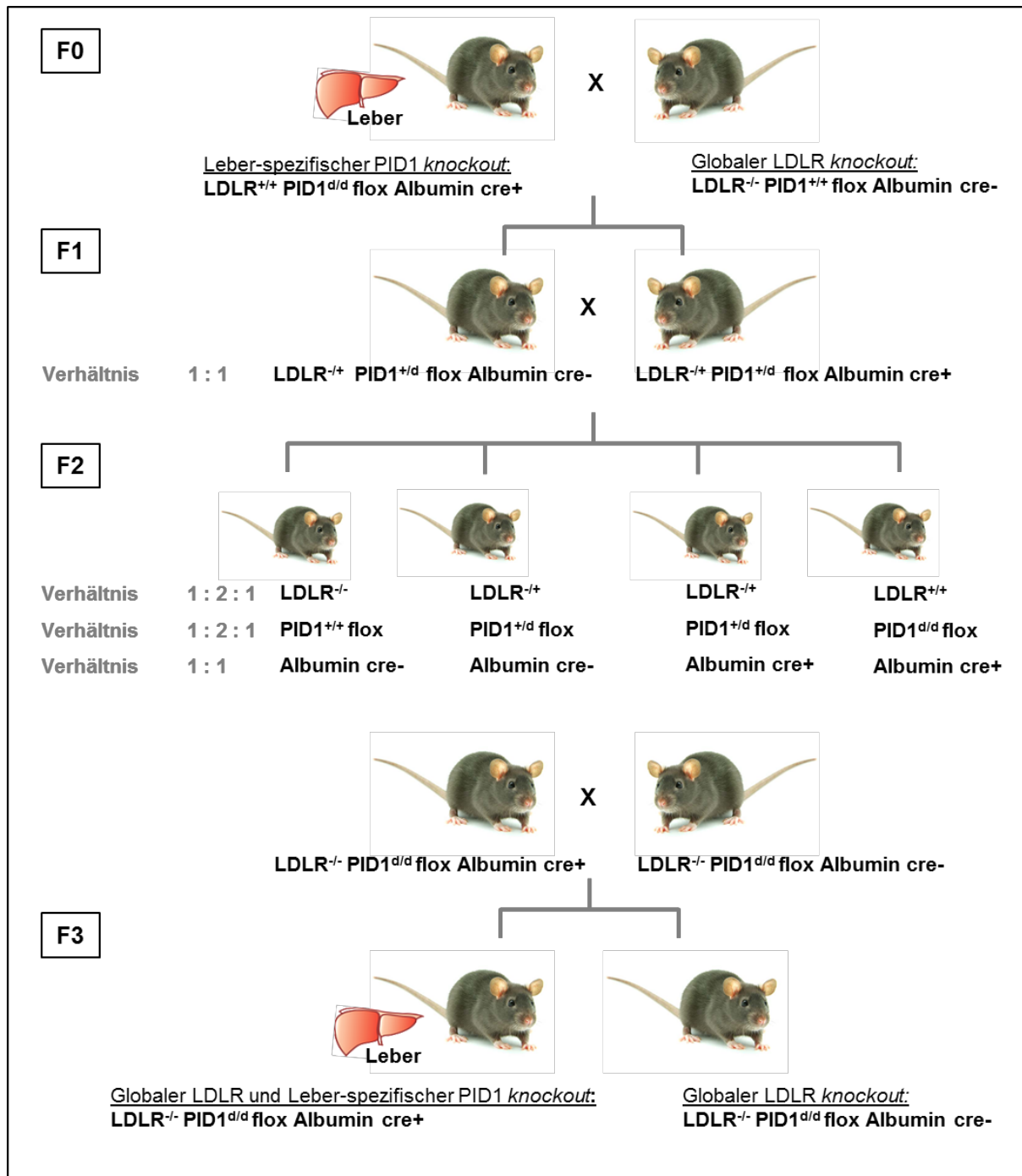
### Abb. 3.2.2.1 Fettgewebe- und Leber-spezifische *PID1 knockout* Mäuse

Die *PID1 Knockout-first-Selektionskassette* ermöglicht das Entfernen des 3. Exons durch 2 flankierenden *loxP* sites ( $PID1^{d/d}$  flox) und eine Cre Rekombinase. Die Kreuzung mit *Fabp4 cre+* Tieren ermöglicht somit einen Fettgewebe-spezifischen *PID1 knockout*, während die Kreuzung mit *Albumin cre+* Mäusen einen Leber-spezifischen *PID1 knockout* generiert.

#### 3.2.10.1 Generierung $LDLR^{-/-}$ $PID1^{d/d}$ flox Albumin cre-/+ Mäuse

Zur Generierung der  $LDLR^{-/-}$   $PID1^{d/d}$  flox Albumin cre-/+ Mäuse, wurden Leber-spezifische *PID1 knockout*-Mäuse ( $LDLR^{+/+}$   $PID1^{d/d}$  flox Albumin cre+) mit globalen *LDLR knockout*-Mäusen ( $LDLR^{-/-}$   $PID1^{+/+}$  flox Albumin cre-) gekreuzt. Der Verlauf der Kreuzung ist in Abbildung 3.2.10.1 dargestellt.





**Abb. 3.2.10.1 Generierung globaler LDLR und Leber-spezifischer PID1 knockout (LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup>) Mäuse**

Die Generierung von LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Mäusen erfolgte durch Kreuzung von globalen LDLR knockout Mäusen und Leber-spezifischen PID1 knockout Mäusen innerhalb 3 Generationen.

### 3.2.10.2 Genotypisierung mittels PCR

Die Genotypisierung der LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> erfolgte mittels 3 verschiedener PCRs. Zunächst wurde die DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Hierzu wurden die Biopsien über Nacht mit STE Puffer und Proteinase K (10mg/ml) bei 37°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Anschließend wurden die Proben mit 10% SDS versetzt, kurz invertiert und weiter mit NaCl gemischt, sodass die Proteine ausfallen. Die Proben wurden nun 15 min bei 4°C und

13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, mit 70% Ethanol vermischt und für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert, sodass die DNA gefällt wurde. Die pelletierte DNA wurde bei 45°C für ca. 1 Stunde getrocknet und dann in H<sub>2</sub>O (ad. Inject.) aufgenommen. Mittels der in H<sub>2</sub>O gelösten DNA wurden dann die PCRs durchgeführt.

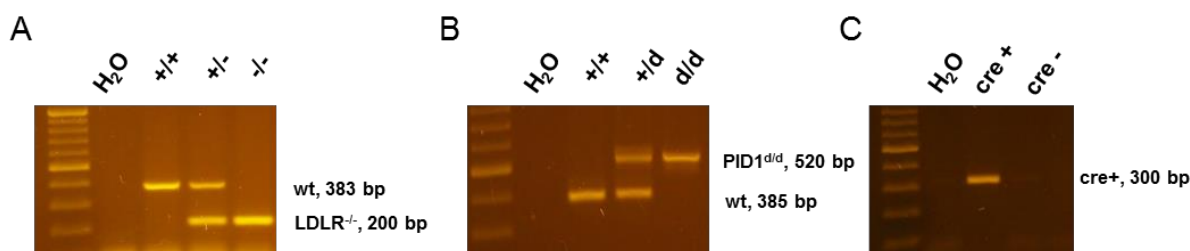
Die erste PCR hat den globalen LDLR<sup>-/-</sup> nachgewiesen, die zweite PCR galt dem Nachweis der PID1 *Knockout-first*-Selektionskassette (PID1<sup>d/d</sup>), während die letzte PCR die Cre-Rekombinase (cre<sup>+</sup> oder cre<sup>-</sup>) detektierte (Abb. 3.2.2.4). Die PCR Programme des Thermocyclers sind in Tabelle 3.2.2.3 aufgelistet.

**Tabelle 3.2.2.3: PCR Programme des Thermocyclers**

	LDLR <sup>-/-</sup>	PID1 <sup>d/d</sup>	Cre- Rekombinase
Initialisierung	95°C, 3 min	95°C, 2 min	95°C, 2 min
Denaturierung	95°C, 30 s	95°C, 30 s	95°C, 30 s
Annealing	62°C, 1 min	57°C, 30 s	58°C, 30 s
Extension	72°C, 30 s	72°C, 2 min	72°C, 30 s
Zyklen	40	40	35
Finale Extension	72°C, 5 min	72°C, 10 min	72°C, 5 min

### 3.2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglichte die Analyse der PCR Produkte, durch Auftrennung der DNA nach Größe. Zunächst wurde dafür ein 1,5% w/w Agarosegel aus Agarose, 1xTBE Puffer und dem DNA Farbstoff Roti-Safe (Roth) hergestellt. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine Gelelektrophorese-Kammer mit 1xTBE Puffer überführt, mit einer DNA Leiter und den Proben beladen und lief 50 min bei 90V. Anschließend wurden die DNA Banden mit Hilfe von UV Licht detektiert und fotografisch aufgenommen.



**Abb. 3.2.2.4 Genotypisierung der LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>+/-</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Mäuse mittels PCR**  
 Agarosegele mit PCR Produkten der A. LDLR<sup>-/-</sup>-PCR. Das Vorhandensein des Gens ist homozygot mit (+/+), heterozygot mit (+/-), oder homozygot nicht vorhanden mit (-/-) dargestellt B. PID1<sup>+/-</sup>-PCR. Das Nichtvorhandensein des Transgens ist homozygot mit (+/+) und heterozygot mit (+/d) dargestellt. Das homozygote Vorhandensein der PID1 Kasette wird mit (d/d) bezeichnet C. Cre Rekombinase-PCR. Die Cre Rekombinase wird durch die (cre<sup>+</sup>) Bande nachgewiesen.

### 3.2.11 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.11.1 Differenzierung *stromal vascular fraction* (SVF) Zellen zu primären braunen Adipozyten

Die Isolierung der braunen *stromal vascular fraction* (SVF) erfolgte zunächst durch die sterile Entnahme der 2 braunen iBAT Fettläppchen, welche zwischen den Schulterblättern liegen. Nach einem Waschschrift in NaCl wurden die Fettläppchen mit einer Schere in Isolationspuffer zerkleinert und in einen 50ml Falcon überführt. Es folgte eine 30 Minuten Inkubation bei 37°C im schüttelnden Wasserbad. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein 100µm Filter in 15ml Falkons gefiltert und 30 Minuten auf Eis gestellt. Die sich nach oben abgesetzten Fettzellen wurden abgesaugt, während die mittleren 2/3 der Zellsuspension über ein 40µm Filter in ein neues 15ml Falcon überführt wurden. Die überführte Zelllösung wurde im Anschluss 10 Minuten bei 700g pelletiert und in Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät, wobei die Zellen einer Maus für 2 x 6-Wellen reichten. *In vitro* wurde die Differenzierung der braunen SVF Zellen zu braunen Adipozyten, wie in Tabelle 3.2.3.1 dargestellt, durchgeführt.

**Tabelle 3.2.11.1: Differenzierung braune SVF zu primären braunen Adipozyten**

Tag	Medium	T3	Insulin	Ascorbat	Dexa	IBMX
T-4	Kulturmedium	++	+	+	-	-
T-3	Kulturmedium	++	+	+	-	-
T-2	Differenzierungsmedium	+	++	-	-	-
T0	Induktionsmedium	+	++	-	+	+
T+2	Differenzierungsmedium	+	++	-	-	-
T+4	Differenzierungsmedium	+	++	-	-	-
T+5	Hungermedium →Experimentent					

Insulin: ++= 20nM, += 4nM, T3: ++= 4nM, += 1nM,

Ascorbat: 25µg/ml, Dexamethason (Dexa): 1 µM, 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX): 0,5mM

#### 3.2.11.2 Trennung der SVF Zellen von reifen Adipozyten

Die Fettgewebe (iBAT, subWAT, epiWAT) wurden, wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben, entnommen, mit der Schere im Isolationspuffer zerkleinert und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Gewebesuspensionen 10 min bei RT und 700g zentrifugiert. Die obere Fettschicht mit den reifen Adipozyten wurde in TRIzol aufgenommen, während das Pellet resuspendiert und über ein 70µm Filter gefiltert wurde. Nach einem weiteren Zentrifugations- und Filterschritt über ein 30µm Filter, wurde das Pellet mit der SVF ebenfalls in TRIzol aufgenommen. Anschließend erfolgte die RNA Isolation.

### 3.2.11.3 Zell-Stimulation mit CL316,243

Die wie in Absatz 3.2.11.1 isolierten und ausdifferenzierten primären braunen Adipozyten wurden an Tag+5 für 4 Stunden mit 1µM CL316,243 (CL) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die freien Fettsäuren im Medium gemessen (Abschnitt 3.2.6) und die Zellen in TRIzol (Abschnitt 3.2.7) aufgenommen, um nach der RNA Isolation die Ucp-1 Expression zu bestimmen.

### 3.2.11.4 Zell-Stimulation mit Insulin

Die ausdifferenzierten primären braunen Adipozyten wurden an Tag+5 zunächst mit 1xPBS gewaschen und dann eine Stunde in Hungermedium bei 37°C gehalten. Entweder wurden die Zellen allein mit 10nM/Well Insulin für 15 Minuten bei 37°C stimuliert oder mit Zugabe von radioaktiv markierter <sup>3</sup>H-Deoxyglukose. Ersteres galt der Proteinisolation mittels RIPA Puffer für Western Blot Analysen, während letzteres die Insulin-abhängige Glukose-Aufnahme in wt und PID1<sup>-/-</sup> Adipozyten bestimmte. Hierbei wurden die Zellen ebenfalls in RIPA Puffer aufgenommen und mit *Scintillator* versetzt, um die β-Strahlen zu counten.

### 3.2.11.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz kann die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. Primäre SVF Zellen aus dem iBAT wurden auf Glas-Coverslips ausgesät und *in vitro* zu braunen Adipozyten ausdifferenziert. Am Tag der Ernte wurden die Zellen 2x mit 1xPBS gewaschen und im Anschluss ca. 30 min bei RT mit 4%PFA fixiert. Es folgten mehrere Waschschrte und der Nachweis via indirekter Immunodetektion (Abschnitt 3.2.1.3), wobei der 2. Antikörper an den Fluoreszenzfarbstoff Alex-Fluor gekoppelt war.

### 3.2.11.6 Isolierung primärer Hepatozyten

Mit Hilfe einer Leber-Perfusion wurden die primären Hepatozyten isoliert (Meredith, 1988). Hierzu wurde der 1xPerfusionspuffer frisch angesetzt und in einem 50°C warmen Wasserbad zunächst mit CO<sub>2</sub> für 15-30min begast. Die Maus (8-13 Wochen alt) wurde betäubt, desinfiziert und geöffnet, sodass die Pfortader freigelegt wurde. Die Leber wurde über die Pfortader mit ca. 500ml (7-8ml pro Minute) von dem 1xPerfusionspuffer perfundiert (1-1,5 Stunden). Danach wurde die perfundierte Leber entnommen und in Kulturmedium ausgeschüttelt. Die Zellsuspension wurde über ein 70µm Filter in ein 50ml Falcon pipettiert und 4 Minuten bei 28g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, anschließend mit Percoll-Dichtegradienten-Lösung und 10xPerfusionspuffer versetzt und invertiert. Es folgte eine Zentrifugation für 6 Minuten bei 855g. Das Pellet wurde erneut in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl anhand der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer

Konzentration von 100.000 Zellen/ml in Kollagen beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert. Nach ca. 1 Stunde wurde das Kulturmedium erneuert.

### **3.2.11.7 Endozytose-Experiment von <sup>125</sup>Iod-markierten TRLR**

Zunächst wurden die TRLR isoliert (Abschnitt 3.2.3) und mit radioaktiven <sup>125</sup>Iod markiert (Abschnitt 3.2.2.1). Anschließend wurde der Proteingehalt der <sup>125</sup>I-TRLR anhand der Lowry Methode bestimmt. Wie in Abschnitt 3.2.3.6 beschrieben, wurden die primären Hepatozyten isoliert und ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen und eine Stunde in Hungermedium gehalten, bevor die <sup>125</sup>I-TRLR in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt wurden (1/2/5µg/ml Protein). Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 oder 4 Stunden. Nach 1 Stunde wurde lediglich die Aufnahme bestimmt, während nach 4 Stunden die Aufnahme und der Abbau quantifiziert wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Eis überführt und 2x für 5min mit eiskaltem PBS-Heparin und 1x mit nur PBS gewaschen. Eine 1:1 Mischung aus Trypsin/ETDA und Kollagenase NB 8 (10mg/ml in PBS) wurde auf die Zellen gegeben, gefolgt von einer 5 min Inkubation bei 37°C. Die Zellen konnten nun durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm wurden die Zellen pelletiert, kurz mit kaltem 1xPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 0,1 M NaOH Lösung aufgenommen und im γ-Counter gecountet.

Nach 4 Stunden Inkubation wurde zusätzlich die Degradation der <sup>125</sup>I-TRLR bestimmt. Hierzu wurde das Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und mit eiskalter 50% TCA Lösung versetzt. Das Gemisch wurde gründlich gevortext und anschließend 30 min auf Eis gesetzt, um die nicht degradierten <sup>125</sup>I-TRLR zu präzipitieren. Die Proben wurden danach 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand, mit dem <sup>125</sup>Iod und den noch freien <sup>125</sup>Iodid-Ionen, wurde mit Na-Iodid gemischt. Anschließend wurden die <sup>125</sup>Iodid-Ionen durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu <sup>125</sup>Iod oxidiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde den Proben Chloroform zugefügt. In diesem Schritt wurde das freie <sup>125</sup>Iod in der Chloroform Schicht extrahiert und konnte durch eine weitere Zentrifugation von dem Abbauprodukt der <sup>125</sup>I-TRLR (<sup>125</sup>I-Monoiodod-Tyrosin) getrennt werden. Das <sup>125</sup>I-Monoiodod-Tyrosin befand sich nun in der oberen wässrigen Phase und wurde im γ-Counter gemessen.

## **3.2.12 Metabolische Analysen**

### **3.2.12.1 Orale Glukose-Toleranztest (OGTT)**

Als Voraussetzung für den Oralen Glukose Toleranz Test (OGTT) wurden die Mäuse zunächst gewogen, um die jeweilige Glukosemenge pro Körpergewicht (2mg/g) anzusetzen, und für 4 Stunden gefastet. Der Nullwert wurde kurz vor der Glukose-Gavage mit Hilfe der AccuCheck-Aviva-Teststreifen gemessen. Mit Hilfe einer Schlund-Sonde wurden die Mäuse anschließend

gavagiert und die Blut-Glukose wurde erneut mittels der Teststreifen nach 15, 30, 60 und 120 Minuten bestimmt.

### **3.2.12.2 Oraler Fett-Toleranztest (OFTT)**

Für den Oralen Fett Toleranz Test (OFTT) wurden die Tiere zunächst für 4 Stunden gefastet und erhielten daraufhin eine 200µl Olivenöl Gavage. Vor der Gavage und 60, 120 und 240 Minuten danach wurde den Mäusen Blut entnommen, mittels Schwanzpunktion. Das Blut wurde 10 Minuten bei 4°C und 10.000g zentrifugiert, um das Plasma zu gewinnen. Um die postprandiale Lipid *clearance* zu untersuchen, wurde im Plasma der Triglyzerid- und Cholesterin-Gehalt gemessen.

### **3.2.12.3 Organ-Aufnahme radioaktiv markierter Glukose und Fettsäuren**

Um die Organ-Aufnahme radioaktiv markierter Glukose oder Fettsäuren zu messen, erhielten die Mäuse entweder eine <sup>3</sup>H-Deoxyglukose Gavage oder eine <sup>3</sup>H-Triolein Gavage (Abschnitt 3.2.2.2). Nach verschiedenen Zirkulationszeiten wurden die Tiere mit einer Ketamin/Rompun Mischung narkotisiert und anschließend die Organe entnommen. Im Fall der <sup>3</sup>H-Deoxyglukose Gavage nach 120 min Zirkulation, hingegen bei der <sup>3</sup>H-Triolein Gavage nach 240 min. Zunächst wurde das Blut durch eine Herzpunktion des rechten Ventrikels entfernt. Daraufhin wurde das rechte Atrium angeschnitten, um die Organe der Maus über den linken Ventrikel zu perfundieren. Dies geschah mit ca. 10 ml PBS-Heparin (10U/ml). Im Anschluss wurden die Organe entnommen, gewogen und mit dem 10-fachen Volumen *Solvable* über Nacht bei 60°C gelöst. Am nächsten Tag wurden die gelösten Gewebe mit *Scintillator* versetzt, um die β-Strahlen zu detektieren. Hierbei wurden die β-Strahlen, welche vom <sup>3</sup>H emittiert werden, durch die im *Scintillator* enthaltenen aromatischen Moleküle und Szintillatoren in Photonen umgewandelt und somit nachgewiesen. Die Counts wurden anschließend auf mg bzw. das Organgewicht gerechnet.

### **3.2.12.4 Intravital Mikroskopie**

Die intravital Mikroskopie, mit Hilfe des Nikon A1 Konfokalen Mikroskop, wurde wie in Bartelt et al. 2011 beschrieben durchgeführt. Die Mäuse wurden über Nacht gefastet und bekamen anschließend Insulin (1U/kg BW) oder Saline i.p. injiziert. Mittels Isofluran wurden die Tiere narkotisiert (4% Isofluran in O<sub>2</sub>), bevor ein Katheter in die Schwanzvene eingeführt wurde. Die Mäuse wurden geöffnet und die Leber wurde an einem Coverglas zum Mikroskopieren angebracht. Über den Katheter wurden 0,1 mg des Cy5-anti Lrp1 Antikörper in 100µl Endvolumen hinzugegeben. Die Antikörperbindung wurde für 10 Minuten detektiert.

Das Cy5-*Labelling* des Antikörpers erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Cy5-labelling Kit, GE Healthcare). Hierzu wurden 1mg Antikörper mit dem Farbstoff Mix (in 0,1 M Bicarbonat

Lösung) für 1 Stunde bei 300 rpm und RT inkubiert. Im Anschluss wurde der ungebundene Farbstoff über eine PD10 Säule (GE Healthcare) entfernt, wonach der Cy5-gelabelte Antikörper in 0.9% NaCl Lösung vorlag.

### **3.2.12.5 Western Type Diät Studie**

Die *Western Type* Diät (WTD) Fütterung ermöglicht, durch hohen Fett- und Cholesterin Gehalt, ein Diät-induziertes Krankheitsmodell (Getz and Reardon, 2006). Die Mäuse wurden für 8 oder 12 Wochen, beginnend im Alter von 8 Wochen, mit einer WTD Diät gefüttert, um unterschiedliche Stadien der Atherosklerose untersuchen zu können. Die Diät enthält: Cholesterin 0.2%, Rohfett 21.2%, Rohprotein 17.1%, Rohfaser 5.0, Rohasche 4.5, N-freie Extraktstoffe 48.8, Stärke 14.6%, Zucker 33.2% und wurde von der Firma SSniff® (EF R/M acc.TD88137 mod) hergestellt.

### **3.2.12.6 Atherosklerose-Studien**

#### **3.2.12.6.1 *En face* Färbung der murinen Aorten**

Die *en face* Färbung der murinen Aorten ist ein Nachweis für Atherosklerose und ein Indikator für die Schwere der Krankheitsausprägung. Nach dem Narkotisieren, Öffnen und Perfundieren der WTD gefütterten Mäuse wurde das Herz samt Aorta entnommen. Im zweiten Schritt wurde das Herz abgetrennt und die Aorta in 4% PFA bei 4°C gelagert (mindestens über Nacht). Unter dem Binokular wurden die Aorten gründlich gereinigt und in der Mitte aufgeschnitten, bevor sie flach auf eine Wachsunterlage gepinnt wurden. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass die Aorten in Flüssigkeit waren. Die durch die Atherosklerose entstandenen Plaques wurden mittels einer Sudan IV Färbelösung in einer 15 minütigen Inkubation bei RT auf dem Schüttler angefärbt. Anschließend wurden die Aorten 5 Minuten mit 80% Ethanol und danach 3 x 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Die Aorten wurden fotografiert und die rot angefärbte Plaque-Fläche anhand des Programms ImageJ quantifiziert.

#### **3.2.12.6.1 Analyse der Aorten-Wurzel**

Die WTD gefütterten Mäuse wurden wie in Abschnitt 3.2.4.5 perfundiert und geöffnet. Anschließend wurden die Herzen entnommen und in 4% PFA bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Herzen zuerst 2 x für 2 Stunden in 1x PBS, dann für 2 Stunden in 50% Ethanol gewaschen und zuletzt in 70% Ethanol überführt und bei 4°C gelagert. Für die Paraffinschnitte wurde zunächst die Herzspitze (Apex cordis) entfernt, um die Herzen aufrecht zu positionieren, bevor sie in Paraffin eingebettet wurden. Anschließend wurden von der kranialen Seite, also der Herzbasis (Basis cordis), mehrere 10µm breite Paraffinsektionen geschnitten, um die Läsionen der Aorten-Wurzel zu erfassen. Jeder 10. Paraffinschnitt, also in 100µm Abständen, wurde mit einer modifizierten van Gieson Färbung angefärbt (siehe

Tabelle 3.2.12.6.1), um Kollagen und Bindegewebe anzufärben. Die Analyse der Läsionsfläche erfolgte ebenfalls mit dem ImageJ Programm.

**Tabelle 3.2.12.6.1: Ablauf modifizierte van Gieson Färbung**

1.	Histoclear (x3)	5 Minuten
2.	100% EtOH (x2)	5 Minuten
3.	90% EtOH (x2)	5 Minuten
4.	70% EtOH (x2)	5 Minuten
5.	PBS Waschschrift	5 Minuten
6.	Weigert's Iron Hematoxylin	10 Minuten
7.	Waschschritte mit Leitungswasser (x2)	bis es klar ist
8.	Van Gieson Lösung	5 Minuten
9.	Essigsäure 0.5% (x2)	kurzes Eintauchen
10.	Anilinblau 0.3%	ca. 2 Sekunden
11.	Essigsäure 0.5% (x2)	Kurzes Eintauchen
12.	80% EtOH	kurzes Eintauchen (4x)
14.	90% EtOH	kurzes Eintauchen (5x)
15.	100% EtOH (x2)	kurzes Eintauchen (6x)
16.	Histoclear (x3)	kurzes Eintauchen (6x)
17.	Coverglas aufsätzen	

### 3.2.13 Tierhaltung

Mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des UKE Hamburg und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Stadt Hamburg wurden alle Tierexperimente durchgeführt. Die Tiere wurden bei einem 12 Std-Tag/Nacht-Zyklus und konstanter Raumtemperatur (22°C) mit *ad libitum* Wasser und Futter (Chow/WTD) Zugang gehalten.

### 3.2.14 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM oder  $\pm$ STABWN dargestellt. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde die statistische Signifikanz mittels des *Student's t*-Test (zweiseitig, ungepaart) bestimmt. Hierbei wurde  $P < 0,05$  als statistische Signifikanz definiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2010.



## 4 ERGEBNISSE

In der Doktorarbeit von Kirstin Albers wurde gezeigt, dass das Adaptorprotein *phosphotyrosin-interacting domain containing 1* (PID1) bedeutend für Lokalisation und Funktion von LRP1 in Leberzellen ist. In PID1<sup>-/-</sup> Hepatozyten ist LRP1 kaum noch in den perinuklearen Endosomen vorhanden, sondern vermehrt an der Plasmamembran zu finden. Demzufolge scheint PID1, als Bindepartner von LRP1, essentiell für die intrazelluläre Retention von LRP1 zu sein. Durch den PID1 *knockout* kann die Insulin-stimulierte Translokation von LRP1 nicht mehr stattfinden, jedoch ist die basale Aufnahme von TRLR, im Vergleich zu Wildtyp (wt) Hepatozyten, erhöht. Ein weiterer Effekt der PID1 Depletion ist die (kompensatorische) Hochregulation des LDLR in der Leber, weswegen die verbesserte TRLR-Aufnahme in PID1<sup>-/-</sup> Leberzellen nicht eindeutig auf die veränderte LRP1 Lokalisation zurückzuführen ist.

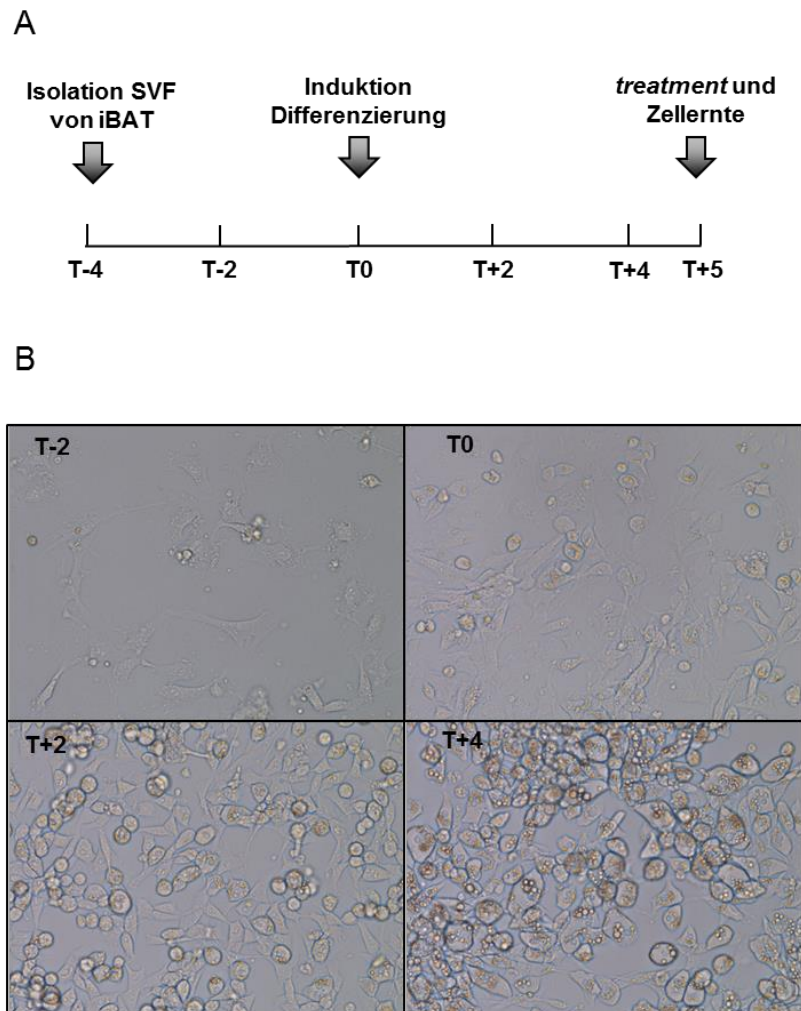
In Adipozyten ist LRP1 Teil der Glut4 *storage vesicles* (GSV), welche den Glukosetransporter Glut4 ebenfalls Insulin-vermittelt an die Plasmamembran bringen. PID1<sup>-/-</sup> Mäuse haben im gefasteten Zustand geringere Blut-Glukose und –Insulin-Werte, zudem zeigen sie eine erhöhte Glukose-Aufnahme ins Fett- und Muskelgewebe während eines OGTTs. In diesem Kontext ist zu vermuten, dass PID1 auch in Adipozyten für die Retention von LRP1 und somit von Glut4 verantwortlich ist, sodass ein PID1 Verlust zu erhöhter Glut4 Dichte an der Plasmamembran in Adipozyten führt.

Auf Grund der verbesserten Lipid- und Glukose-Aufnahme in die stoffwechselaktiven Organe, insbesondere Leber- und Fettgewebe der globalen PID1 *knockout* Mäuse (Doktorarbeit Kirstin Albers), wurden in dieser Arbeit Leber- und Fettgewebe-spezifische PID1 *knockout* Mäuse generiert und insbesondere im Bezug auf den postprandialen Energiestoffwechsel charakterisiert. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt.

### 4.1 Fettgewebe-spezifische PID1 *knockout* Mäuse

#### 4.1.1 *In vitro* Differenzierung der SVF aus dem iBAT zu primären braunen Adipozyten

Um die molekularen Grundlagen der erhöhten Glukose-Aufnahme in die Fettgewebe der PID1<sup>-/-</sup> Mäuse auch *in vitro* auf Zellebene zu analysieren, wurde ein Protokoll zur Isolation und Differenzierung primärer brauner Adipozyten etabliert. Hierbei wurde die *stromal vascular fraction* (SVF) aus mehreren (gepoolten) iBATs isoliert. *In vitro* wurden die in der SVF enthaltenen Prä-Adipozyten durch verschiedene Zusätze (Tabelle 3.2.11.1) in reife braune Adipozyten differenziert (Abb. 4.1.1 A+B).

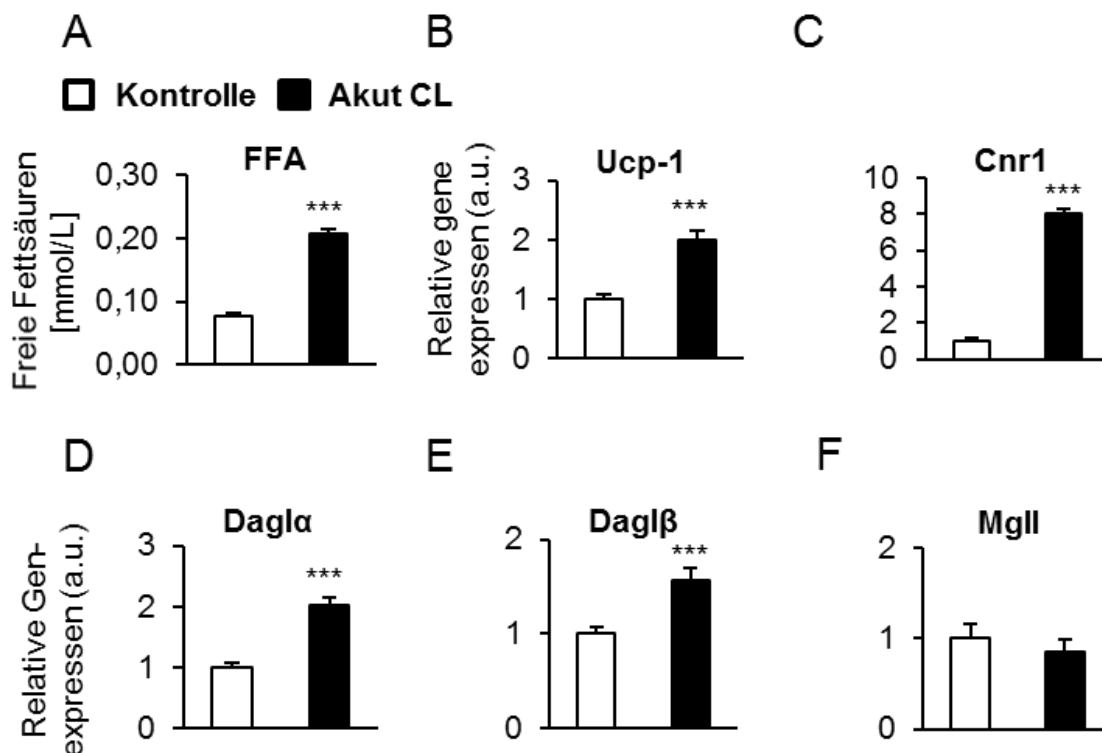


**Abb. 4.1.1 Verlauf *in vitro* Differenzierung primärer brauner Adipozyten**

A. Schematische und B. visuelle Darstellung der stromal vascular fraction (SVF) Isolation und *in vitro* Differenzierung zu primären braunen Adipozyten

#### 4.1.1.1 Charakterisierung der primären braunen Adipozyten anhand akuter CL-316,243 Stimulation.

Die *in vitro* differenzierten primären braunen Adipozyten wurden mittels akuter CL-316,243 (CL) Behandlung stimuliert, um die *in vivo* Situation im aktivierten BAT nachzustellen. CL ist ein  $\beta$ 3-adrenerger Agonist, welcher die Aktivierung des braunen Fetts induziert. Durch CL Zugabe wurde wie erwartet die Ucp-1 Expression (Abb.4.1.1.1 B). und die Menge an freien Fettsäuren im Medium signifikant erhöht (Abb.4.1.1.1 A). In der Literatur wurde ein Zusammenhang zwischen der BAT Aktivierung und dem Endocannabinoid (EC) System beschrieben (Boon et al., 2014; Perwitz et al., 2006), sodass ebenfalls die Genexpression von EC Genen mit und ohne CL Stimulation untersucht wurde. Der EC Rezeptor CB1 (Cnr1) sowie die 2-Arachidonylglycerol (2-AG) Synthese Enzyme Dagla und Daglb wurden durch CL Stimulation signifikant höher exprimiert, während die Expression des 2-AG abbauenden Enzyms, die Mgl, unverändert war.



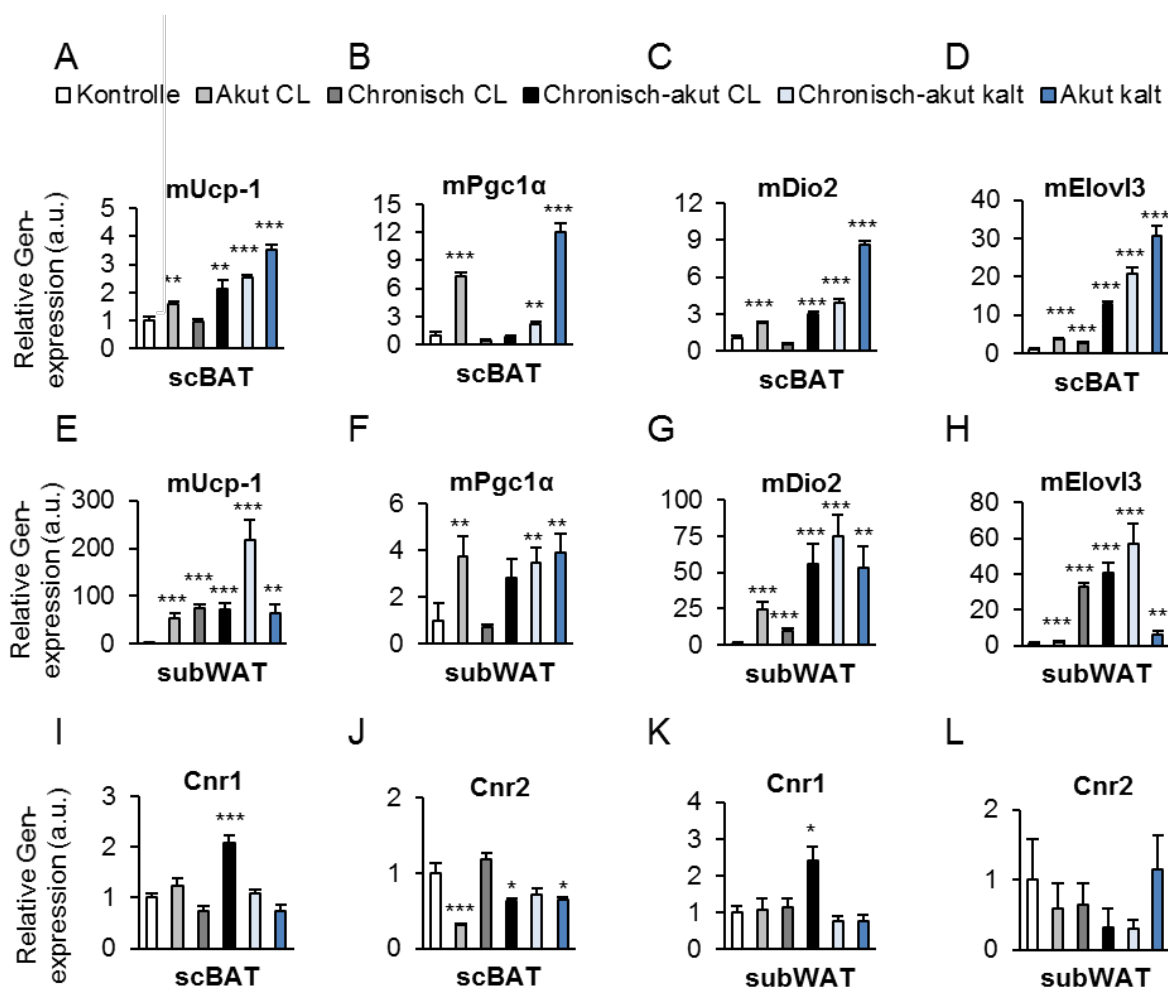
#### Abb.4.1.1.1 Charakterisierung der primären braunen Adipozyten anhand CL-316,243 Stimulation.

Die stromal vascular fraction (SVF) wurde aus gepoolten iBATs isoliert und die darin enthaltenen Präadipozyten zu primären braunen Adipozyten differenziert. Anschließend wurden die Adipozyten mit NaCl (Kontrolle) oder mit dem CL Agonisten ( $1\mu\text{M}$ ) für 4 Stunden inkubiert. A. Freie Fettsäuren wurden im Zellmedium bestimmt. B. Relative Expression von Ucp-1 in primären braunen Adipozyten, normalisiert auf mTbp. C.-F. Relative Expression von CB1(Cnr1) und 2-AG Synthese (mDagla/β)- und Degradations (mMgll)-Genen in primären braunen Adipozyten, normalisiert auf mTbp. (\*\*\*) $p < 0,001$

#### 4.1.2 Einfluss der BAT Aktivierung auf EC Rezeptor Genexpression *in vivo*

Die veränderten Expressionsdaten des EC Systems nach akuter CL Stimulation in primären braunen Fettzellen wurden anschließend *in vivo* untersucht. Einerseits, um die *in vitro* Daten *in vivo* nachzuweisen und dadurch die primären braunen Fettzellen als geeignetes Zellmodell zu bestätigen, andererseits um die Genexpression der EC Rezeptoren nach Kälteexposition und CL-Behandlung in noch weiteren Fettgeweben zu messen. In diesem Versuch wurden C57BL/6J (wt) Mäuse entweder akut (4 Stunden), chronisch (7 Tage) oder akut-chronisch (7 Tage+4 Stunden) bei  $4^{\circ}\text{C}$  gehalten oder mit CL behandelt. Beide Behandlungen stimulieren die  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptoren der Fettgewebe, jedoch gibt es auch unterschiedliche Effekte. Die Kälte-Behandlung ist durchgängig, während CL 1x täglich injiziert wird und anschließend nur 3-4 Stunden zirkuliert. Das durch Kälte ausgeschüttete Noradrenalin wirkt zudem auf noch weitere Adrenozeptoren im braunen Fettgewebe sowie die  $\beta_2$ - und  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren (Lafontan and Berlan, 1993). Anschließend wurde die Genexpression von BAT Aktivierungsmarkern und die der EC Rezeptoren im scBAT und subWAT via Taqman PCR

bestimmt. Das subWAT wurde hierbei analysiert, da es am meisten beige Fettzellen nach  $\beta$ 3-adrenerger Stimulation hervorbringt (Rosenwald et al., 2013). Sowohl die CL als auch die Kälte-Stimulationen induzierten signifikant, mit variierendem Ausmaß, die Expression der BAT Aktivierungsmarker: Ucp-1, Pgc1 $\alpha$ , Dio2 und Elovl3 im scBAT und subWAT (Abb.4.1.2 A-H). In beiden Geweben führte die chronisch-akute CL Behandlung zu einem signifikanten Expressionsanstieg von CB1 (Abb.4.1.2 I+K). Nur im scBAT wurde CB2 durch akute und chronisch-akute CL Stimulation sowie durch akute Kälte-Behandlung signifikant runterreguliert (Abb.4.1.2 J).

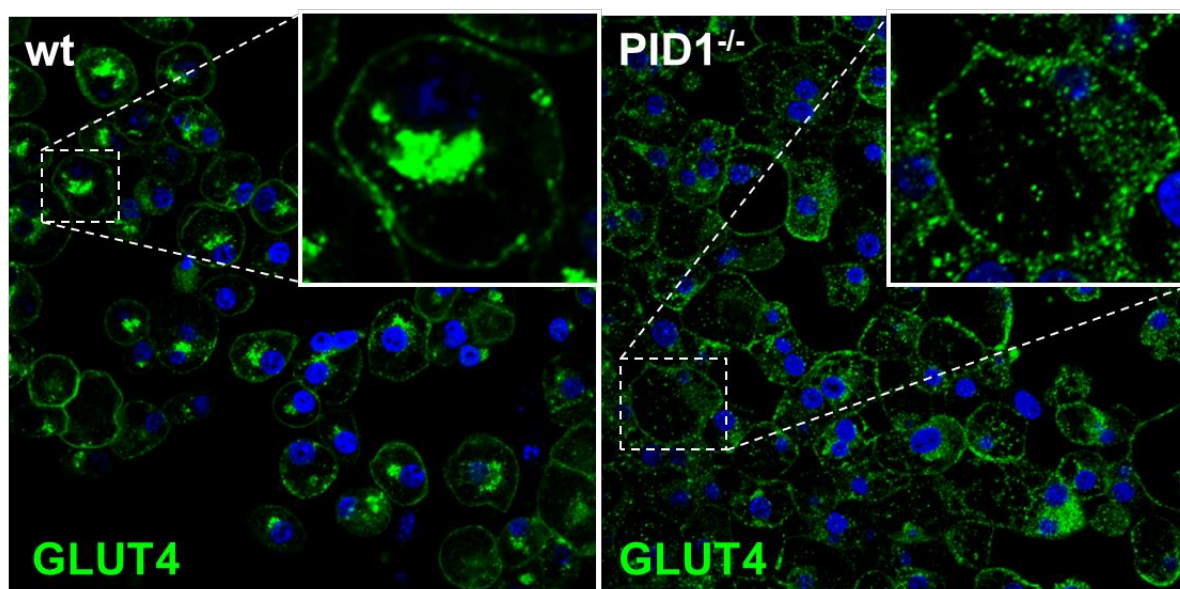


**Abb. 4.1.2 Die Behandlung mit dem  $\beta$ 3-adrenergen Agonisten CL-316,243 (CL) und Kälte aktivieren die Thermogenese im braunen Fett (scBAT), induzieren browning im weißen Fett (subWAT) und verändern die EC Rezeptor Expressionen in beiden Fettgeweben.** C57BL/6J (wt) wurden mit Chow Diät gefüttert und bei 27°C gehalten (Kontrolle=weiße Balken). Um das braune Fett zu aktivieren und das browning des weißen Fetts zu induzieren, erhielten die Mäuse eine CL Injektion( akut CL=graue Balken), wurden 7 Tage mit CL behandelt (chronisch CL=dunkel graue Balken), wurden 7 Tage mit CL behandelt plus finaler CL Injektion (chronisch-akut CL=schwarze Balken), wurden 7 Tage bei 4°C gehalten (chronisch-akut kalt=hellblaue Balken) oder nur 1 Tag bei 4°C gehalten (akut kalt=dunkelblaue Balken). A-D. Relative Genexpression von BAT Aktivierungsmarkern in subkutanen BAT (scBAT) auf mTbp normalisiert. E-H. Relative Genexpression von BAT Aktivierungsmarkern in subkutanen WAT (subWAT) auf mTbp normalisiert. I-L. Relative Genexpression von EC Rezeptoren Cnr1 und Cnr2 in scBAT und subWAT auf mTbp normalisiert. (\*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001)

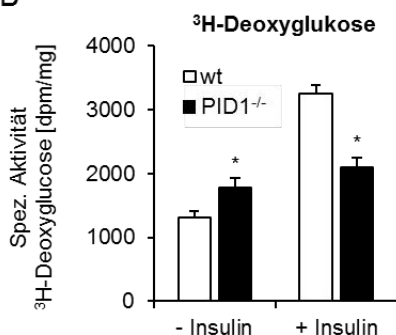
#### 4.1.3 Insulin-Stimulation primärer brauner Adipozyten von wt und PID1<sup>-/-</sup> Mäusen

Nachdem die *in vitro* Differenzierung der primären braunen Adipozyten etabliert war, konnten Insulin-Stimulationsexperimente durchgeführt werden, um die Rolle von PID1 für die GSV Translokation und Glukose-Aufnahme zu untersuchen. Hierzu wurden primäre braune Adipozyten aus wt und PID1<sup>-/-</sup> Mäusen 15 Minuten +/- Insulin (10nM) bei 37°C stimuliert und anschließend analysiert. In unstimulierten wt Adipozyten war Glut4 vor allem perinukleär zu finden, während die PID1<sup>-/-</sup> Adipozyten eine erhöhte Glut4 Dichte an der Plasmamembran aufwiesen (Abb.4.1.3 A). Um die Auswirkungen der erhöhten GLUT4-Dichte an der Plasmamembran auf die Glukose-Aufnahme zu untersuchen, wurden Adipozyten (+/- Insulin-Stimulation) mit radioaktiv markierter <sup>3</sup>H-Deoxyglukose inkubiert. In den unstimulierten Adipozyten wurde eine signifikant höhere Aufnahme in die PID1<sup>-/-</sup> Adipozyten, im Vergleich zu den wt Zellen, detektiert. Die Insulin-stimulierte Glukose-Aufnahme war jedoch signifikant niedriger in den PID1<sup>-/-</sup> Adipozyten, verglichen mit wt Zellen (Abb.4.1.3 B). Anschließend wurde das Insulin *signalling* nach +/- Insulin-Behandlung untersucht. Die Insulin-Stimulation von Adipozyten führt intrazellulär zur Phosphorylierung von Akt an S473 (P-Akt), welche hier mittels Western Blot nachgewiesen wurde. Das Verhältnis von P-Akt zu Total Akt war nach Insulin-Stimulation in beiden Genotypen gleich. Bei Glut1 und LRP1 wurde zwischen den Genotypen und +/- Insulin ebenfalls kein Unterschied nachgewiesen. Hingegen war der Proteingehalt von Glut4 in den PID1<sup>-/-</sup> Adipozyten geringer, verglichen mit den wt Kontrollen (Abb.4.1.3 C).

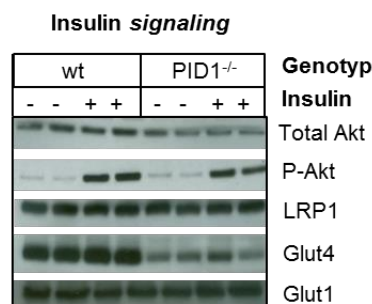
A



B



C

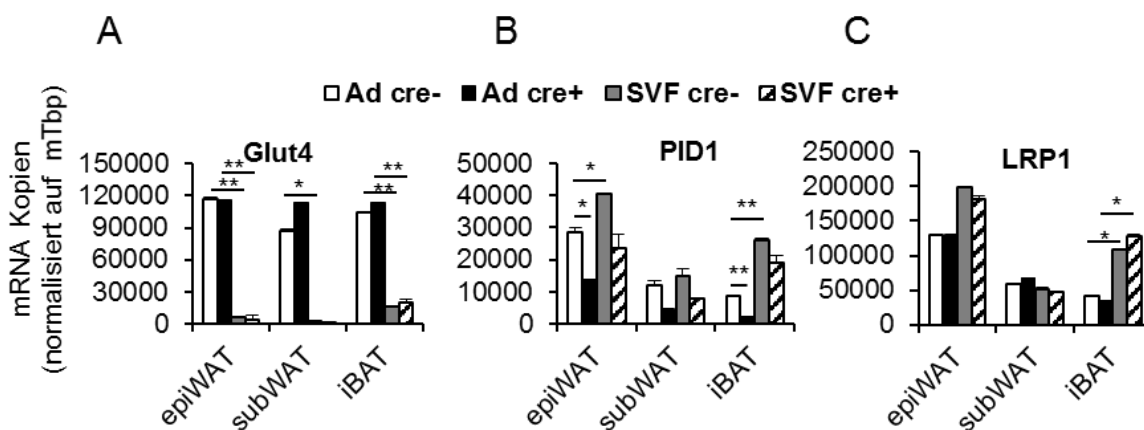


**Abb.4.1.3 Primäre braune Adipozyten von wt und PID1<sup>-/-</sup> Mäusen +/- Insulin-Stimulation**  
 A Immunfluoreszenzanalyse von Glut4 (grün) in unstimulierten, primären braunen Adipozyten von wt und PID1<sup>-/-</sup> Mäusen. B. Primäre braune Adipozyten aus wt und PID1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden für 1 Stunde gefastet und anschließend für 15 Minuten mit <sup>3</sup>H-Deoxyglucose und +/- 10nM Insulin bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in RIPA Puffer aufgenommen, um den Proteingehalt mittels Lowry zu bestimmen. Die Zellysate wurde gecountet und in Relation zur Proteinmenge angegeben. C. Primäre braune Adipozyten wurden für 1 Stunde gefastet und anschließend für 15 Minuten mit +/- 10nM Insulin bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in RIPA Puffer aufgenommen und die Proteinmenge mit Hilfe von Lowry gemessen. Anhand SDS PAGE und der Western Blot Methode wurden Total Akt, P-Akt, LRP1, Glut4 und Glut1 in den, in gleichen Mengen eingesetzten, Proteinlysaten nachgewiesen. (\*P<0,05)

#### 4.1.4 Glut4, LRP1 und PID1 Nachweis in SVF und reifen Adipozyten von Fettgewebespezifischen PID1 knockout Mäusen

Aufgrund des *in vivo* und *in vitro* beobachteten PID1<sup>-/-</sup> Effekts auf die Glut4 Lokalisation und Glukose-Aufnahme ins Fettgewebe wurden Fett-spezifische PID1 *knockout* Mäuse generiert (PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp cre<sup>-/+</sup>). Zunächst wurde die Expression von Glut4, LRP1 und PID1 auf zellulärer Ebene in verschiedenen Fettdepots untersucht. Dazu wurden die stromal vascular fraction (SVF) Zellen und reifen Adipozyten (Ad) aus dem epiWAT, subWAT und iBAT isoliert

und mittels Taqman PCR die mRNA-Menge analysiert. Wie in der Literatur beschrieben (Seale et al., 2011) wurde Glut4 in allen 3 Fettgeweben lediglich in reifen Adipozyten exprimiert (Abb.4.1.4 A), während LRP1 im subWAT und iBAT vermehrt in der SVF exprimiert wurde (Abb.4.1.4 C). PID1 war wie erwartet in den PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>+</sup> SVF Zellen und reifen Adipozyten herunterreguliert (Abb.4.1.4 B), ohne die Expression von Glut4 oder LRP1 zu beeinflussen (Abb.4.1.4 A+C). Ähnlich wie LRP1 war PID1 in der SVF von subWAT und iBAT stärker exprimiert als in den reifen Adipozyten beider Gewebe (Abb.4.1.4 B).



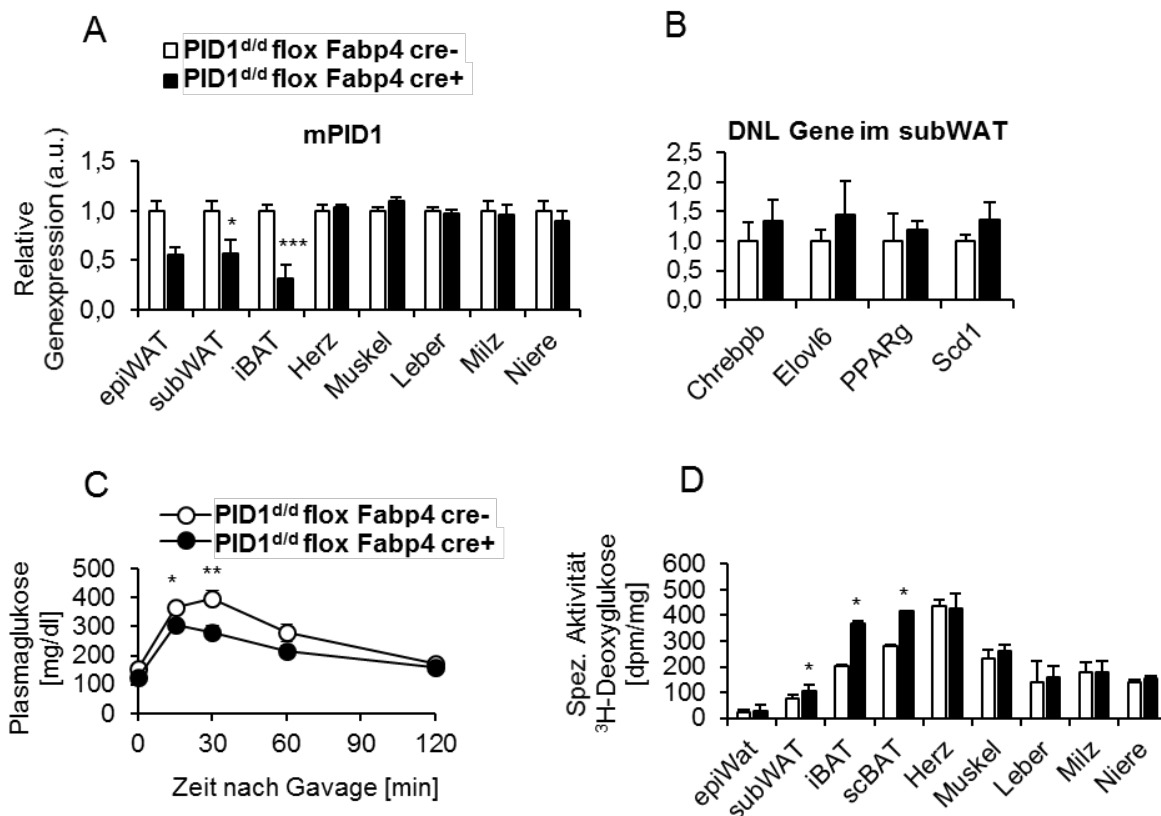
**Abb.4.1.4 Genexpressionsvergleich zwischen stromal vascular fraction (SVF) Zellen und reifen Adipozyten (Ad) in Fettgeweben von Fettgewebe-spezifischen PID1 knockout Mäusen**

A. Genexpression von Glut4 B. PID1 und C. LRP1 in SVF Zellen und reifen Adipozyten isoliert aus dem epiWAT, subWAT und iBAT von PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>-/+</sup> Mäusen, bezogen auf mTbp. (\*P<0,05 \*\*P<0,01)

#### 4.1.5 OGTT und postprandiale <sup>3</sup>H-Deoxyglukose-Aufnahme mit Fettgewebe-spezifischen PID1 knockout Mäusen

Um die Relevanz der PID1-vermittelten GLUT4-Retention für den Glukose-Stoffwechsel *in vivo* zu untersuchen, wurde ein oraler Glukose Toleranz Test durchgeführt. In diesem Test wurde den Mäusen eine Mischung aus Glukose und <sup>3</sup>H-Deoxyglukose (2g/kg) gavagiert, um die postprandiale Glukose-Aufnahme aus dem Plasma in die verschiedenen Organe zu untersuchen. Vor und 15, 30, 60 und 120 Minuten nach der Gavage wurde die Blutglukose bestimmt. Nach 120 Minuten wurden die Mäuse narkotisiert und die Organe entnommen. Ein Teil der Organe wurde für mRNA Isolation und Genexpressionsanalyse mittels TaqMan PCR verwendet (Abb.4.1.5 A+B), während der Rest im  $\beta$ -Counter *gecountet* wurde (Abb.4.1.5 D). Der Nachweis des Fettgewebe-spezifischen PID1 *knockouts* ergab, dass der PID1 *knockout* in den weißen Fettdepots (epiWAT, subWAT) bei ca. 50% und im iBAT bei ca. 70% lag (Abb.4.1.5 A). Im Vergleich zu den *littermates* zeigten die Fettgewebe-spezifischen PID1 *knockout* Tiere eine signifikant verbesserte Glukose-Aufnahme aus dem Plasma (Abb.4.6 C), welche durch eine signifikant erhöhte Glukose-Aufnahme ins subWAT, iBAT und scBAT

verursacht wurde (Abb.4.1.5 D). Neben der direkten Verstoffwechslung von Glukose in der Glykolyse und dem Citratzyklus kann Glukose in Fettgeweben und der Leber auch zur *de novo* Synthese von Fettsäuren (*de novo* lipogenesis, DNL) genutzt werden. Wegen der erhöhten Glukose-Aufnahme wurde die Genexpression einiger DNL Gene im subWAT gemessen, da diese in den globalen PID1 ebenfalls untersucht wurden (Doktorarbeit Kirstin Albers). Zwar waren Chrebb $\beta$ , Elovl6 und Scd1 im subWAT der cre<sup>+</sup> Mäuse höher exprimiert, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant, verglichen mit den cre<sup>-</sup> Mäusen (Abb.4.1.5 C).



**Abb.4.1.5 Radioaktiver OGTT mit Fettgewebe-spezifischen PID1 knockout Mäusen**  
 A. Relative Genexpression von mPID1 in Mausgeweben von PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>-/+</sup> Mäusen, als Nachweis des Fett-spezifischen knockouts B. Relative Genexpression von *de novo* lipogenesis (DNL) Genen im subWAT von PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>-/+</sup> Mäusen C. Orale Glukose Toleranz Test (OGTT). Die Mäuse wurden 4 Stunden gefastet, bevor sie eine 3H-Deoxyglukose Gavage erhielten. Zuvor und 15, 30, 60 und 120 Minuten nach Gavage wurde Blutglukose gemessen. D. Nach 120 Minuten wurde die Tiere sakrifiziert und die Organe entnommen um die aufgenommene 3H-Deoxyglukose im  $\beta$ -Counter zu messen. (\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ )

#### 4.2 Leber-spezifische PID1 knockout Mäuse

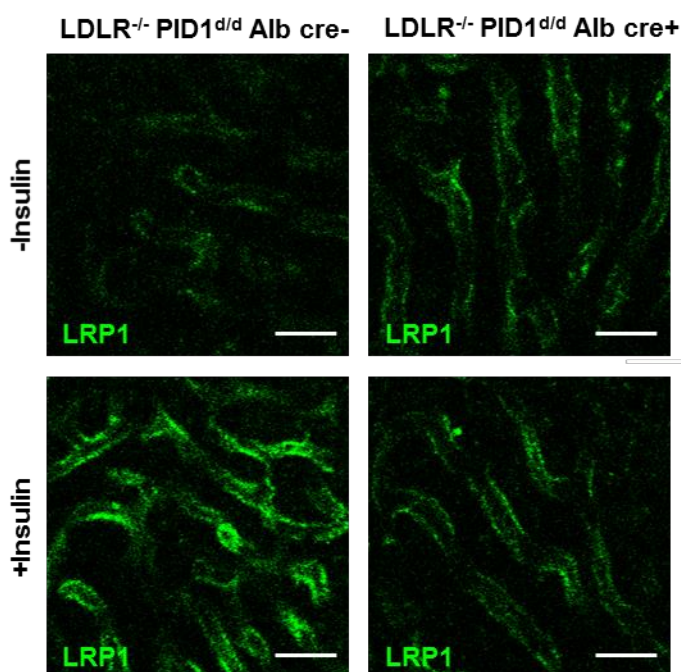
Wie bereits erwähnt, wurde in der Doktorarbeit von Kirstin Albers eine verbesserte <sup>125</sup>I-TRLR Aufnahme in PID1<sup>-/-</sup> Hepatozyten beschrieben, welche auf die erhöhte LRP1 Dichte an der Zelloberfläche zurückgeführt wurde. Eine weitere Beobachtung dieser Arbeit war jedoch die Hochregulation des LDLR in der Leber von PID1<sup>-/-</sup> Mäusen, welcher ebenfalls mit TRLR Partikeln interagiert und diese mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle aufnehmen



kann. Um den Einfluss des LDLR für die TRLR-Aufnahme auszuschließen und einzig die Bedeutung von PID1 für die Endozytose der TRLR Partikel zu untersuchen, wurden globale LDLR *knockout* mit Leber-spezifischen PID1 *knockout* Mäuse (LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup>) generiert.

#### 4.2.1 Nachweis von LRP1 in Lebern von LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen, +/- Insulin

Um die *in vitro* beobachteten Effekte von PID1-Defizienz auf die Translokation von LRP1 auch *in vivo* zu visualisieren, wurde die Leber von LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen intravitalmikroskopisch untersucht. Die Tiere wurden entweder mit NaCl als Kontrolle (-Insulin), oder 1U/kg Insulin (+Insulin) injiziert. Anschließend wurde den Tieren ein Cy5 markierter LRP1 Antikörper i.v. injiziert und die Verteilung des Antikörpers in Echtzeit visualisiert. In der NaCl-behandelten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Leber war basal die LRP1 Dichte an der Zelloberfläche höher im Vergleich zum cre<sup>-</sup> Tier. In Insulin-stimulierten Tieren war im cre<sup>-</sup> Tier eine deutliche Insulin-vermittelte Zunahme von LRP1 an die Zelloberfläche zu beobachten, während in der cre<sup>+</sup> Tier kein Unterschied zwischen – und + Insulin detektiert wurde.



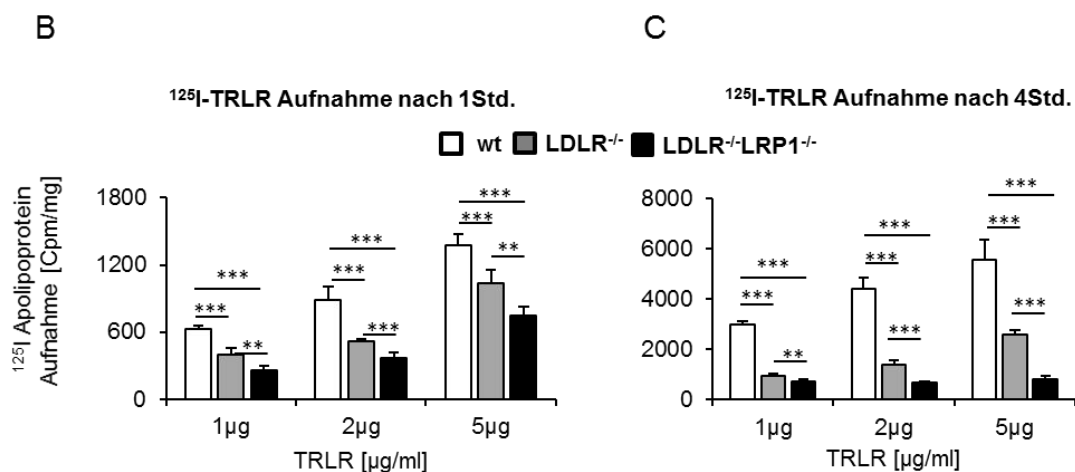
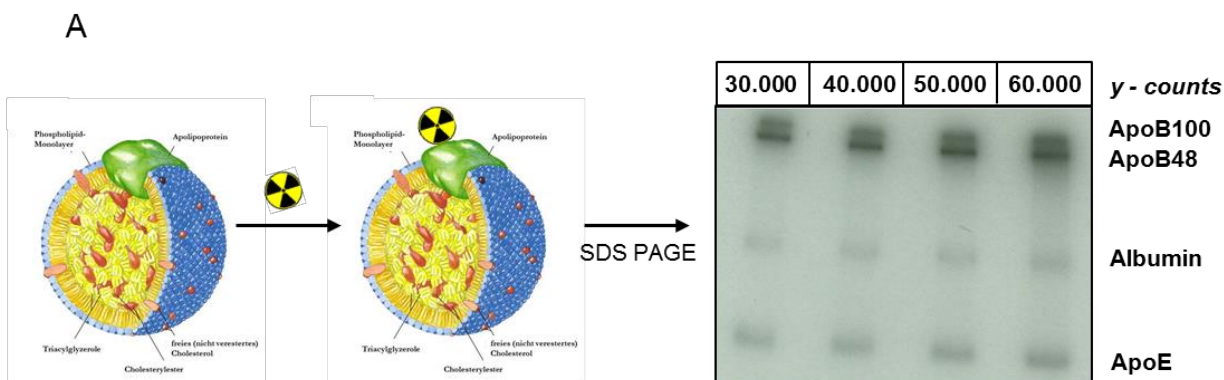
**Abb.4.2.1 Nachweis Lrp1 +/- Insulin in der Leber von LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen via Intravitalmikroskopie**

LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse wurden über Nacht gefastet, bevor entweder Saline (-Insulin) oder 1 U/kg Insulin (+Insulin) i.p. injiziert wurde. Nach 10 Minuten wurde die Intravitalmikroskopie der Leber gestartet und der Cy5- gelabelte LRP1 Antikörper i.v. injiziert. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Bilder aufgenommen (Maßstab=25µm)

### 4.2.2. LRP1 und PID1-abhängige Aufnahme von TRLR in primäre Hepatozyten

#### 4.2.2.1 <sup>125</sup>I-TRLR-Aufnahme Abhängigkeit von LRP1

In diesem Versuch wurde getestet, ob auch ohne Insulin-Stimulation ein Unterschied in der Aufnahme radioaktiv markierter TRLR zwischen LDLR<sup>-/-</sup> (geringe LRP1 Dichte an Zelloberfläche) und LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>-/-</sup> (keine LRP1 Expression) in Hepatozyten zu detektieren ist. Hierzu wurden die Hepatozyten aus LDLR<sup>-/-</sup>LRP1 flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen isoliert. Die Apolipoproteine der TRLR Partikel wurden mit radioaktiven <sup>125</sup>Iod markiert (Abb.4.2.2.1 A), sodass die hepatische Aufnahme der <sup>125</sup>I-TRLR im γ-Counter detektiert werden konnte. Nach 1 und 4 Stunden Inkubation der Hepatozyten mit verschiedenen TRLR Konzentrationen (1, 2, 5 µg/ml) wurden weniger <sup>125</sup>I-TRLR in den LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>-/-</sup> Hepatozyten, als in den LDLR ko Hepatozyten, detektiert. Als Kontrolle wurden primäre wt Hepatozyten verwendet, die an beiden Zeitpunkten und bei allen TRLR Konzentrationen am meisten <sup>125</sup>I-TRLR aufnahmen (Abb. 4.2.2.1 A+B).

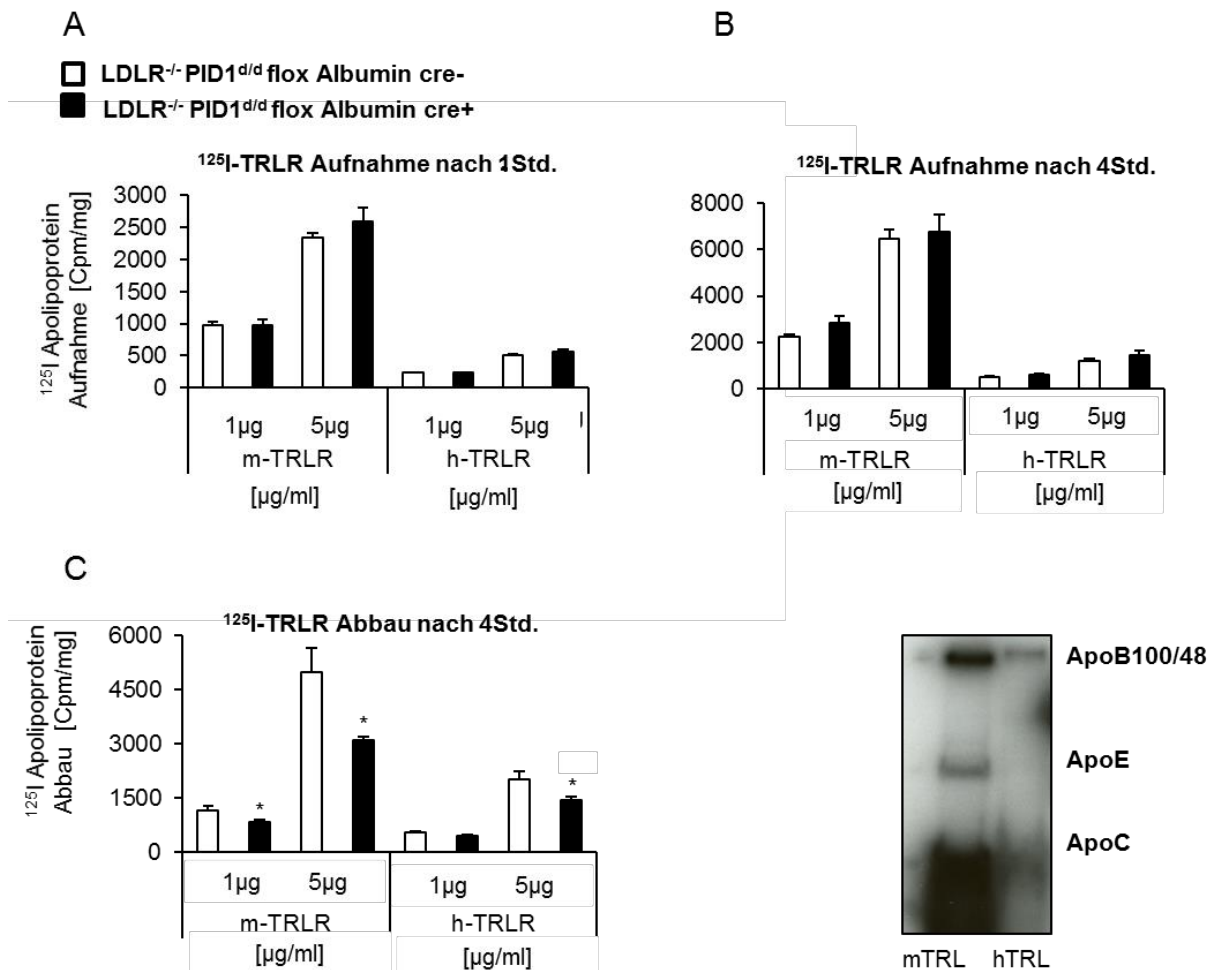


**Abb. 4.2.2.1 <sup>125</sup>I-TRLR-Aufnahme in primären wt, LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup> LRP1<sup>-/-</sup> Hepatozyten**  
A. Nachweis <sup>125</sup>Iod Markierung der Apolipoproteine. Die <sup>125</sup>Iod Apolipoproteine werden via SDS PAGE aufgetrennt B. Aufnahme muriner <sup>125</sup>Iod markierter TRLR in primäre wt, LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>-/-</sup> Hepatozyten nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C. C. Aufnahme muriner <sup>125</sup>Iod markierter TRLR in primäre wt, LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>-/-</sup> Hepatozyten nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C. (\*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001)

#### **4.2.2.2 <sup>125</sup>I-TRLR-Aufnahme in primäre Hepatozyten in Abhängigkeit von PID1**

Der Versuch aus Abschnitt 4.8 wurde mit primären Hepatozyten aus LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre- und cre+ Mäusen wiederholt, um die Funktionalität von LRP1 in Abhängigkeit von PID1 zu untersuchen. In diesem Versuch wurden murine und humane <sup>125</sup>I-TRLR eingesetzt. Zusätzlich wurde nach 4 Stunden der intrazelluläre Abbau der <sup>125</sup>I-TRLR detektiert, indem das Abbauprodukt, <sup>125</sup>I -Monoiodod-Tyrosin, im Medium gemessen wurde.

Die Endozytose der murinen <sup>125</sup>I-TRLR war bei beiden Genotypen generell höher als die der humanen <sup>125</sup>I-TRLR. Während die Aufnahme der murinen und humanen <sup>125</sup>I-TRLR in beiden Genotypen fast gleich war (Abb.4.2.2.2 A+B), zeigte die intrazelluläre Degradation der TRLR signifikante Unterschiede. Im Vergleich zu den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre- Hepatozyten konnte in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre+ Hepatozyten signifikant weniger Abbau muriner und humaner <sup>125</sup>I-TRLR beobachtet werden (Abb.4.2.2.2 C).



**Abb. 4.2.2.2** <sup>125</sup>I-TRLR-Aufnahme und Abbau in primären Hepatozyten von LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen

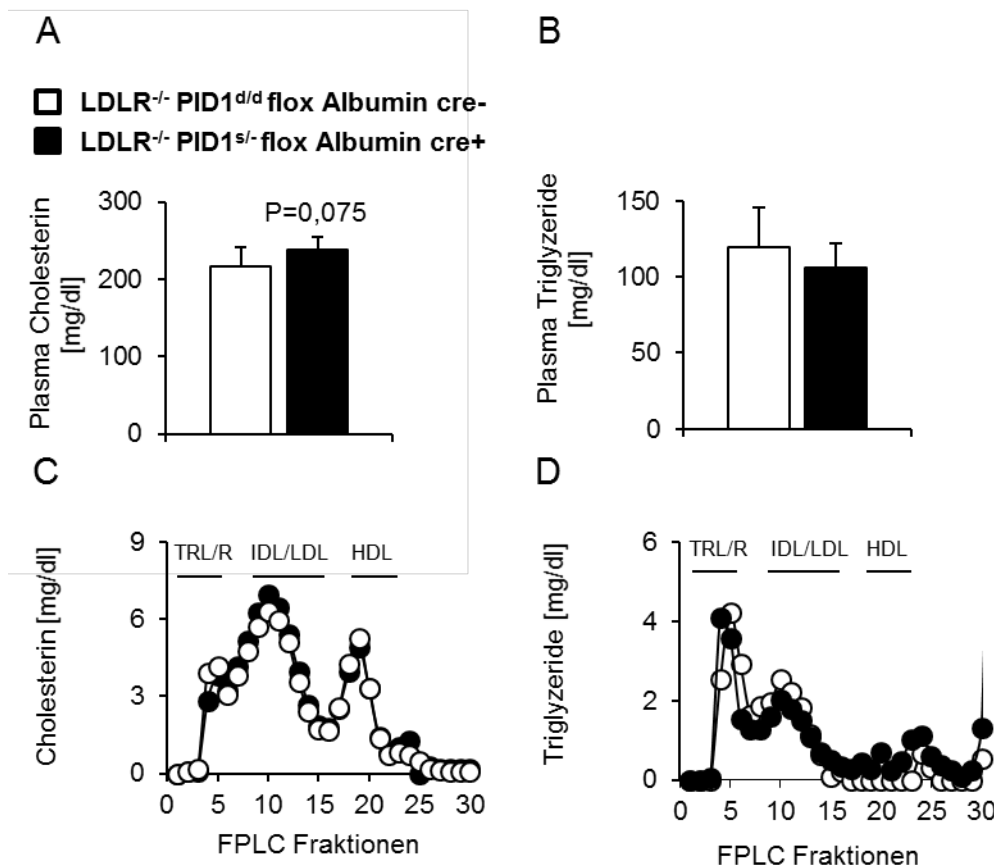
A. Aufnahme muriner und humaner <sup>125</sup>Iod markierter TRLR in primäre LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Hepatozyten nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C. B. Aufnahme muriner und humaner <sup>125</sup>Iod markierter TRLR in primäre LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Hepatozyten nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C. C. Abbau muriner und humaner <sup>125</sup>Iod markierter TRLR in primäre LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Hepatozyten nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C. (\*P<0,05)

#### 4.2.3 Plasmalipide der LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse

##### 4.2.3.1 Plasmalipide LDLR *knockout* Weibchen mit einem heterogenen Leber-spezifischen PID1 *knockout* (LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup>)

Wie in Abschnitt 3.2.10.1 beschrieben, mussten die LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+/+</sup> Mäuse zunächst durch Kreuzung globaler LDLR *knockout* Mäuse (LDLR<sup>-/-</sup>) mit Leber-spezifischen PID1 *knockout* Mäusen (PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+/+</sup>) durch Kreuzung über 3 Generationen generiert werden. Als Vorversuch wurden die in der F2 Generation entstandenen LDLR *knockout* Mäuse mit einem heterozygoten Leber-spezifischen PID1 *knockout* (LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+/+</sup>) analysiert. Die Plasma Cholesterin Werte der Leber-spezifischen,

heterozygoten *PID1 knockouts* waren etwas höher (Abb.4.2.3.1 A), während die Plasma Triglyzeride im Vergleich zu denen der *littermates* etwas niedriger waren (Abb.4.2.3.1 B). Die Lipoproteinprofile unterschieden sich kaum zwischen beiden Genotypen (Abb.4.2.3.1 C+D).

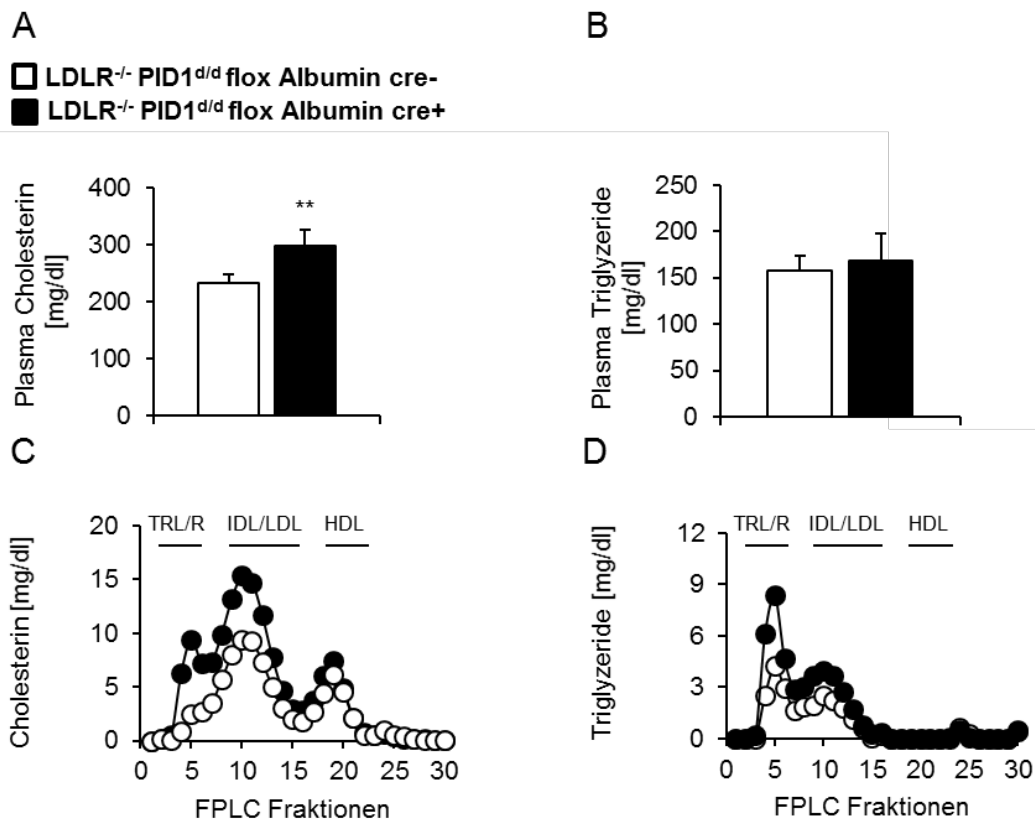


**Abb.4.2.3.1 Plasmalipide *LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>+/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen.***

A+B. Die Cholesterin- und Triglyzerid- Werte in Plasmen von Chow gefütterten *LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>+/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen*. C.+D. Mittels FPLC wurden die Lipoproteine der gepoolten Plasmen aufgetrennt, anschließend wurde der Cholesterin bzw. Triglyzerid-Gehalt in den Fraktionen bestimmt

**4.2.3.2 Plasmalipide weiblicher *LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse***

Die Analyse der Plasmalipide ergab, dass die weiblichen *LDLR knockout* Mäuse mit einem Leber-spezifischen *PID1 knockout* (*LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+/+</sup>*) signifikant höhere Plasma Cholesterin Werte, im Vergleich zu *littermates* (*LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/-</sup>*) hatten (Abb.4.2.3.2 A). Das Cholesterin Lipoproteinprofil zeigte eine Akkumulation von TRL/R und IDL/LDL (Abb.4.2.3.2 C). Der Triglyzerid Gehalt war nur leicht erhöht in den *cre<sup>+/+</sup>* Plasmen, verglichen mit *cre<sup>-/-</sup>* Plasmen (Abb.4.2.3.2 B), während das dazugehörige Lipoproteinprofil ebenfalls eine Anreicherung von TRL/R und IDL/LDL aufwies (Abb.4.2.3.2 D)

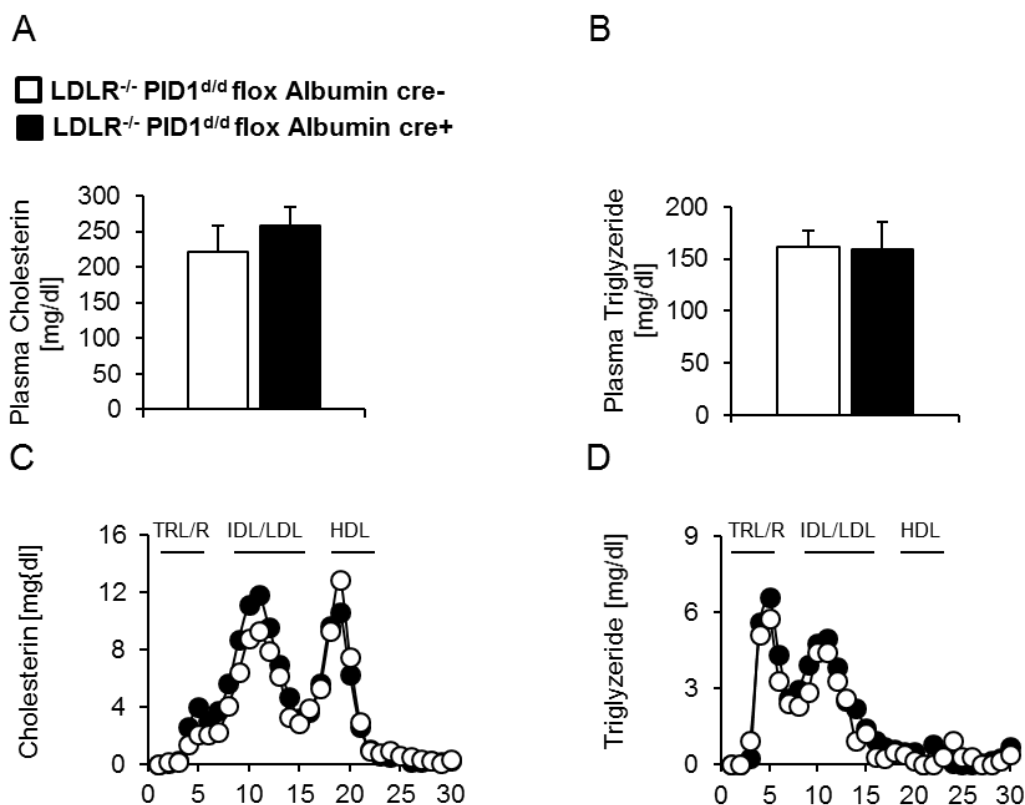


#### Abb.4.2.3.2 Plasmalipide LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen.

A+B. In den Plasmen von Chow gefütterten LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen wurden Cholesterin und Triglyzeride gemessen C.+D. Die Plasmen wurden gepoolt, um die Lipoproteinklassen anhand FPLC aufzutrennen. In den FPLC Fraktionen wurde der Cholesterin- und Triglyzerid-Wert bestimmt. (\*\*P<0,01)

#### 4.2.3.3 Plasmalipide männlicher LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse

Die Plasmalipide der männlichen LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse wiesen weniger gravierende Unterschiede auf. Die Cholesterinwerte waren in den cre<sup>+</sup> Plasmen leicht erhöht, verglichen mit cre<sup>-</sup> Plasmen (Abb.4.2.3.3 A), was auf leicht erhöhte TRL/R- und IDL/LDL-Mengen im Cholesterin-Lipoproteinprofil zurückzuführen war. (Abb.4.2.3.3 C). Die Triglyzeride und das Lipoproteinprofil der Triglyzeride zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Abb.4.2.3.3 B+D).



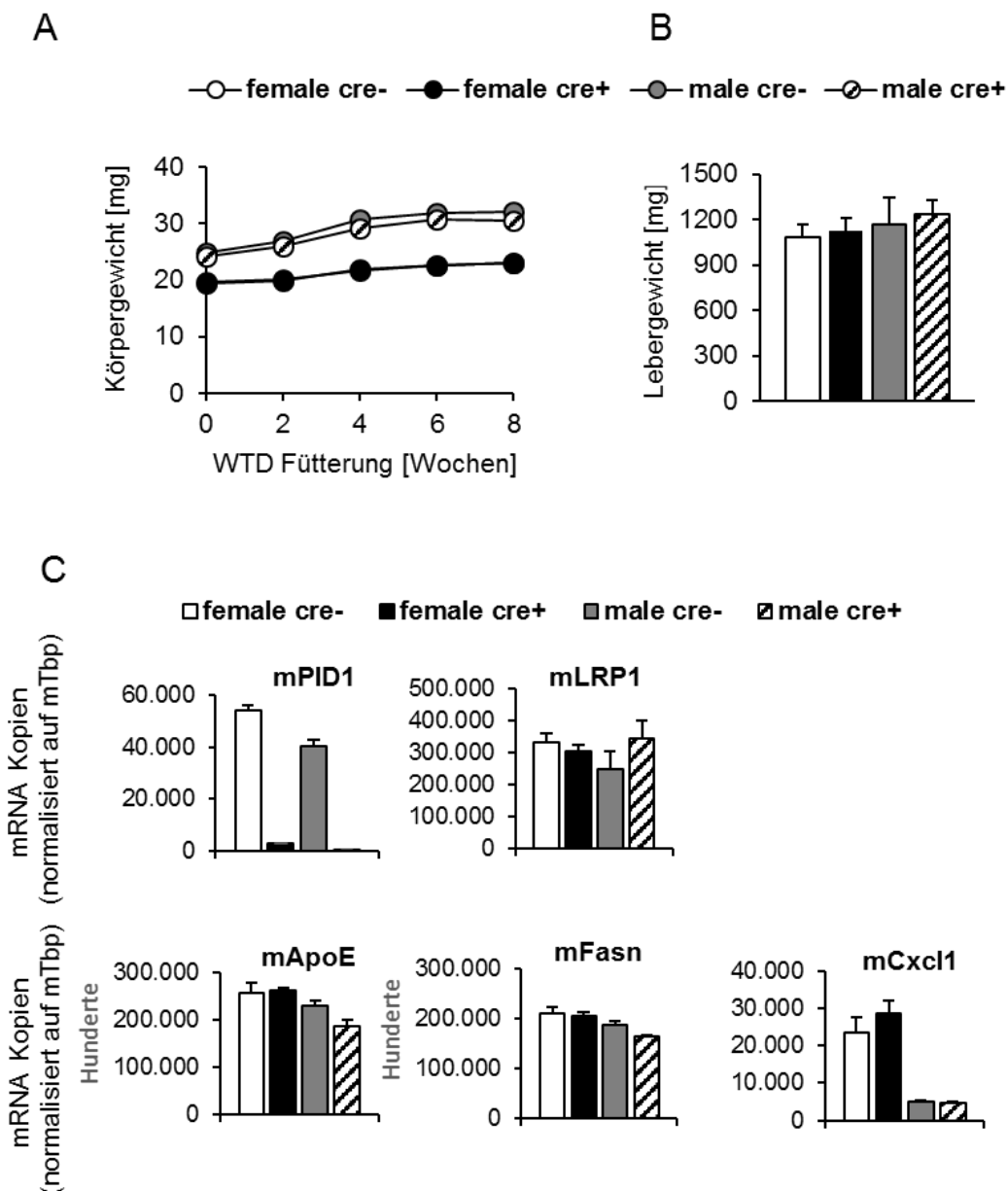
#### Abb.4.2.3.3 Plasmalipide LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Männchen

A+B. Cholesterin- und Triglyzerid-Werte in den Plasmen der 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Männchen C.+D. Anhand FPLC wurden die Lipoproteine in den gepoolten Plasmen der Männchen aufgetrennt. In den verschiedenen FPLC Fraktionen wurden erneut Cholesterin und die Triglyzeride gemessen. (\*\*P<0,05)

#### 4.2.4 Western-Type Diät Studie mit LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen

Männliche und weibliche LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse wurden ab dem Alter von 8 Wochen für weitere 8 Wochen mit einer Western Type Diet (WTD) gefüttert. Im Gegensatz zum Menschen, haben Mäuse basal mehr HDL und relativ wenig VLDL und LDL. Um den humanen Lipidphänotyp zu imitieren, erhielten die LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse die WTD, mit einem hohen Gehalt an Fetten (21,2%) und Cholesterin (0,2%), sodass vermehrt die Bildung von LDL Partikeln induziert wurde (Getz and Reardon, 2006). Durch die Fütterung kam es zu einer stärkeren Gewichtszunahme bei den Männchen als bei den Weibchen (Abb.4.2.4 A). Die Lebergewichte der verschiedenen Geschlechter und Genotypen unterschieden sich jedoch kaum (Abb.4.2.4 B). Genexpressionsanalysen der Lebern ergaben eine Reduktion der PID1 Expression in den cre<sup>+</sup> Tieren, während LRP1, ApoE und Fasn in den cre<sup>-</sup> und cre<sup>+</sup> Lebern mit ähnlicher Expression vorlagen. Von der Leber sezerniertes ApoE kann die Plasma Lipoprotein-Level reduzieren (Tsukamoto et al., 1999), während die *fatty acid synthase* (Fasn) den letzten Schritt in der Fettsäure Synthese, der DNL, katalysiert und damit die Leber Triglyzerid Level beeinflusst (Dorn et al., 2010). Interessanterweise war Cxcl1 in den

Lebern der Weibchen (beider Genotypen) wesentlich höher exprimiert als in den Lebern der Männchen (Abb.4.2.4 C). Cxcl1 hat einen chemischen Lockstoff, der Neutrophile in Prozessen wie Angiogenese, Wundheilung oder Entzündungen rekrutiert (Pedersen et al., 2011).



#### Abb.4.2.4 WTD Fütterung von $LDLR^{-/-}PID1^{d/d} flox$ Albumin $cre^{-/+}$ Mäusen

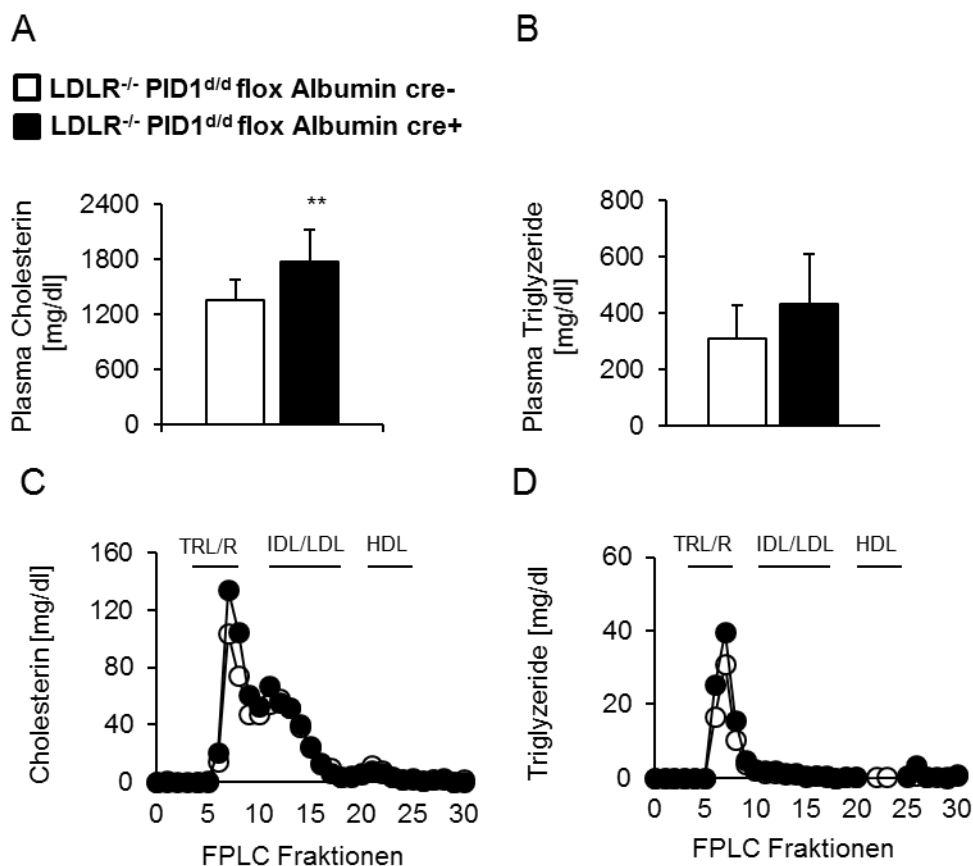
A. Wöchentliche Messung des Körpergewichts im Verlauf der 8 Wochen WTD B. Nach 8 Wochen WTD wurden die Mäuse sakrifiziert, die Organe entnommen und das Lebergewicht wurde bestimmt. C. Die Genexpression von  $mPID1$ ,  $mLRP1$ ,  $mApoE$ ,  $mFasn$ ,  $mCxcl1$  (bezogen auf  $mTbp$ ) wurde mittels Realtime PCR in den Leberlysaten gemessen.

##### 4.2.4.1 Plasmalipide weiblicher $LDLR^{-/-}PID1^{d/d} flox$ Albumin $cre^{-/+}$ Mäuse nach WTD

In den weiblichen  $LDLR$  *knockout* Mäusen mit einem Leber-spezifischen  $PID1$  *knockout* ( $LDLR^{-/-}PID1^{d/d} flox$  Albumin  $cre^{+}$ ) konnte nach 8 Wochen WTD signifikant mehr Cholesterin im Plasma nachgewiesen werden, verglichen mit den *littermates* ( $LDLR^{-/-}PID1^{d/d} flox$  Albumin  $cre^{-}$ ) (Abb.4.2.4.1 A). Die Cholesterin Messung der FPLC Fraktionen ergab einen höheren TRL/R Gehalt in den  $cre^{+}$  Plasmen (Abb.4.2.4.1 C). Verglichen mit  $cre^{-}$  Plasmen waren die



Triglyzeride in den cre+ Plasmen erhöht, jedoch nicht signifikant (Abb.4.2.4.1 C). Die Auftrennung der Lipoproteine zeigte eine höhere Akkumulation der TRL/R Partikel in den cre+ Plasmen in Relation zu den cre- Plasmen (Abb.4.2.4.1 D)

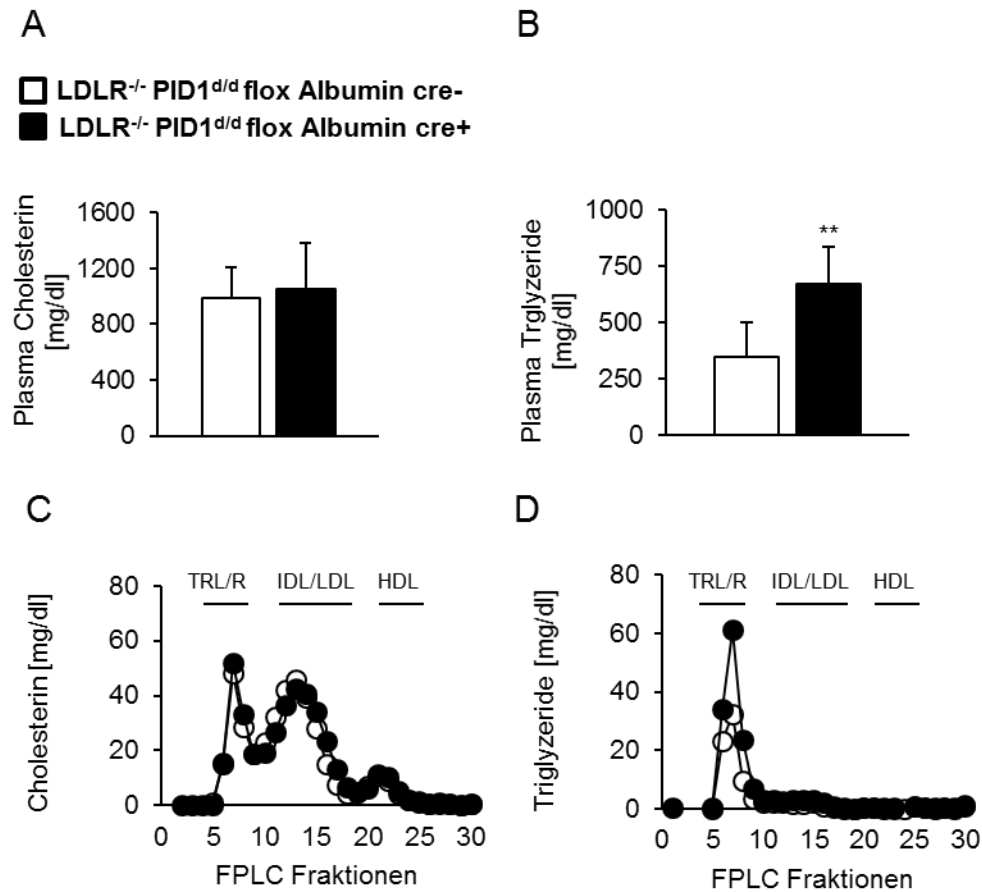


#### Abb.4.2.4.1 Plasmalipide LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen nach 8 Wochen WTD

A+B. Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalt in den Plasmen der 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen. C.+D. Die Lipoproteinklassen der gepoolten Plasmen wurden mittels FPLC aufgetrennt. In den FPLC Fraktionen wurde anschließend der Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalt gemessen. (\*\*P<0,05)

#### 4.2.4.2 Plasmalipide männlicher LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse nach WTD

Die männlichen LDLR *knockout* Mäuse mit einem Leber-spezifischen PID1 *knockout* (LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup>) zeigten nach 8 Wochen WTD kaum Unterschiede im Plasma Cholesterin und dem dazugehörigen Lipoproteinprofil verglichen mit den *littermates* (LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-</sup>) (Abb.4.2.4.2 A+C). Interessanterweise waren die Plasma Triglyzeride signifikant höher in den cre<sup>+</sup> Tieren in Relation zu den cre<sup>-</sup> Mäusen (Abb.4.2.4.2 B). Das Lipoproteinprofil der Triglyzeride zeigte wesentlich mehr TRL/R Partikel im Plasma der cre<sup>+</sup> Mäuse verglichen mit den *littermates* (Abb.4.2.4.2 D).

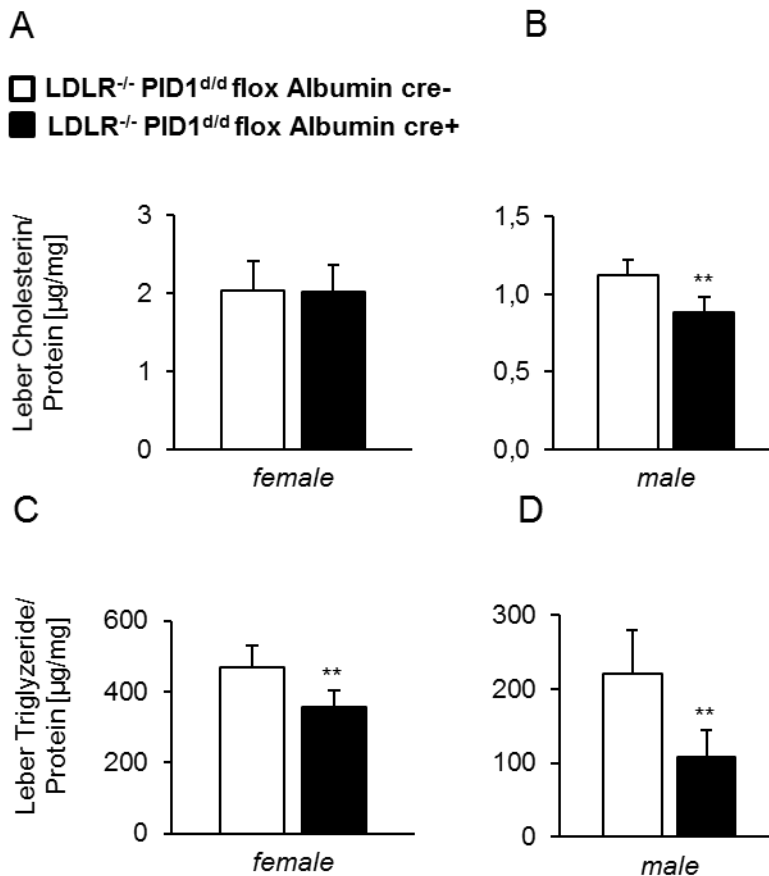


#### Abb.4.2.4.2 Plasmalipide LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Männchen nach 8 Wochen WTD

A+B. Cholesterin- und Triglyzerid-Werte in den Plasmen der 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Männchen C.+D. Anhand FPLC wurden die Lipoproteine in den gepoolten Plasmen der Männchen aufgetrennt. In den verschiedenen FPLC Fraktionen wurden erneut Cholesterin und die Triglyzeride gemessen. (\*\*P<0,05)

#### 4.2.4.3 Leberlipide LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse nach WTD

Nach 8 Wochen WTD Fütterung wurden die Lebern entnommen und die Leberlipide bestimmt. Die cre<sup>+</sup> Weibchen zeigten keinen Unterschied in den Leber-Cholesterin-Werten (Abb.4.2.4.3 A), jedoch waren die Leber Triglyzeride signifikant niedriger, verglichen mit den cre<sup>-</sup> Weibchen (Abb.4.2.4.3 C). Die cre<sup>+</sup> Männchen, in Relation zu den cre<sup>-</sup> Männchen, wiesen signifikant weniger Leber-Cholesterin (Abb.4.2.4.3 B) und Leber-Triglyzeride auf (Abb.4.2.4.3 D).



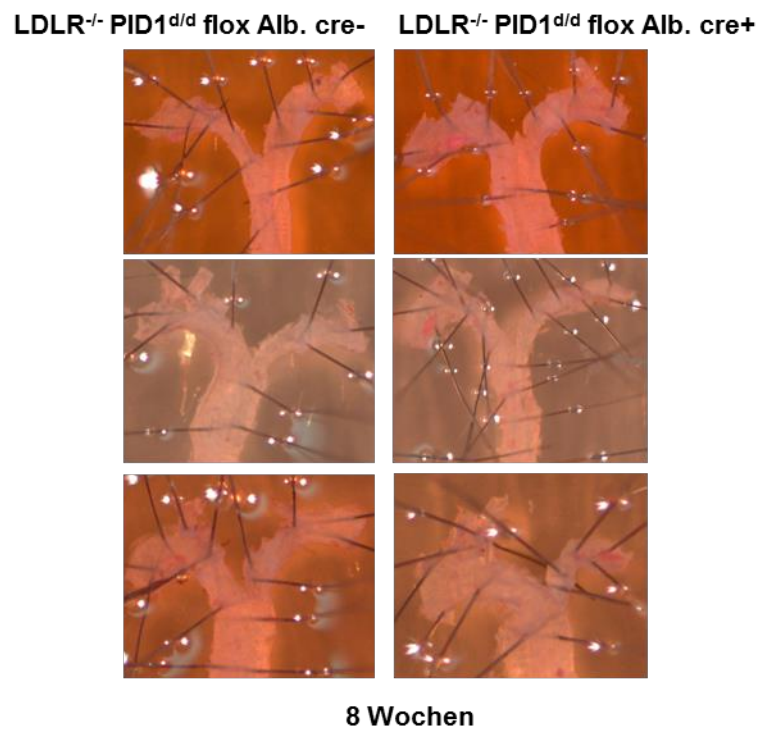
**Abb.4.2.4.3 Leberlipide LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse nach 8 Wochen WTD**  
 A+B. Die Leber Cholesterinwerte der 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse bezogen auf die jeweilige Proteinmenge. C+D. Der hepatische Triglyzeridgehalt, ebenfalls auf den Proteinanteil bezogen.

#### 4.2.5 Atherosklerosestudien mit weiblichen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen

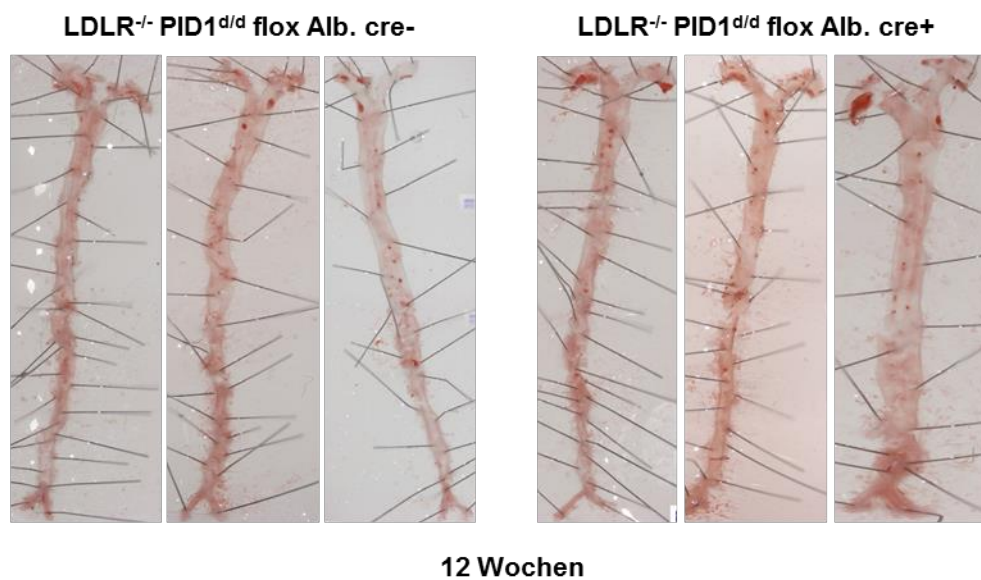
Durch WTD Fütterung entwickeln LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse Atherosklerose, wobei die Dauer der Fütterung den Krankheitsverlauf verstärkt (Getz and Reardon, 2006). Um zu sehen, ob der Leber-spezifische PID1 Verlust den Verlauf beeinflusst, wurden LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen entweder 8 oder 12 Wochen mit einer WTD gefüttert. Nach der Narkose wurde den Mäusen das perfundierte Herz und die Aorta entnommen. Die Aorten wurden sauber präpariert, aufgeschnitten und flach aufgepinnt, um das Aorteninnere für neutrale Lipide bzw. Plaques anzufärben. Die Abbildung 4.2.5 A zeigt die rot angefärbten Plaueflächen der Aortenbogen nach 8 Wochen WTD, während Abbildung 4.2.5 B die Plaueflächen der gesamten Aorten nach 12 Wochen WTD dokumentiert. Die Plaueflächen wurden anschließend via Image J quantifiziert und zwischen den Genotypen verglichen. Die Quantifizierung ergab, dass die Summe der Plaueflächen nach 8 (Abb.4.2.5.1 A) und 12 (Abb.4.2.5.1 B) Wochen WTD in den cre<sup>+</sup> Weibchen höher war, verglichen mit cre<sup>-</sup> Weibchen

jedoch nicht signifikant. Der hepatische PID1 *knockout* wurde via Taqman PCR nachgewiesen (Abb.4.2.5.1 C).

A

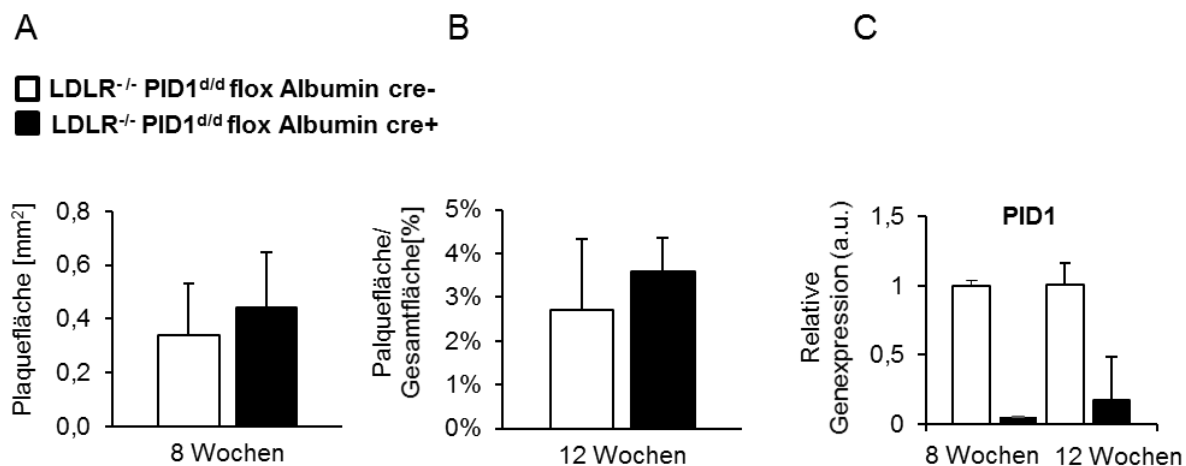


B



**Abb.4.2.5 Visualisierung der Aorten-Plaueflächen von 8 und 12 Wochen WTD gefütterten  $LDLR^{-/-}PID1^{d/d}$  flox Alb. (Albumin)  $cre^{-/+}$  Weibchen**

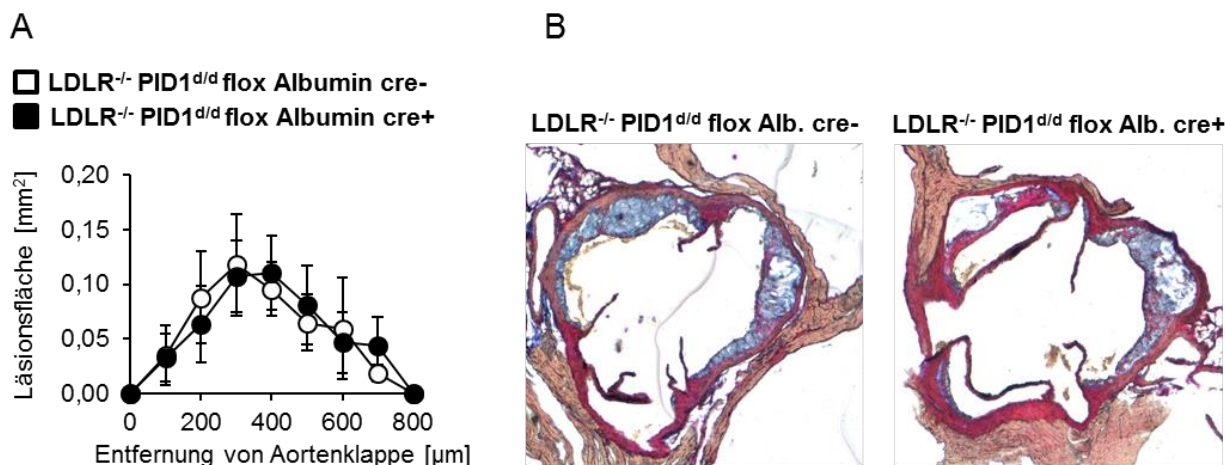
A. Bilder von aufgepinnten und mit Sudan IV angefärbten Aortenbogen von  $cre^{+}$  und  $cre^{-}$  Weibchen, welche zuvor 8 Wochen mit einer WTD gefüttert wurden. B. Bilder von aufgepinnten und mit Sudan IV angefärbten Aorten von  $cre^{+}$  und  $cre^{-}$  Weibchen, welche zuvor 12 Wochen mit einer WTD gefüttert wurden



**Abb.4.2.5.1 Quantifizierung der Aorten-Plaquelächen von 8 und 12 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen**

A. Quantifizierung der mit Sudan IV angefärbten Aortenplaque-Fläche im Aortenbogen (in mm<sup>2</sup>) von 8 Wochen WTD gefütterten cre<sup>-/+</sup> Weibchen. B. Relative Quantifizierung der mit Sudan IV angefärbten Aortenplaque-Fläche bezogen auf die Gesamtfläche der Aorta (in%) der 12 Wochen WTD gefütterten cre<sup>-/+</sup> Weibchen. C. Relative PID1 Genexpression in den Lebern der 8 und 12 Wochen WTD gefütterten cre<sup>-/+</sup> Weibchen, bezogen auf mTbp

Bei den 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen wurde, neben der *en face* Färbung, zusätzlich die Läsionsfläche der Aortenwurzeln analysiert. Die Herzen wurden dazu in Paraffin eingebettet und von der Herzbasis aus in mehrere 10µm breite Paraffinschnitte geschnitten. In 100µm Abständen wurden die Schnitte mit einer modifizierten van Gieson Färbung angefärbt, um die Läsionsfläche anhand von ImageJ zu bestimmen. Die Quantifizierung der Läsionsfläche von den Aortenwurzeln-Schnitten ergab keinen Unterschied zwischen den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-</sup> und cre<sup>+</sup> Weibchen (Abb.4.2.5.2).



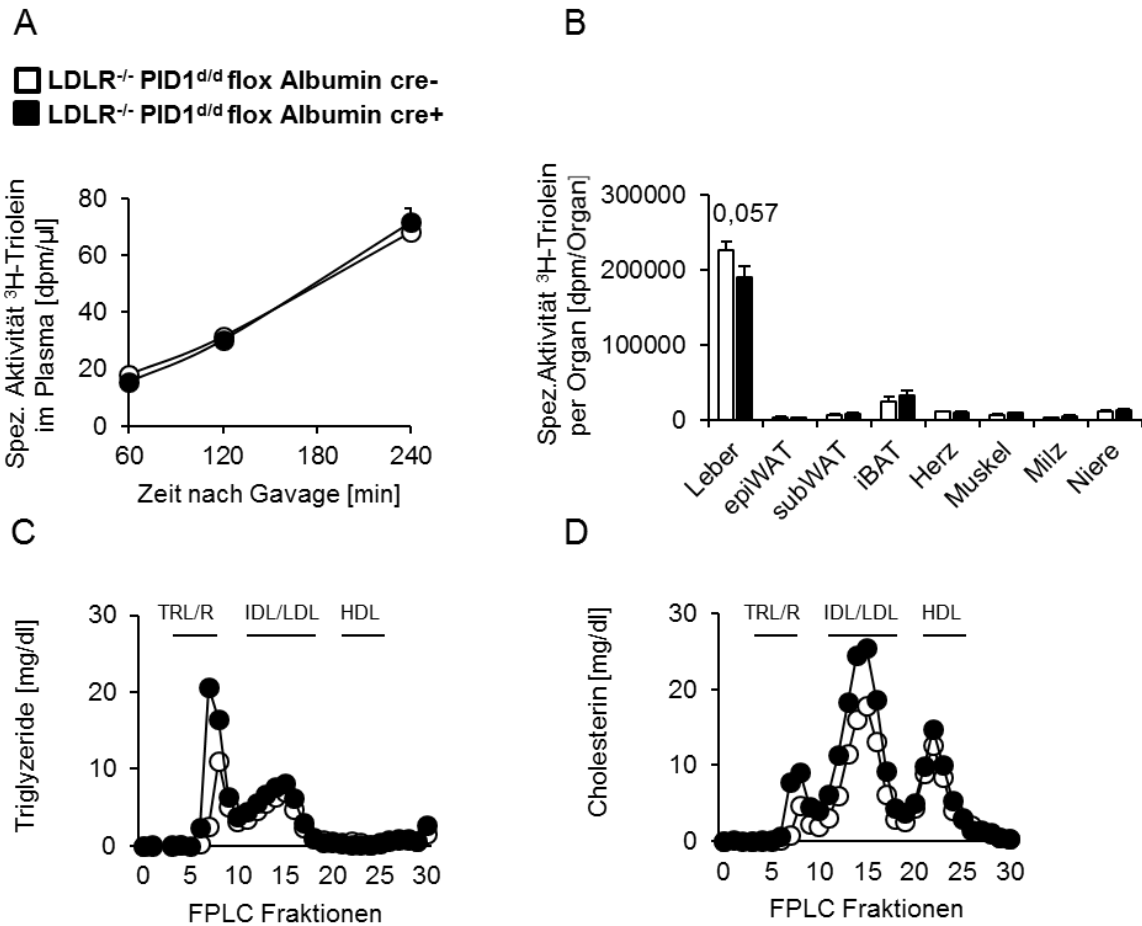
**Abb.4.2.5.2 Quantifizierung und Visualisierung der Aortenläsionen von 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen**

A. Quantifizierung der Läsionsfläche von den Aortenwurzeln-Schnitten in 100µm Abständen. B. Van Gieson Färbung der LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Alb. (Albumin) cre<sup>-/+</sup> Aortenwurzeln.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Plasmalipide, vor allem die Cholesterin-Werte, durch die WTD Fütterung und auf Grund vermehrter Lipoprotein-Akkumulation in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen anstiegen. In den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Männchen wurde ein signifikanter Anstieg der Plasma-Triglyzeride detektiert, während die LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Weibchen signifikant erhöhte Plasma-Cholesterin-Werte aufwiesen, verglichen mit den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-</sup> Kontrolltieren. In Folge wurden die Atherosklerose Studien mit LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen durchgeführt, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet werden.

#### **4.2.6 OFTT mit LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Männchen**

Aufgrund der Hormonschwankungen bei Weibchen werden metabolische Analysen standardgemäß mit männlichen Tieren durchgeführt, sodass der orale Fett-Toleranztest (OFTT) mit männlicher LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen durchgeführt wurde. Der OFTT wurde durchgeführt, um die erhöhten Plasmalipidwerte und die vermehrte Akkumulation der TRL/R bei den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Tieren genauer zu untersuchen. 24-26 Wochen alten Männchen wurde, nach 4 Stunden Fasten, eine <sup>3</sup>H-Triolein-Olivenöl Gavage gegeben. Anschließend wurde an Zeitpunkt 0, sowie 60, 120 und 240 Minuten nach der Gavage, den Tieren Blut entnommen. Nach 240 Minuten wurden das Herzblut und die perfundierten Organe isoliert, um die Plasmen und ein Teil der Organe im  $\beta$ -Counter zu counten. Während bei den Counts der Plasmaproben kein Unterschied zwischen den Genotypen zu sehen war (Abb.4.2.6 A), zeigten die Organ-Counts, dass die Aufnahme in die cre<sup>+</sup> Lebern im Trend verringert war, verglichen zu den cre<sup>-</sup> Lebern (P=0,057) (Abb.4.2.6 B). Die Herzblutplasmen wurden Genotyp-abhängig gepooled und für FPLCs verwendet. Während die Triglyzerid Messung der Lipoproteinauftrennung vor allem eine Akkumulation von TRL/R in den cre<sup>+</sup> Plasmen nachwies (Abb.4.2.6 C), zeigte das Cholesterin-Lipoproteinprofil eine Anreicherung von TRL/R und IDL/LDL, verglichen mit cre<sup>-</sup> Plasmen (Abb.4.2.6 D).



#### Abb.4.2.6 OFTT mit LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Männchen

A. Die Männchen wurden zunächst 4 Stunden gefastet, bevor sie eine <sup>3</sup>H-Triolein-Olivenöl Gavage erhielten (2μl <sup>3</sup>H-Triolein+200μl Olivenöl/Maus). Vor und 60, 120 und 240 Minuten nach der Gavage wurde den Tieren Blut entnommen, um den <sup>3</sup>H-Triolein Gehalt in den Plasmaproben im β-Counter zu messen. B. 240 Minuten nach der Gavage wurden die Mäuse sakrifiziert und die Organe entnommen, um die <sup>3</sup>H-Triolein Aufnahme in die verschiedenen Organe zu counten. C.+D. Die Herzblut-Plasmen wurden Genotyp-abhängig gepoolt und anhand FPLC Auftrennung, gefolgt von Triglyzerid- und Choleserin-Messungen, wurden Lipoproteinprofile erstellt.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Die *feedback* Regulation der BAT Aktivierung über das EC System

In braunen Adipozyten verursacht die Stimulation des  $\beta$ 3-Rezeptors einen Anstieg des cAMP/PKA *signallings*. Die PKA führt einerseits zur Aktivierung der HSL, wodurch die Triglyzeride abgebaut werden und der Anteil an freien Fettsäuren steigt. Andererseits aktiviert die PKA den p38 MAPK Weg, sodass die PGC1 $\alpha$  Expression und letztlich die Ucp-1 Expression induziert wird. In Abschnitt 4.1.1.1 wurde die Differenzierung primärer brauner Adipozyten mit dem  $\beta$ 3-adrenergen Agonist CL-316,243 (CL) charakterisiert. Die Differenzierung der SVF Zellen zu reifen braunen Adipozyten kann bestätigt werden, da in Folge der CL Stimulation zum einen der Anteil an freien Fettsäuren im Medium und zum anderen die Ucp-1 Expression signifikant ansteigen (Abb.4.1.1.1 A+B).

Wie in der Einleitung beschrieben spielt das Endocannabinoid (EC) System eine bedeutende Rolle in der Stoffwechsel-Regulation, sowohl auf zentraler wie auch auf peripherer Ebene. Aufgrund der gewichtsreduzierenden Wirkung der CB1 Blockade gab es bereits klinische Studien, in denen ein CB1 spezifischer Antagonist namens Rimonabant untersucht wurde. Die Behandlung von Patienten mit dem systemisch wirkenden Rimonabant hatte eine Verbesserung der metabolischen Parameter und einen Gewichtsverlust zur Folge. Leider wurden jedoch auch psychische Nebenwirkungen hervorgerufen, sodass der Wirkstoff letztendlich 2008 vom Markt genommen wurde (Boon et al., 2014). Um die gewichtsreduzierende Wirkung zu nutzen, ohne psychische Nebenwirkungen auszulösen, ist es wichtig, den peripheren Einfluss und Wirkmechanismus des EC Systems auf den Energie-Metabolismus aufzuklären. In dem Paper von Boon et al 2014 wurde ein direkter Einfluss der CB1 Stimulation auf braune Fettzellen nachgewiesen. Durch die Blockade von CB1 wurde der cAMP/PKA Signalweg aktiviert, wodurch der Ucp-1-Gehalt und die Wärmeproduktion durch Entkopplung anstiegen. Demzufolge verursacht die CB1 Blockade die gleichen intrazellulären Effekte wie die Stimulation der  $\beta$ 3-adrenogenen Rezeptoren, sodass die Aktivierungen des CB1 Rezeptors und die des  $\beta$ 3-adrenogenen Rezeptors anscheinend Gegenteiliges bewirken. Um zu testen, ob es sich hierbei um eine gegenseitige Regulation oder um einen einseitigen negativen *feedback* Mechanismus handelt, wurden in den CL behandelten braunen Adipozyten aus Abschnitt 4.1.1.1 die Genexpressionen verschiedener EC System Gene gemessen. Durch die CL Behandlung steigt die Expression von Ucp-1, CB1 und den 2-AG Synthese-Genen Dagla/ $\beta$  (Abb.4.1.1.1 C-E). Die CL induzierte Hochregulation der EC System Gene deutet auf eine autokrine, negative *feedback* Regulation der  $\beta$ 3-Rezeptor induzierten Ucp-1 Expression hin. Interessanterweise zeigte eine Studie von Tam et al. (2008) ebenfalls einen Zusammenhang zwischen 2-AG, CB1 und der sympathischen Regulation. Hierbei



inhibierte die erhöhte 2-AG Synthese im Knochen die Ausschüttung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenenden via CB1 Interaktion. Anders als in den braunen Fettzellen beobachtet, wird die Noradrenalin Stimulation in der Knochenformation durch einen parakrinen negativ-*feedback* Mechanismus reguliert.

In Abschnitt 4.1.2 wurde die Hypothese der negativen *feedback* Regulation der BAT Aktivierung *in vivo* untersucht. C57BL/6 Mäuse wurden akut, chronisch, oder akut-chronisch mit Kälte (4°C) oder CL behandelt. Durch den Expressions-Anstieg von mUcp-1, Pgc1a, mDio2 und mElovl3 kann die Aktivierung des braunen Fetts (scBAT) und das *browning* des weißen Fettgewebes (subWAT) nachgewiesen werden (Abb. 4.1.2 A-D, E-H). Im Vergleich zu den *in vitro* Daten wird die Expression von CB1 nach CL Stimulation (chronisch-akuter) signifikant im scBAT und subWAT hochreguliert (Abb.4.1.2 I+K). Interessanterweise führen die anderen Behandlungen zu keinem Expressionsanstieg von CB1, jedoch zeigen die LC-MS-Messungen im BAT eine Erhöhung der EC durch akute CL Stimulation, während die EC Level im subWAT vor allem durch chronische CL und Kälte-Stimulation ansteigen. Diese Daten deuten auf eine regulatorische Rolle des EC Systems in Bezug auf BAT-Aktivierung und subWAT *browning* hin (Krott et al., 2016). Zusätzlich bestätigt der CL-induzierten CB1 Anstieg *in vivo* die *in vitro* Daten und zeigt die Verlässlichkeit der primären braunen Adipozyten aus Abschnitt 4.1.1.

## **5.2 Rolle von PID1 für die Glut4 Lokalisation und Glukose-Aufnahme im Fettgewebe**

Aufgrund der in der Arbeitsgruppe erzielten Vordaten wurde postuliert, dass PID1 die Glut4 Lokalisation und Glukose-Aufnahme auch in primären braunen Adipozyten beeinflusst. Durch den PID1 Verlust ist Glut4 vermehrt an der Zelloberfläche und weniger in den perinuklearen Kompartimenten lokalisiert, ähnlich wie die Glut4 Verteilung nach Insulin-Stimulation (Abb.4.1.3 A). Die basale Glukose-Aufnahme ist in den PID1<sup>-/-</sup> Adipozyten signifikant höher, während die Insulin stimulierte Glukose-Aufnahme, verglichen mit wt Zellen, signifikant niedriger ist (Abb.4.1.3 B). Demzufolge ist die Funktion der an der Zelloberfläche lokalisierten Glut4 Transporter in PID1<sup>-/-</sup> Zellen zwar intakt, aber die Zellen sind nicht mehr Insulin responsiv. PID1 scheint für die Glut4 Retention in Adipozyten essentiell zu sein, ebenso wie für LRP1 in Hepazoyten. Da PID1 und LRP1 bekannterweise Interaktionspartner sind (Caratu et al., 2007) und LRP1 Teil der Glut4 *storage vesicles* (GSV) ist (Jedrychowski et al., 2010), kann vermutet werden, dass die perinukleare Glut4 Retention in Adipozyten via LRP1 und PID1 erfolgt. Diese Annahme wird durch eine Studie von Jedrychowski et al, 2009 unterstützt, in der gezeigt wurde, dass LRP1 mit AS160 interagiert und ebenfalls nach Insulin-Stimulation zur Plasmamembran transportiert wurde. Der Verlust von LRP1 in 3T3 Adipozyten führte zu weniger Glut4 Expression und verringerter Glukose-Aufnahme. Demnach scheint LRP1 eine wichtige Komponente der GSV zu sein und erforderlich für die Bildung funktionaler GSV

(Jedrychowski et al., 2010). Ein weiterer Hinweis für diese Theorie ist die Analogie des Insulin-induzierten Transports von Glut4 in Fett- und Muskelzellen und LRP1 in Leberzellen sowie die veränderte Lokalisation dieser Proteine durch den PID1 Verlust. In anderen Studien wurde bereits die potentielle Rolle von PID1 in der Regulation des Insulin *signallings* und der Glut4 Translokation diskutiert (Zeng et al., 2012) (Zhang et al., 2009). Zeng et al, 2012 zeigten, dass der PID1 *knockdown* in ebenfalls Insulin-responsiven Muskelzellen zu einem Anstieg der GSV Translokation und Glukose-Aufnahme führt. Laut dieser Studie ist die verstärkte Phosphorylierung von IRS-1 und Akt der Grund für die erhöhte Glukose-Aufnahme, welche normalerweise durch PID1 inhibiert wird (Zeng et al., 2012). Diese Ergebnisse können in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Nach Stimulation der primären braunen Adipozyten ist kein Unterschied in der Insulin-vermittelten Phosphorylierung von Akt in PID1<sup>-/-</sup> und wt Zellen zu beobachten (Abb.4.1.3 C). Demnach beeinflusst PID1 die Insulin Signaltransduktion entweder *downstream* von Akt oder das Insulin *signalling* verläuft PID1 unabhängig. Interessanterweise ist der Proteingehalt von Glut4 in den PID1<sup>-/-</sup> Adipozyten verringert, verglichen mit wt Adipozyten. Durch die erhöhte Glut4 Dichte an der Plasmamembran wird Glut4 vermutlich schneller degradiert, indem Glut4 über die Endosomen nicht recycled, sondern in die Lysosomen transportiert wird. Dies deutet auf die physiologische Funktion von PID1 hin. PID1 könnte durch die LRP1-vermittelte Retention den Abbau an der Plasmamembran z.B. durch *shedding*-Prozesse verhindern und somit zur Proteinstabilität beitragen.

In der Studie von Yang et al., 2014 wurde eine Kollokalisierung des Retromer Komplexes mit den GSV beobachtet, wobei keine direkte Bindung zwischen dem Retromer und Glut4 nachgewiesen werden konnte. Zudem führte die Insulin-Stimulation reifer Adipozyten zu einer Translokation des Retromers an die Plasmamembran, sodass eine Beteiligung des Retromer-Komplexes an der Insulin-vermittelten Glut4 Translokation vermutet wurde. Der Retromer-Komplex hat eine zentrale Rolle in der Verteilung und dem Transport von Transmembranproteinen innerhalb der Endosomen und besteht aus 3 Proteinen: Vps26, Vps29 und Vps35 (Klinger et al., 2015). Interessanterweise wurde in der Doktorarbeit von Kirstin Albers ebenfalls eine Kollokalisierung des Retromers mit LRP1 in Leberzellen beobachtet. Die veränderte LRP1 Lokalisation in den PID1<sup>-/-</sup> Zellen konnte durch einen Vps29 *knockout* „gerettet“ werden, da LRP1 in PID1Vps29 doppel-*knockout* Hepatozyten wieder normal in den perinuklearen Kompartimenten lokalisiert war. Demnach scheint der Retromer-Komplex auch bei der Translokation von LRP1 zur Plasmamembran beteiligt zu sein (Doktorarbeit Kirstin Albers). Zusammenfassend deuten diese Daten erneut auf Gemeinsamkeiten bei der Translokation von Glut4 und LRP1 hin. Die direkte Komponente zwischen Retromer und Glut4 in den GSV könnte demnach LRP1 sein, da diese Interaktion bislang noch nicht untersucht wurde. Anhand von Immunoprecipitations-Experimenten, wie sie

bereits von Yang et al., 2014 durchgeführt wurden, könnte die Interaktion von LRP1 und den Retromer-Komplex Proteinen untersucht werden. Die *sortin nexin* (SNX) Proteine, welche mit dem Retromer-Komplex assoziieren, sollten dabei ebenfalls in Betracht gezogen werden, da diesen eine wichtige regulatorische Funktion zugesprochen wird (Klinger et al., 2015).

In Abschnitt 4.1.4 wurden die Genexpressionen von Glut4, LRP1 und PID1 in den *stromal vascular fraction* (SVF) Zellen und in reifen Adipozyten (Ad.) im epiWAT, subWAT und iBAT von PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>-/+</sup> Adipozyten gemessen. Glut4 ist ein Marker für reife Adipozyten (Seale et al., 2011) und wird demnach in allen 3 Fettgeweben, unabhängig vom Genotyp, signifikant niedriger in den SVF Zellen exprimiert (Abb.4.1.4 A). Der Fettgewebe-spezifische PID1 *knockout* bzw. die Fabp4 induzierte Cre Rekombination ist nur in den reifen Adipozyten aus dem epiWAT und iBAT signifikant. Zudem ist in allen 3 Fettgeweben kein kompletter Verlust der PID1 Expression, sondern lediglich ein PID1 *knockdown* zu beobachten (Abb.4.1.4 B). PID1 und LRP1 zeigen eine ähnliche Expressionsverteilung zwischen SVF Zellen und reifen Adipozyten in den 3 Fettgeweben. Im epiWAT und iBAT sind die Expressionen von PID1 und LRP1 in den SVF Zellen höher als in den reifen Adipozyten (Abb.4.1.4 B+C).

Die *in vivo* Charakterisierung der PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>-/+</sup> Mäuse ist in Abschnitt 4.1.5 dargestellt. Die relative PID1 Expression in den unterschiedlichen Mausorganen zeigt einen Fettgewebe-spezifischen PID1 *knockdown* in den untersuchten Fettgeweben: epiWAT, subWAT, iBAT, wobei der *knockdown* im braunen Fettgewebe effektiver ist als in den weißen Fettgeweben (Abb.4.1.5 A). Interessanterweise wurde in einer Studie von Hofmann et al., 2007 der LRP1 Rezeptor ebenfalls über den Fabp4 Promotor deletiert, wobei eine ähnliche *knockout* Effizienz in den verschiedenen Fettgeweben zu beobachten war (Hofmann et al., 2007). Demnach ist die Kreuzung mit der Fabp4 cre Linie zwar Fettgewebe-spezifisch, ermöglicht jedoch keinen kompletten PID1 *knockout*. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass verschiedene Zelltypen wie Endothelzellen ebenfalls PID1 exprimieren und die FABP4-vermittelte Cre-Expression nicht zur genetischen PID1-Deletion in diesen Zelltyp führt. Der orale Glukose Toleranztest (OGTT) zeigt eine verbesserte Glukose-Aufnahme in die Gewebe der PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp cre<sup>+</sup> Mäuse, verglichen mit cre- *littermates*. Dies ist durch eine signifikant erhöhte <sup>3</sup>H-Deoxyglukose Aufnahme ins subWAT, iBAT und scBAT zu erklären (Abb.4.1.5 C+D). *In vitro* zeigen die PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>+</sup> Adipozyten eine beeinträchtigte Glukose-Aufnahme nach Insulin-Stimulation verglichen mit PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>-</sup> Adipozyten, hingegen ist die postprandiale Glukose-Aufnahme bei dem OGTT Experiment in den cre<sup>+</sup> Mäusen verbessert. Durch die basal erhöhte Glut4 Dichte an der Plasmamembran der PID1<sup>d/d</sup> flox Fabp4 cre<sup>+</sup> Adipozyten wird vermutlich eine schnellere, initiale Glukose-Aufnahme ermöglicht, welche die Gesamtaufnahme in die Fettgewebe beeinflusst (Abb.4.1.5 C). Eine weitere Ursache könnten Unterschiede in den Plasma Insulinwerten bzw. in der Insulinsensitivität sein, da die globalen PID1<sup>-/-</sup> Mäuse Insulin-sensitiver waren (Doktorarbeit

Kirstin Albers). Das Plasma-Insulinkonzentration wurde in diesem Experiment jedoch nicht gemessen.

Die verbesserte  $^3\text{H}$ -Deoxyglukose Aufnahme in die  $\text{PID1}^{\text{d/d}}$  flox  $\text{Fabp4 cre+}$  Fettgewebe korreliert mit der Effizienz des  $\text{PID1}$  *knockdowns*, d.h. umso höher die Glukose-Aufnahme im Gewebe, desto niedriger die  $\text{PID1}$  Expressionen (Abb.4.1.5 D). Durch die signifikant verbesserte Glukose-Aufnahme ins Fettgewebe der  $\text{PID1}^{\text{d/d}}$  flox  $\text{Fabp4 cre+}$  Mäuse wurde die relative Genexpression von dem Glukose induzierten Transkriptionsfaktor  $\text{Crebbp}\beta$  und  $\text{DNL}$  Genen im subWAT der  $\text{cre-}$  und  $\text{cre+}$  Mäuse gemessen. Die Expressionen von  $\text{Crebbp}\beta$ ,  $\text{Elovl6}$  und  $\text{Scd1}$  sind zwar etwas erhöht im subWAT der  $\text{PID1}^{\text{d/d}}$  flox  $\text{Fabp4 cre+}$  Mäuse, jedoch nicht signifikant. Grund dafür könnte der nur etwa 50%  $\text{PID1}$  *knockdown* im subWAT sein. In den globalen  $\text{PID1}$  *knockout* Mäusen wurde die  $\text{PID1}$  Expression im subWAT zu ca. 90% reduziert, was mit einer verbesserten Glukose-Aufnahme und signifikant hochregulierten  $\text{Crebbp}\beta$  und  $\text{DNL}$  Genen im subWAT korrelierte (Doktorarbeit Kirstin Albers).

### 5.3 Die Rolle von $\text{PID1}$ für die $\text{LRP1}$ vermittelte Lipoprotein-Aufnahme

Um die Rolle von  $\text{PID1}$  für die Lipidprozessierung in der Leber zu untersuchen, wurden Hepatozyten-spezifische  $\text{PID1}$ -defiziente-Tiere generiert. Um eine kompensatorische Funktion des  $\text{LDLR}$  auszuschließen, wurden die Tiere auf den  $\text{LDLR}$ -defizienten Hintergrund gekreuzt. Die Bilder aus Abschnitt 4.2.1 zeigen, dass  $\text{LRP1}$  in den Lebern dieser Tieren ( $\text{LDLR}^{-/}\text{PID1}^{\text{d/d}}$  flox Albumin  $\text{cre+}$ ) basal an der Plasmamembran angereichert ist, verglichen mit den  $\text{cre-}$  Lebern. Durch die Insulin-Stimulation erfolgt in den  $\text{LDLR}^{-/}\text{PID1}^{\text{d/d}}$  flox Albumin  $\text{cre-}$  Lebern eine starke  $\text{LRP1}$  Zunahme an der Zelloberfläche, welche in den  $\text{cre+}$  Lebern jedoch nicht beobachtet werden kann.

Die PTB Domäne von  $\text{PID1}$  interagiert mit dem unphosphorylierten distalen  $\text{NPxY}$  Motiv von  $\text{LRP1}$  (Caratu, 2007). Zudem beschrieben Kajuwara et al. 2010, dass der Tyrosinrest für diese Bindung essentiell ist. Mutationsanalysen aus der Doktorarbeit von Britta Hofzimmer ergaben, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von dem distalen  $\text{NPxY}$  Motiv die Bindung zu  $\text{PID1}$  unterbindet. In der Doktorarbeit von Kirstin Albers wurde anschließend ein Modell entwickelt, indem  $\text{PID1}$  in die Insulin-stimulierte  $\text{LRP1}$  Translokation involviert ist. Demnach führt die Insulin Stimulationskaskade über eine Kinase zu der Phosphorylierung des distalen  $\text{NPxY}$  Motivs von  $\text{LRP1}$ , sodass  $\text{PID1}$  nicht mehr binden kann und  $\text{LRP1}$  an die Zelloberfläche transloziert. Dieses Modell würde erklären, warum  $\text{LRP1}$  in den  $\text{LDLR}^{-/}\text{PID1}^{\text{d/d}}$  flox Albumin  $\text{cre+}$  Lebern basal an der Plasmamembran erhöht ist, aber durch Insulin-Zugabe nicht an Dichte zunimmt. In einer Studie von Gordts et al. wurde eine  $\text{LRP1}^{\text{n2/n2}}$  Mutante, in der das distale  $\text{NPxYxxL}$  Doppel-Motiv inaktiviert war, in einem  $\text{ApoE}^{-/}$  Hintergrund untersucht. Durch die  $\text{LRP1}^{\text{n2/n2}}$  Mutation wurde  $\text{LRP1}$  nach Insulin-Stimulation vermehrt in den perinuklearen Kompartimenten zurückgehalten, was die Rolle des distalen  $\text{NPxY}$  Motiv für die Insulin-Antwort

bestätigt. In der Doktorarbeit von Britta Hoffzimmer wurde gezeigt, dass PID1 an die LRP1<sup>n2/n2</sup> Mutante nicht binden kann, sodass LRP1 theoretisch in den ApoE<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Hepatozyten ebenfalls an der Plasmamembran angereichert sein müsste. Die Lokalisation von LRP1 in den ApoE<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Leberzellen zeigt aber das Gegenteil. Eine Erklärung dafür wäre die im Modell postulierte Insulin-induzierte Phosphorylierung am distalen NPxY Motiv von LRP1, welche vermutlich den Transport zur Plasmamembran ermöglicht.

In Abschnitt 4.2.2.1 wird gezeigt, dass die Aufnahme muriner <sup>125</sup>I markierter TRLR in primären Leberzellen, auch ohne Insulin-Stimulation, LRP1 abhängig ist. Die radioaktive Markierung ist hierbei an Apo100/48 und ApoE nachzuweisen. In den LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>-/-</sup> Doppel-*knockout* Hepatozyten ist die Endozytose der <sup>125</sup>I-TRLR signifikant reduziert, verglichen mit LDLR<sup>-/-</sup> Hepatozyten. Diese Daten korrelieren mit einer Mausstudie von Rohlmann et al. 1998, in der gezeigt wurde, dass ein Leber-spezifischer LRP1 *knockout* in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen zu einem 2-3 fachen Anstieg der Plasmalipide und zur Akkumulation von ApoB48 haltiger Partikel führt, verglichen mit LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen.

In Abschnitt 4.2.2.2 wurde der Versuch mit primären Hepatozyten aus LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Tieren wiederholt, um die PID1 abhängige Lipoprotein-Aufnahme zu untersuchen. Hierbei wurden neben den murinen TRLR auch humane TRLR verwendet. Bei den murinen TRLR ist die radioaktive Markierung an ApoB, ApoE und ApoC nachzuweisen. Die humanen TRLR sind nur an ApoB und ApoC markiert und insgesamt schwächer gelabelt, was die geringeren Counts, verglichen mit den murinen TRLR, begründet. Durch den PID1 Verlust ist LRP1 vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 4.2.1), trotzdem ist kein Unterschied bei der <sup>125</sup>I-TRLR Aufnahme im Vergleich zu den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-</sup> Zellen zu sehen. LRP1 ist demnach noch funktional, jedoch führt die LRP1 Anreicherung an der Zelloberfläche zu keiner erhöhten Endozytose. Die in der Doktorarbeit von Kristin Albers beobachtete signifikant verbesserte Aufnahme der PID1<sup>-/-</sup> Hepatozyten, verglichen mit wt Hepatozyten, wird deswegen vermutlich durch die Hochregulation des LDLR in den Leberzellen verursacht.

Im Gegensatz zur Aufnahme ist der intrazelluläre Abbau der mTRLR und der hTRLR in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Hepatozyten nach 4 Stunden Inkubation signifikant reduziert, verglichen mit den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-</sup> Hepatozyten. Mit Hilfe der McFarlane-Methode wurden die Tyrosinreste der Apolipoproteine radioaktiv mit <sup>125</sup>Iod markiert. Intrazellulär können die <sup>125</sup>I-TRLR zu <sup>125</sup>I-Monoiodo-Tyrosin abgebaut werden, welches von den Zellen zurück ans Medium abgegeben wird und anschließend quantifiziert werden kann. (Goldstein et al., 1985). Zum Beispiel werden LDL Partikel nach der LDLR-vermittelten Endozytose komplett im Lysosom abgebaut, während der LDLR zurück zur Plasmamembran recyclet wird (Brown et al., 1983). Im Vergleich zur LDL Degradation ist der intrazelluläre Abbau der TRLR verzögert, da TRLR überwiegend über LRP1 in die Leber aufgenommen

werden (Heeren et al., 1999). Hierbei werden manche Komponenten, wie ApoE und ApoC, nicht lysosomal abgebaut, sondern in einem *sorting endosome* zusammen mit LRP1 recycled und re-seziert. Das gesonderte Recycling könnte demnach die verzögerte intrazelluläre Degradation der TRLR erklären (Heeren et al., 1999). Im Gegensatz zum LDLR wird LRP1 vermutlich nicht zurück zur Plasmamembran, sondern zu den perinukleären Kompartimenten recyclet, da LRP1 dort normalerweise lokalisiert ist (Laatsch et al., 2009). PID1 interagiert und kolokalisiert mit LRP1 in diesen Kompartimenten (Kajiwara et al., 2010) und ist für die intrazelluläre LRP1 Retention essentiell, da die PID1 Defizienz eine erhöhte LRP1 Dichte an der Plasmamembran verursacht (Abb.4.2.1). Über den Mechanismus der PID1 und LRP1 Bindung ist noch wenig bekannt. Eine Annahme wäre, dass PID1 durchgängig perinukleär lokalisiert ist und an LRP1 bindet, sobald der Rezeptor zurück ins Zellinnere transportiert wird. Eine weitere Theorie wäre, dass PID1 in den Recyclingprozess eingreift, indem es LRP1 auf Ebene des *sorting endosomes* abfängt und zu der perinukleären Position bringt. Um diesen Mechanismus aufzuklären, muss herausgefunden werden, ob noch weitere Interaktionspartner von PID1 involviert sind. PID1 besteht hauptsächlich aus der PTB Domäne, welche bereits mit LRP1 wechselwirkt und weist, laut PROSITE Analyse (ExpASY, Bioinformatics Recourse Portal), keine weiteren funktionellen Domänen auf. Es ist bekannt, dass PID1 nur an das unphosphorylierte distale NPxY Motiv von LRP1 bindet, sodass der Phosphorylierungsstatus als An- und Ausschalter der PID1-LRP1 Interaktion fungiert. Das funktional nächst verwandte Adaptorprotein von PID1 ist ARH, welches die LDLR Endozytose in Leberzellen reguliert. Im Gegensatz zu PID1 wechselwirkt ARH mit Clathrin und der  $\beta_2$ -Untereinheit von AP-2, jedoch werden diese Interaktionen durch andere funktionelle Domänen, unabhängig von der PTB Domäne, ermöglicht (He et al., 2002). Immunfluoreszenzfärbung oder intravital Mikroskopie mit einem Fluoreszenz-gelabelten Antikörper gegen PID1 könnten Aufschluss über eventuelle Veränderungen der PID1 Lokalisation +/- Insulin-Stimulation geben. Um die PID1 Wechselwirkung mit noch weiteren Interaktionspartnern zu identifizieren, könnten zudem *pull-down* Experimente mit rekombinanten His-tagged PID1 Peptiden oder Co-Immunpräzipitation +/- Insulin-Stimulation durchgeführt werden. Trotz des ungeklärten Mechanismus kann anhand der in der Literatur beschriebenen Unterschiede im intrazellulären Abbau davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Hepatozyten vermehrt LRP1 abhängig ist. In den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-</sup> Zellen wird die Aufnahme demnach vermehrt durch andere Rezeptoren wie die Heparansulfat Proteoglycan (HSPG) Rezeptoren ausgeführt, welche wie LRP1 mit ApoE und LPL interagieren (Ji et al., 1993; Williams et al., 1992). Eine Mausstudie von Foley et al., 2013 zeigte, dass neben LDLR und LRP1, das HSPG Syndecan-1 für die Aufnahme der postprandialen TRLR in der Leber zuständig war. Die hepatische Syndecan-1 Expression wurde nicht durch den Verlust von LDLR und LRP1 beeinflusst (*vice*

versa), sodass die Rezeptorfamilien vermutlich unabhängig voneinander agieren (Foley et al., 2013).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2.2.2, dass LRP1 (trotz veränderter Lokalisation) vermutlich noch funktional ist. Durch die erhöhte Plasmamembran-Dichte von LRP1 scheinen die TRLR Partikel vorrangig via LRP1 endozytiert zu werden, da die intrazelluläre Degradation signifikant abnimmt. Die LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre- Hepatozyten, mit normaler LRP1 Lokalisation, nehmen die gleiche Menge an TRLRs vermutlich über HSPG bzw. Syndecan-1 auf. Um sicher zu stellen, dass LRP1 für die TRLR Aufnahme in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre+ Hepatozyten verantwortlich war, müsste das Experiment mit anderen LRP1 Liganden wiederholt werden. So wurde in einer Studie von Laatsch et al., 2009 die LRP1-spezifische Aufnahme mittels Fluoreszenz- und Radioaktiv-gelabelten RAP und  $\alpha 2M^*$  *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Laatsch et al., 2009).

Um die Relevanz der hepatischen PID1-abhängigen Lipid-Aufnahme für die Plasma-Lipidwerte zu bestimmen, wurden im Abschnitt 4.2.3 die Plasmalipide der Chow gefütterten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre-/+ Mäuse dargestellt. Insgesamt sind die Unterschiede in den Weibchen stärker als bei den Männchen. In beiden Geschlechtern kommt es zu einem Anstieg des Plasma-Cholesterins, durch die Akkumulation von TRL/R und IDL/LDL in den cre+ Mäusen. Bei den Weibchen ist zudem ein Anstieg der Triglyzeride, durch die Ansammlung von TRL/R und IDL/LDL zu beobachten. Nach 8 Wochen WTD zeigen die Weibchen und Männchen in Abschnitt 4.2.4 einen Anstieg der Plasmalipide. Dieser ist in LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre+ Mäusen stärker als in LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre- Mäusen, weiterhin durch die vermehrte Akkumulation von TRL/R. Einzige Ausnahme sind die zwischen den Genotypen unveränderten Cholesterinwerte der Männchen. Interessanterweise zeigen die Weibchen einen signifikanten Unterschied im Plasma-Cholesterin, während die Männchen sich signifikant in den Plasma Triglyzeriden unterscheiden.

Es akkumulieren mehr Lipoprotein Partikel in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre+ Mäusen, verglichen mit LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre- Mäusen. Zudem ähnelt das Lipoproteinprofil der LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre+ Plasmen dem der LDLR<sup>-/-</sup> hepatisch LRP1<sup>-/-</sup> Mäuse (Rohlmann et al., 1998), wobei die Lipoprotein-Akkumulation in den LDLR<sup>-/-</sup> hepatisch LRP1<sup>-/-</sup> Mäusen wesentlich gravierender war. In dem oralen Fett Toleranztest wird zudem gezeigt, dass die postprandiale <sup>3</sup>H-Triolein Aufnahme in die Leber der LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre+ Mäuse reduziert ist (P=0,057), verglichen mit cre- Mäusen. Diese Daten zeigen, dass die LRP1 Funktion *in vivo* in den cre+ Mäusen beeinträchtigt ist, wodurch weniger TRLR aufgenommen werden und die Lipoproteine vermehrt akkumulieren. Die verbesserte Lipoprotein-Aufnahme in die globalen PID1 *knockout* Hepatozyten wurde demnach vermutlich nicht durch LRP1, sondern durch den in der Leber hochregulierten LDLR bedingt. Der Zusammenhang zwischen der veränderten LRP1 Funktion (, durch das distale NPxY Motiv) und dem LDLR in Bezug auf

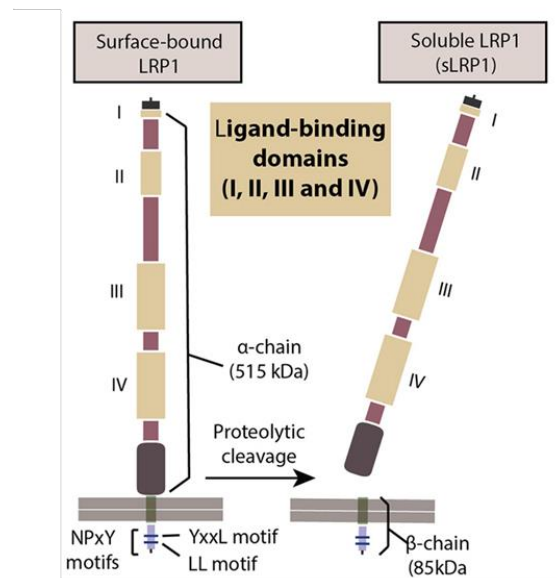
die Lipoprotein-Aufnahme wurde schon vorher *in vivo* beobachtet und korreliert mit den PID1 Daten. In ApoE<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäusen wurde der LDLR ebenfalls in der Leber hochreguliert und verursachte eine verbesserte hepatische Aufnahme der CR (Gordts et al., 2012). Daraufhin wurden die LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäuse mit LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen gekreuzt. Die LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäuse zeigten, ähnlich wie die LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Mäuse, eine erhöhte Lipoprotein-Akkumulation und signifikant verschlechterte Triglyzerid-Werte im Plasma (Gordts et al., 2009), sodass auch hier der LDLR für die erhöhte Lipoprotein-Aufnahme in den ApoE<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäusen verantwortlich war.

Die Leberlipidmessungen zeigen, dass die Leber Triglyzeride/Protein in den weiblichen und männlichen LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Mäusen signifikant reduziert sind, verglichen mit den cre<sup>-</sup> littermates. Die Messung der hepatischen Cholesterinlevel/Protein ist in den Weibchen beider Genotypen gleich, während die cre<sup>+</sup> Männchen, in Relation zu den cre<sup>-</sup> Männchen, signifikant weniger Leber-Cholesterin/Protein aufweisen. Die Leber-Triglyzeride werden reguliert durch die Aktivität von Proteinen für: die Fettsäure Synthese (DNL), die Aufnahme freier Fettsäuren, den Triglyzerid-Export via VLDL oder den Abbau der Fettsäuren ( $\beta$ -Oxidation)(Nguyen et al., 2008). Die Mäuse wurden vorher 4 Stunden gefastet, sodass vermutlich keine DNL stattgefunden hat, da dieser Prozess während der Nahrungskaranz in der Leber inhibiert wird. Zudem zeigt die hepatische Fasn Expression keinen Unterschied zwischen den Genotypen oder Geschlechtern (Abb.4.2.4). Im gefasteten Zustand kommt es vermehrt zur Lipolyse im Fettgewebe, sodass die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma steigt und damit die hepatische Aufnahme der freien Fettsäuren. Der intrazelluläre Anstieg an freien Fettsäuren in der Leber induziert wiederum die VLDL Synthese, während ein Teil der Fettsäuren im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation zur Energie-Versorgung abgebaut wird. Demzufolge nehmen die Lebern der LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Mäuse entweder weniger freie Fettsäuren auf oder der intrazelluläre Abbau via  $\beta$ -Oxidation ist erhöht oder die aus den Fettsäuren synthetisierten Triglyzeride werden vermehrt via VLDL ausgeschieden. Der Schlüsselregulator der  $\beta$ -Oxidation ist PPAR $\alpha$ , ein nukleärer Rezeptor, welcher unter gefasteten-Bedingungen hochreguliert wird (Rui, 2014). Unterschiede in den Leber Triglyzeriden aufgrund veränderter  $\beta$ -Oxidation könnten demnach anhand der PPAR $\alpha$  Expression detektiert werden, jedoch wurde diese nicht gemessen. Die in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Männchen ebenfalls reduzierten hepatischen Cholesterin Level deuten jedoch auf eine vermehrte VLDL Synthese hin, da neben den Triglyzeriden auch Cholesteryl-ester in den VLDL transportiert werden (Feingold and Grunfeld, 2000a). Eine erhöhte VLDL Sekretion würde außerdem die erhöhte Akkumulation von TRL/R in den cre<sup>+</sup> Plasmen erklären. Um den Triglyzerid-Export zu untersuchen, könnte die VLDL Synthese wie in der Studie von Schlein *et al.*, 2016 mittels Tyloxapol Injektion beobachtet werden. Tyloxapol inhibiert den peripheren TRL Abbau, sodass die VLDL Synthese über einen bestimmten



Zeitraum detektiert und zwischen den Genotypen verglichen werden kann (Schlein et al., 2016).

Eine Theorie für die beeinträchtigte LRP1 Funktion und Lipoprotein-Aufnahme *in vivo* ist das s.g. *shedding*. Die meisten Membranproteine sind dem *shedding* Prozess ausgesetzt, bei dem die extrazelluläre Domäne oder die Ektodomäne proteolytisch gespalten wird (Hayashida et al., 2010). Im Falle von LRP1 wurde in humanen BeWO Karzinoma Zellen gezeigt, dass eine Metalloprotease die Membran an der proximalen Region der  $\beta$ -Kette spaltet, wodurch die lösliche LRP1  $\alpha$ -Kette mit einem Ekto-Teil der  $\beta$ -Kette (sLRP-1) entsteht (Quinn et al., 1999; Ramanathan et al., 2015)(siehe Abbildung 5.3). In anderen Studien wurden weitere LRP1 spezifische Metalloproteasen identifiziert, welche überwiegend der ADAM Familie angehören. Zusätzlich scheinen tPA und BACE-1 das *shedding* von LRP1 zu medieren (Etique et al., 2013). Eine Studie von Gorovoy et al., 2010 zeigte, dass die von Makrophagen sezernierte Metalloprotease ADAM17 das *shedding* von LRP1 verursacht. Die Korrelation von Entzündung und LRP1 *shedding* konnte ebenfalls in Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (Ra) oder systemische *Lupus erythematoses* (SLE), durch signifikant erhöhte sLRP1 Werte im Plasma, nachgewiesen werden. Isoliertes sLRP1 ist biologisch aktiv, induziert Signaltransduktionen (p38 MapK) und die Expression regulatorischer Zytokine wie z.B.  $\text{TNF}\alpha$ , CCL2, oder Interleukin 10 (IL-10) in Makrophagen. Demnach wird sLRP1 durch Entzündungen gebildet, um diese anschließend zu regulieren (Gorovoy et al., 2010). Eine weitere Studie zeigte, dass Patienten mit schwerer Hypercholesterinämie zudem erhöhte Level an zirkulierenden sLPR1 aufwiesen, wobei die Plasma sLRP1 Menge durch Statin Behandlung gesenkt wurde (de Gonzalo-Calvo et al., 2015). Statine blockieren die endogene Cholesterin-Synthese und senken somit die Plasma LDL-Level (Feingold and Grunfeld, 2000b). In Folge wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen den Plasma-Cholesterin-Werten und der Bildung von sLRP1 vermutet (de Gonzalo-Calvo et al., 2015). Die ADAM *shedding* Aktivität wird durch inflammatorische, angiogenetische und atherogene Stimulation über die Wirkung von Zytokinen ( $\text{TNF}\alpha$ , IFN $\gamma$ ), Wachstumsfaktoren (VEGF, PDGF), oder oxidierte LDL induziert. Außerdem konnte in humanen atherogenen Läsionen die Expression der „LRP1 *shedase*“ ADAM17 nachgewiesen werden (van der Vorst et al., 2012). Interessanterweise wurde in einer Studie von Holdt et al., 2008 eine athero-protective Rolle von ADAM17 beobachtet, welche mit der anti-atherogenen Bedeutung von LRP1 korreliert (Espirito Santo et al., 2004; Overton et al., 2007) (Boucher et al., 2003). Hierbei wurde in Atherosklerose-resistenten FVB LDLR *knockout* Mäusen eine erhöhte ADAM17 Aktivität beobachtet, welche mit reduzierter Läsion-Formation und erhöhtem Plasma  $\text{TNF}\alpha$  Level korrelierte (Holdt et al., 2008).



### Abb.5.3 LRP1 shedding

Der an der Oberfläche lokalisierte LRP1 Rezeptor wird durch Metalloproteasen an der proximalen Seite der  $\beta$ -Kette ( $\beta$ -chain) proteolytisch gespalten, wodurch die lösliche  $\alpha$ -Kette ( $\alpha$ -chain) mit einem kleinen Teil der  $\beta$ -Kette entsteht (sLRP1). Bild adaptiert nach (Ramanathan et al., 2015)

LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse gehören zu den hyperlipidämischen Mausmodellen, da durch den LDLR-Verlust vermehrt LDL in der Zirkulation akkumulieren. Durch die Aufnahme modifizierter oxidiertes LDL werden Makrophagen der arteriellen Intima zu Schaumzellen, was die Entzündung der Intima verursacht und zu Atherosklerose führt. Um die Bedeutung von PID1 für die Atherosklerose-Entwicklung zu analysieren, wurden mit weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen Atherosklerose-Studien durchgeführt, da in vorherigen Studien Geschlechter-Unterschiede in der Atherosklerose-Entwicklung beobachtet wurden. In jungen ApoE<sup>-/-</sup> Weibchen waren die atherogenen Läsionen größer und weiter fortgeschritten, verglichen mit den Männchen, vermutlich durch eine verstärkte zelluläre Immunantwort gegenüber den akkumulierenden oxLDL (Caligiuri et al., 1999). Geschlechter-spezifische Unterschiede können auch in den 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäusen beobachtet werden. Im Vergleich zu den Männchen zeigen die 8 Wochen WTD gefütterten LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Weibchen insgesamt höhere Plasma-Cholesterin-Werte, welche signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen aufweisen. Zudem zeigten die Taqman PCR Messung der Leber eine deutlich höhere mCxcl1 Expression in den Weibchen verglichen mit den Männchen. Durch die erhöhten Plasma-Cholesterin-Level sind die Weibchen anfälliger für Lipid-Ablagerungen in der Arterienwand, während Cxcl1 die Entzündungsreaktion durch Rekrutierung von Leukozyten begünstigt (Zhou et al., 2011). Demzufolge wurden die Atherosklerose-Studien mit Weibchen durchgeführt. Bei der *en face* Färbung der Aorten-Plaueflächen der 8 und 12 Wochen WTD gefütterten Weibchen kann eine Tendenz von mehr Atherosklerose-Entwicklung in den LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>+</sup> Mäusen detektiert werden

(Abb. 4.14.1+4.14.2), jedoch sind die Unterschiede zu den *cre*- Tieren nicht signifikant. Außerdem zeigt die Analyse der atherogenen Läsionen in den Aortenwurzel-Schnitten der 8 Wochen gefütterten Mäusen keinen Unterschied zwischen den Genotypen (Abb. 4.14.3). Verglichen mit vorherigen Studien mit LDLR<sup>-/-</sup> vs. LDLR<sup>-/-</sup> hepatisch LRP1<sup>-/-</sup> (Rohlmann, 1997), oder LDLR<sup>-/-</sup> vs. LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> (Gordts et al., 2009) Mäusen ist der Krankheitsverlauf durch den Verlust von PID1 weniger gravierend, weswegen PID1 vermutlich keinen signifikanten Einfluss auf die Atherosklerose-Entwicklung hat.

### 5.3.1 „shedding“ Hypothese

Auf Grund des LDLR *knockouts* akkumulieren vermehrt LDL in der Zirkulation der LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin *cre*-/+ Mäuse. Durch die WTD Fütterung der LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin *cre*-/+ Mäuse wird die LDL Akkumulation verstärkt, sodass sich vermehrt oxLDL in der Arterienwand ablagern und eine chronisch entzündlichen Erkrankung der Arterien induzieren. Außerdem entwickeln die Mäuse eine schwere Hypercholesterinämie. Die oxLDL induzieren eine verstärkte Sezernierung der LRP1-spezifischen ADAM17 Metalloprotease von Makrophagen. Diese verursachen das *shedding* von LRP1, sodass die zirkulierenden sLRP1 Level steigen und mit der Hypercholesterinämie korrelieren. Durch den Verlust von PID1 in Leberzellen ist LRP1 vermehrt an der Zelloberfläche lokalisiert und somit anfälliger fürs *shedding*. In Folge wird die LRP1 Funktion als Lipoprotein Rezeptor beeinträchtigt, was die vermehrte TRL/R und IDL/LDL Akkumulation in den LDLR<sup>-/-</sup> PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin *cre*+ Mäusen verglichen mit den *littermates* erklärt. Da die Metalloproteasen von Makrophagen sezerniert werden, bleibt dieser Effekt in den *in vitro* Kulturen primärer Hepatozyten aus, sodass kein Unterschied in der <sup>125</sup>I-TRLR-Aufnahme zu beobachten war.

Mehrere Studien belegen, dass LRP1 in verschiedenen Geweben athero-protektiv ist und auch dem löslichen sLRP1 wird eine regulatorische Rolle in chronischen Entzündungen zugesprochen. Mit der Annahme, dass *shedding* stattfindet, hat das zirkulierende sLRP1 der Atherosklerose-Entwicklung vermutlich entgegengewirkt. In der Studie mit LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäusen entwickelten die LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> deutlich mehr Atherosklerose verglichen mit den LDLR<sup>-/-</sup> *littermates*, was die „*shedding* Hypothese“ unterstützt. Nach 12 Wochen WTD war die Läsionsfläche in den LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäusen signifikant höher und zeigte mehr SMC Infiltration und Kollagenbildung (Gordts et al., 2009). Durch die Mutation im distalen NPxY Motiv ist der LRP1<sup>n2/n2</sup> Rezeptor im Zellinneren „gefangen“ und weniger an der Zelloberfläche lokalisiert (Gordts et al., 2012). Demnach wurde in den LDLR<sup>-/-</sup>LRP1<sup>n2/n2</sup> Mäusen weniger anti-atherogenes sLRP1 via *shedding* freigesetzt, sodass sich der Krankheitsverlauf verschlechterte.

Zusammenfassend konnte mit diesen Studien erstmalig die Bedeutung von PID1 für die Organ-spezifische Funktionen des LRP1 nachgewiesen werden. In weiteren Studien, um z.B. die „*shedding* Hypothese“ zu bestätigen, müssten zunächst die sLRP1 Level im Plasma nachgewiesen werden. Im Weiteren wäre der Nachweis von ADAM17 im Plasma, der Leber und den Plaqueflächen hilfreich. Zudem könnte die *in vivo* Funktionalität der LRP1 spezifischen Aufnahme mit weiteren radioaktiv gelabelten LRP1 Liganden wie RAP oder  $\alpha 2M^*$  untersucht werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das LDL-Rezeptor-*related* Protein 1 (LRP1) gehört zur LDLR-Familie und spielt eine bedeutende Rolle bei der hepatischen Aufnahme Triglyzerid-reicher Lipoprotein *Remnants* (TRLR). LRP1 ist essentiell in der embryonalen Entwicklung, da globale LRP1 *knockout* Embryonen nicht überlebensfähig sind. Zudem erkennt LRP1 eine Vielzahl von Liganden und ist in unterschiedlichen Geweben athero-protektiv. Im Fett- und Muskelgewebe ist LRP1 in Glut4 *storage vesicles* (GSV) lokalisiert, welche Insulin-induziert an die Zelloberfläche translozieren, um postprandial vermehrt Glukose aufzunehmen. In der Leber wird LRP1 ebenfalls Insulin-vermittelt von perinukleären Kompartimenten an die Plasmamembran der Hepatozyten transportiert, um die TRLR aufzunehmen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das *phosphotyrosin interacting domain containing 1* (PID1), ein Adaptorprotein von LRP1, essentiell für die Glut4 Lokalisation in den perinukleären Kompartimenten primärer brauner Adipozyten ist. In braunen Adipozyten von PID1<sup>-/-</sup> Mäusen ist Glut4 vermehrt an der Zelloberfläche lokalisiert, sodass in Folge unstimulierte Adipozyten unter basalen Bedingungen mehr Glukose aufnehmen während der Insulin-vermittelte Anstieg der Glukose-Aufnahme vermutlich aufgrund erhöhter GLUT4-Degradation ausbleibt. Fettgewebe-spezifische PID1 *knockout* Mäuse zeigen eine verbesserte postprandiale Glukose-Aufnahme in die verschiedenen Fettgewebe, wodurch die Glut4 Anreicherung an der Zelloberfläche zu einer schnelleren, initialen Glukose-Aufnahme spezifisch in das weiße und braune Fettgewebe führt. Um die Funktionalität von LRP1 in PID1<sup>-/-</sup> Lebern zu untersuchen, wurden LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>Δ/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> Mäuse generiert. Durch die Leber-spezifische PID1 Deletion auf genetischem Hintergrund von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen ist LRP1, analog zu Glut4 in Fettzellen, vermehrt an der hepatischen Zelloberfläche lokalisiert. Der PID1 Verlust in primären LDLR<sup>-/-</sup> Hepatozyten hat keinen Einfluss auf die TRLR-Aufnahme, jedoch ist die intrazelluläre Degradation verglichen mit LDLR<sup>-/-</sup> Zellen reduziert. *In vivo* führt der Doppel*knockout* zu mehr Lipoprotein-Akkumulation, da weniger TRLR in die Leber aufgenommen werden. Trotzdem zeigen die Doppel-*knockouts* nur eine leichte Tendenz zu mehr Atherosklerose verglichen mit LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, was vermutlich auf funktionale LRP1 *shedding*-Produkte im Plasma zurückzuführen ist.

Zusammenfassend scheint PID1 essentiell für die intrazelluläre Retention bzw. die postprandiale Insulin-stimulierte Translokation von Glut4 in Fettzellen und LRP1 in Leberzellen zu sein. Während der Fettgewebe-spezifische Verlust von PID1 die Glukose-Aufnahme verbessert und somit Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes entgegenwirkt, führt die Leber-spezifische Depletion zu einer Dyslipidämie in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, da LRP1 *in vivo* nur beeinträchtigt funktional ist.

## 6.1 Summary

LDL-receptor-*related* protein 1 (LRP1) belongs to LDLR family and plays an important role in hepatic uptake of triglyceride rich lipoprotein remnants (TRLR). LRP1 is essentiell for embryonic development as global LRP1 knockout embryos are unable to survive. In addition, LRP1 recognizes a variety of ligands and has an athero-protective importance in different tissues. In fat and muscle tissue, LRP1 is part of the Glut4 storage vesicles (GVS), which translocate to the plasma membrane by insulin stimulation to take up glucose in postprandial state. In liver, LRP1 translocates similarly from perinuclear compartments to the plasma membrane by insulin stimulation to take up TRLR.

This study could show that, phosphotyrosin interacting domain containing 1 (PID1), an adaptor protein of LRP1, is essentiell for Glut4 localisation in perinuclear compartments of primary brown adipocytes. In brown adipocytes from PID1 knockout mice, Glut4 is enriched on the cell surface, which leads to a higher basal glucose uptake in unstimulated cells, while insulin-induced increase of glucose uptake is absent. Fat-specific PID1 knockout mice show improved postprandial glucose clearance into different fat tissues, so that enriched Glut4 density on the cell surface of adipocytes leads to a faster, initial glucose uptake. To selectively analyse LRP1 function in PID1<sup>-/-</sup> liver, LDLR<sup>-/-</sup>PID1<sup>d/d</sup> flox Albumin cre<sup>-/+</sup> were generated. Liver-specific PID1 loss in a genetic background of LDLR<sup>-/-</sup> mice leads to an increased localisation of LRP1 on hepatic cell surface, analogous to Glut4 in fat cells. PID1 deletion in primary LDLR<sup>-/-</sup> hepatocytes has no influence on TRLR uptake, however intracellular degradation is reduced, compared to LDLR<sup>-/-</sup> hepatocytes. *In vivo* deletion of both, LDLR and PID1, in liver leads to an increased lipoprotein accumulation, as less TRLR are taken up by liver. However, those mice show only a slight tendency to develop more atherosclerosis compared to LDLR<sup>-/-</sup> mice.

In conclusion, PID1 seems to be essentiell for intracellular retention and postprandial insulin stimulated translocation of Glut4 in fat tissue and LRP1 in liver. Fat-specific knockout of PID1 improves glucose clearance and therefore combats disorders such as type 2 diabetes, while PID1 deletion in liver results in dyslipidemia in LDLR<sup>-/-</sup> mice, as LRP1 function is impaired *in vivo*.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Austin, M.A., Hutter, C.M., Zimmern, R.L., and Humphries, S.E. (2004). Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol* **160**, 421-429.

Bajzer, M., Olivieri, M., Haas, M.K., Pfluger, P.T., Magrisso, I.J., Foster, M.T., Tschop, M.H., Krawczewski-Carhuatanta, K.A., Cota, D., and Obici, S. (2011). Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice. *Diabetologia* **54**, 3121-3131.

Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., *et al.* (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* **17**, 200-205.

Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* **10**, 24-36.

Batzer, A.G., Blaikie, P., Nelson, K., Schlessinger, J., and Margolis, B. (1995). The Phosphotyrosine Interaction Domain of Shc Binds an Lxnpxy Motif on the Epidermal Growth-Factor Receptor. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4403-4409.

Beisiegel, U., Weber, W., and Bengtsson-Olivecrona, G. (1991). Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8342-8346.

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

Boon, M.R., Kooijman, S., van Dam, A.D., Pelgrom, L.R., Berbee, J.F., Visseren, C.A., van Aggele, R.C., van den Hoek, A.M., Sips, H.C., Lombes, M., *et al.* (2014). Peripheral cannabinoid 1 receptor blockade activates brown adipose tissue and diminishes dyslipidemia and obesity. *FASEB J* **28**, 5361-5375.

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

Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell* **10**, 237-245.

Brown, M.S., Anderson, R.G., and Goldstein, J.L. (1983). Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* **32**, 663-667.

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

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331-340.

Bryant, N.J., Govers, R., and James, D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 267-277.

Caligiuri, G., Nicoletti, A., Zhou, X., Tornberg, I., and Hansson, G.K. (1999). Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* *145*, 301-308.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* *84*, 277-359.

Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M., and Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* *24*, 3057-3067.

Caratu, G., Allegra, D., Bimonte, M., Schiattarella, G.G., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Napolitano, M., Russo, T., and Zambrano, N. (2007). Identification of the ligands of protein interaction domains through a functional approach. *Mol Cell Proteomics* *6*, 333-345.

Chen, X., Iqbal, N., and Boden, G. (1999). The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest* *103*, 365-372.

Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W., and Libby, P. (1992). Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* *140*, 301-316.

Collins, T., and Cybulsky, M.I. (2001). NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* *107*, 255-264.

Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright, R.W., Jr., and Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci* *5*, 474-488.

de Gonzalo-Calvo, D., Cenarro, A., Martinez-Bujidos, M., Badimon, L., Bayes-Genis, A., Ordonez-Llanos, J., Civeira, F., and Llorente-Cortes, V. (2015). Circulating soluble low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (sLRP1) concentration is associated with hypercholesterolemia: A new potential biomarker for atherosclerosis. *Int J Cardiol* *201*, 20-29.

Deffieu, M.S., and Pfeffer, S.R. (2011). Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 18932-18936.

Dieckmann, M., Dietrich, M.F., and Herz, J. (2010). Lipoprotein receptors--an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biol Chem* *391*, 1341-1363.

Dorn, C., Riener, M.O., Kirovski, G., Saugspier, M., Steib, K., Weiss, T.S., Gabele, E., Kristiansen, G., Hartmann, A., and Hellerbrand, C. (2010). Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* *3*, 505-514.

Eck, M.J., DhePaganon, S., Trub, T., Nolte, R.T., and Shoelson, S.E. (1996). Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* *85*, 695-705.

Espirito Santo, S.M., Pires, N.M., Boesten, L.S., Gerritsen, G., Bovenschen, N., van Dijk, K.W., Jukema, J.W., Princen, H.M., Bensadoun, A., Li, W.P., *et al.* (2004). Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. *Blood* *103*, 3777-3782.

Etique, N., Verzeaux, L., Dedieu, S., and Emonard, H. (2013). LRP-1: a checkpoint for the extracellular matrix proteolysis. *Biomed Res Int* *2013*, 152163.



Farooq, A., Plotnikova, O., Zeng, L., and Zhou, M.M. (1999). Phosphotyrosine binding domains of Shc and insulin receptor substrate 1 recognize the NPXpY motif in a thermodynamically distinct manner. *Journal of Biological Chemistry* 274, 6114-6121.

Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000a). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA)).

Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000b). Obesity and Dyslipidemia. In *Endotext*, L.J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA)).

Flynn, D.C. (2001). Adaptor proteins. *Oncogene* 20, 6270-6272.

Foley, E.M., Gordts, P.L., Stanford, K.I., Gonzales, J.C., Lawrence, R., Stoddard, N., and Esko, J.D. (2013). Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2065-2074.

Francke, U., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1984). Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2826-2830.

Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., *et al.* (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 292, 1394-1398.

Getz, G.S., and Reardon, C.A. (2006). Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 242-249.

Goldberg, I.J., Eckel, R.H., and Abumrad, N.A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of Lipid Research* 50, S86-S90.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1978). Familial hypercholesterolemia: pathogenesis of a receptor disease. *Johns Hopkins Med J* 143, 8-16.

Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W., and Schneider, W.J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1, 1-39.

Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.

Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.

Gordts, P.L., Bartelt, A., Nilsson, S.K., Annaert, W., Christoffersen, C., Nielsen, L.B., Heeren, J., and Roebroek, A.J. (2012). Impaired LDL receptor-related protein 1 translocation correlates with improved dyslipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *PLoS One* 7, e38330.

Gordts, P.L., Reekmans, S., Lauwers, A., Van Dongen, A., Verbeek, L., and Roebroek, A.J. (2009). Inactivation of the LRP1 intracellular NPxYxxL motif in LDLR-deficient mice enhances postprandial dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1258-1264.

- Gorovoy, M., Gaultier, A., Campana, W.M., Firestein, G.S., and Gonias, S.L. (2010). Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signalling and cytokine expression by macrophages. *J Leukoc Biol* 88, 769-778.
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275-281.
- Guttman, M., Betts, G.N., Barnes, H., Ghassemian, M., van der Geer, P., and Komives, E.A. (2009). Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *Proteomics* 9, 5016-5028.
- Hayashida, K., Bartlett, A.H., Chen, Y., and Park, P.W. (2010). Molecular and Cellular Mechanisms of Ectodomain Shedding. *Anat Rec* 293, 925-937.
- He, G., Gupta, S., Yi, M., Michaely, P., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2002). ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem* 277, 44044-44049.
- Heeren, J., Beisiegel, U., and Grewal, T. (2006). Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 442-448.
- Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M., and Beisiegel, U. (2002). Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J Mol Med (Berl)* 80, 576-584.
- Heeren, J., Weber, W., and Beisiegel, U. (1999). Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 3), 349-359.
- Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schon, M.R., Abumrad, N.A., Bluher, M., Klein, S., and Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333-338.
- Herz, J., Clouthier, D.E., and Hammer, R.E. (1993). Ldl Receptor-Related Protein Internalizes and Degrades Upa-Pai-1 Complexes and Is Essential for Embryo Implantation (Vol 71, Pg 421, 1992). *Cell* 73, 428-428.
- Herz, J., and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signalling receptor. *J Clin Invest* 108, 779-784.
- Hofmann, S.M., Zhou, L., Perez-Tilve, D., Greer, T., Grant, E., Wancata, L., Thomas, A., Pfluger, P.T., Basford, J.E., Gilham, D., *et al.* (2007). Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest* 117, 3271-3282.
- Holdt, L.M., Thiery, J., Breslow, J.L., and Teupser, D. (2008). Increased ADAM17 mRNA expression and activity is associated with atherosclerosis resistance in LDL-receptor deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1097-1103.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.
- Iqbal, J., and Hussain, M.M. (2009). Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1183-1194.

Jedrychowski, M.P., Gartner, C.A., Gygi, S.P., Zhou, L., Herz, J., Kandror, K.V., and Pilch, P.F. (2010). Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signalling. *J Biol Chem* 285, 104-114.

Ji, Z.S., Brecht, W.J., Miranda, R.D., Hussain, M.M., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. (1993). Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 268, 10160-10167.

Jorgensen, J.A., Zdravec, D., and Jacobsson, A. (2007). Norepinephrine and rosiglitazone synergistically induce Elovl3 expression in brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1159-1168.

Kajiwara, Y., Franciosi, S., Takahashi, N., Krug, L., Schmeidler, J., Taddei, K., Haroutunian, V., Fried, U., Ehrlich, M., Martins, R.N., *et al.* (2010). Extensive proteomic screening identifies the obesity-related NYGGF4 protein as a novel LRP1-interactor, showing reduced expression in early Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 5, 1.

Kanerva, K., Uronen, R.L., Blom, T., Li, S., Bittman, R., Lappalainen, P., Peranen, J., Raposo, G., and Ikonen, E. (2013). LDL cholesterol recycles to the plasma membrane via a Rab8a-Myosin5b-actin-dependent membrane transport route. *Dev Cell* 27, 249-262.

Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C.L., Wood, L., and Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol-Endoc M* 280, E745-E751.

Klinger, S.C., Siupka, P., and Nielsen, M.S. (2015). Retromer-Mediated Trafficking of Transmembrane Receptors and Transporters. *Membranes (Basel)* 5, 288-306.

Krieger, M. (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68, 523-558.

Krott, L.M., Piscitelli, F., Heine, M., Borrino, S., Scheja, L., Silvestri, C., Heeren, J., and Di Marzo, V. (2016). Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation. *J Lipid Res* 57, 464-473.

Kzhyshkowska, J., Neyen, C., and Gordon, S. (2012). Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* 217, 492-502.

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

Laatsch, A., Panteli, M., Sornsakrin, M., Hoffzimmer, B., Grewal, T., and Heeren, J. (2012). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E. *PLoS One* 7, e29385.

Lafontan, M., and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34, 1057-1091.

Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Barres, R., and Tanti, J.F. (2003). Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Biochem Soc Trans* 31, 1152-1156.

Lefebvre, P.J., and Scheen, A.J. (1999). Glucose metabolism and the postprandial state. *Eur J Clin Invest* 29 Suppl 2, 1-6.

Lewis, G.F., Uffelman, K.D., Szeto, L.W., Weller, B., and Steiner, G. (1995). Interaction between Free Fatty-Acids and Insulin in the Acute Control of Very-Low-Density Lipoprotein Production in Humans. *Journal of Clinical Investigation* 95, 158-166.

Libby, P., Ridker, P.M., and Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143.

Lotti, L.V., Lanfranccone, L., Migliaccio, E., Zompetta, C., Pelicci, G., Salcini, A.E., Falini, B., Pelicci, P.G., and Torrisi, M.R. (1996). Sch proteins are localized on endoplasmic reticulum membranes and are redistributed after tyrosine kinase receptor activation. *Mol Cell Biol* 16, 1946-1954.

Mahley, R.W., and Huang, Y. (2007). Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest* 117, 94-98.

Martinez-deMena, R., and Obregon, M.J. (2005). Insulin increases the adrenergic stimulation of 5' deiodinase activity and mRNA expression in rat brown adipocytes; role of MAPK and PI3K. *J Mol Endocrinol* 34, 139-151.

Matias, I., Gonthier, M.P., Orlando, P., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Cervino, C., Petrosino, S., Hoareau, L., Festy, F., Pasquali, R., *et al.* (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3171-3180.

McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* 41, 36-48.

Meredith, M.J. (1988). Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture. *Cell Biol Toxicol* 4, 405-425.

Mishra, S.K., Watkins, S.C., and Traub, L.M. (2002). The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16099-16104.

Moore, M.C., Coate, K.C., Winnick, J.J., An, Z., and Cherrington, A.D. (2012). Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Adv Nutr* 3, 286-294.

Nagai, M., Meerloo, T., Takeda, T., and Farquhar, M.G. (2003). The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes. *Mol Biol Cell* 14, 4984-4996.

Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.

Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., and Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92, 272-283.

Overton, C.D., Yancey, P.G., Major, A.S., Linton, M.F., and Fazio, S. (2007). Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ Res* 100, 670-677.

Panarotto, D., Remillard, P., Bouffard, L., and Maheux, P. (2002). Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *European Journal of Clinical Investigation* 32, 84-92.

Pedersen, L., Pilegaard, H., Hansen, J., Brandt, C., Adser, H., Hidalgo, J., Olesen, J., Pedersen, B.K., and Hojman, P. (2011). Exercise-induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleukin-6 expression. *J Physiol* **589**, 1409-1420.

Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., and Pelicci, P.G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**, 93-104.

Pepino, M.Y., Kuda, O., Samovski, D., and Abumrad, N.A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr* **34**, 281-303.

Perwitz, N., Fasshauer, M., and Klein, J. (2006). Cannabinoid receptor signalling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin. *Horm Metab Res* **38**, 356-358.

Perwitz, N., Wenzel, J., Wagner, I., Buning, J., Drenckhan, M., Zarse, K., Ristow, M., Lilienthal, W., Lehnert, H., and Klein, J. (2010). Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes Metab* **12**, 158-166.

Poloz, Y., and Stambolic, V. (2015). Obesity and cancer, a case for insulin signalling. *Cell Death Dis* **6**, e2037.

Quinn, K.A., Pye, V.J., Dai, Y.P., Chesterman, C.N., and Owensby, D.A. (1999). Characterization of the soluble form of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Exp Cell Res* **251**, 433-441.

Ramanathan, A., Nelson, A.R., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2015). Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci* **7**, 136.

Ravichandran, K.S. (2001). Signalling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* **20**, 6322-6330.

Reekmans, S.M., Pflanzner, T., Gordts, P.L., Isbert, S., Zimmermann, P., Annaert, W., Weggen, S., Roebroek, A.J., and Pietrzik, C.U. (2010). Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci* **67**, 135-145.

Roden, M., Stingl, H., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Hofer, A., Landau, B.R., Nowotny, P., Waldhausl, W., and Shulman, G.I. (2000). Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* **49**, 701-707.

Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R.E., and 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.

Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T., and Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* **15**, 659-667.

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* **4**, 177-197.

Schlein, C., Talukdar, S., Heine, M., Fischer, A.W., Krott, L.M., Nilsson, S.K., Brenner, M.B., Heeren, J., and Scheja, L. (2016). FGF21 Lowers Plasma Triglycerides by Accelerating Lipoprotein Catabolism in White and Brown Adipose Tissues. *Cell Metab* **23**, 441-453.

Schmitz-Peiffer, C., and Whitehead, J.P. (2003). IRS-1 regulation in health and disease. *Diabetes* 52, 367-374.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.

Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121, 96-105.

Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., *et al.* (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7, e49452.

Silvestri, C., and Di Marzo, V. (2013). The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab* 17, 475-490.

Sirtori, C.R., Pavanello, C., and Bertolini, S. (2014). Microsomal transfer protein (MTP) inhibition-a novel approach to the treatment of homozygous hypercholesterolemia. *Ann Med* 46, 464-474.

Tall, A.R., Krumholz, S., Olivecrona, T., and Deckelbaum, R.J. (1985). Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res* 26, 842-851.

Thonberg, H., Fredriksson, J.M., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2002). A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem J* 364, 73-79.

Tsukamoto, K., Tangirala, R., Chun, S.H., Pure, E., and Rader, D.J. (1999). Rapid regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of ApoE in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2162-2170.

Uhlik, M.T., Temple, B., Bencharit, S., Kimple, A.J., Siderovski, D.P., and Johnson, G.L. (2005). Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* 345, 1-20.

van der Vorst, E.P., Keijbeck, A.A., de Winther, M.P., and Donners, M.M. (2012). A disintegrin and metalloproteases: molecular scissors in angiogenesis, inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 224, 302-308.

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

von Eckardstein, A., Nofer, J.R., and Assmann, G. (2001). High density lipoproteins and atherosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 13-27.

Wang, B., Zhang, M., Ni, Y.H., Liu, F., Fan, H.Q., Fei, L., Pan, X.Q., Guo, M., Chen, R.H., and Guo, X.R. (2006). Identification and characterization of NYGGF4, a novel gene containing a phosphotyrosine-binding (PTB) domain that stimulates 3T3-L1 preadipocytes proliferation. *Gene* 379, 132-140.

- Wang, L.J., and Song, B.L. (2012). Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochim Biophys Acta* 1821, 964-972.
- Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K., and Scherer, P.E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 19, 1338-1344.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26, 19-39.
- Williams, K.J., Fless, G.M., Petrie, K.A., Snyder, M.L., Brocia, R.W., and Swenson, T.L. (1992). Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 267, 13284-13292.
- Willnow, T.E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J.R., Hammer, R.E., and Herz, J. (1996). RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J* 15, 2632-2639.
- Yenush, L., Makati, K.J., Smith-Hall, J., Ishibashi, O., Myers, M.G., Jr., and White, M.F. (1996). The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1. *J Biol Chem* 271, 24300-24306.
- Yoshimura, R., Araki, E., Ura, S., Todaka, M., Tsuruzoe, K., Furukawa, N., Motoshima, H., Yoshizato, K., Kaneko, K., Matsuda, K., *et al.* (1997). Impact of natural IRS-1 mutations on insulin signals - Mutations of IRS-1 in the PTB domain and near SH2 protein binding sites result in impaired function at different steps of IRS-1 signalling. *Diabetes* 46, 929-936.
- Yu, X.H., Fu, Y.C., Zhang, D.W., Yin, K., and Tang, C.K. (2013). Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 424, 245-252.
- Zeng, X.Q., Zhang, C.M., Tong, M.L., Chi, X., Li, X.L., Ji, C.B., Zhang, R., and Guo, X.R. (2012). Knockdown of NYGGF4 increases glucose transport in C2C12 mice skeletal myocytes by activation IRS-1/PI3K/AKT insulin pathway. *J Bioenerg Biomembr* 44, 351-355.
- Zhang, C.M., Chen, X.H., Wang, B., Liu, F., Chi, X., Tong, M.L., Ni, Y.H., Chen, R.H., and Guo, X.R. (2009). Over-expression of NYGGF4 inhibits glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via attenuated phosphorylation of IRS-1 and Akt. *Acta Pharmacol Sin* 30, 120-124.
- Zhou, Z., Subramanian, P., Sevilimis, G., Globke, B., Soehnlein, O., Karshovska, E., Megens, R., Heyll, K., Chun, J., Saulnier-Blache, J.S., *et al.* (2011). Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 13, 592-600.

## 8 DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei **Prof. Dr. Jörg Heeren** für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Dein kompetenter Rat und Dein Fachwissen haben mir oft geholfen. Für die Übernahme der Zweitbegutachtung möchte ich mich bei **Prof. Dr. Kathrin Dausmann** bedanken. Dank der wertvollen Unterstützung von Prof. Dr. Jörg Heeren und der finanziellen Hilfe des **GRK1459** hatte ich die Möglichkeiten einen internationalen Kongress zu besuchen und 3 Monate in San Diego zu verbringen. Dort hatte ich die Freude mit **Dr. Philip Gordts** zusammen zu arbeiten, bei dem ich mich hiermit ganz herzlich für die tolle Zeit bedanken möchte. **Dr. Kirstin Albers** danke ich für die Einarbeitung in das PID1 Projekt. Zudem danke ich ihr, **Alexander Fischer, Dr. Markus Heine** und **Sandra Ehret** für die Zusammenarbeit, die Durchführung der Experimente und die Analyse der Daten.

Mein besonderer Dank geht an die ehemaligen und aktuellen Mitdoktoranden und Mitarbeiter der **AG Heeren** und Eure Unterstützung auf sämtlichen Ebenen: Hilfe und hilfreiche Tipps bei Experimenten/ Labortätigkeiten/ Fragestellungen, wissenschaftliche Diskussionen, Beistand und Mitgefühl an guten und an schlechten Tagen (das geht vor allem an den **Schlauch**), Mitfiebern auf Kongressen, konstruktive Kritik, Aufmunterungen und vieles mehr!

Diese Arbeit wäre ohne die gute Zusammenarbeit mit Euch nicht umsetzbar gewesen.

Ein besonderer Dank geht an **meine Eltern**, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Zusammen mit **meinem Bruder, meinen Freunden** und **meinem Freund** standen sie mir immer einfühlsam und aufmunternd zur Seite. Dafür bin ich Euch allen unendlich dankbar!



## 9 ANHANG

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Neben den aufgelisteten Abkürzungen wurden die gebräuchlichen chemischen Formeln und SI Einheiten verwendet.

Ad	reife Adipozyten
2-AG	2-Arachidonylglycerol
ABCA1/ABCG1	<i>ATP-binding cassette Transporter</i>
AEA	<i>N-arachidonylethanolamine</i>
Apo	Apolipoproteine
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
bHLH-Zip	<i>helix loop helix leucine zipper</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BMI	<i>body mass index</i>
cAMP	zyklischen AMP
CB1/CB2	EC Rezeptoren
CCP	<i>clathrin coated pits</i>
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
ChREBPβ	Carbohydrate response element binding protein
CL	CL316,243
CM	Chylomikronen
CR	Chylomikronen <i>Remnant</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Dab	<i>Disabled</i>
Dexa	Dexamethason
DIO	<i>diet-induced obesity</i>
Dio2	Deiodinase2
DNL	<i>de novo lipogenesis</i>
EC	Endocannabinoid
ECM	extrazelluläre Matrix
EE	<i>early endosome</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Elovl3	<i>fatty acid elongase 3</i>
Elovl6	<i>fatty acid elongase 6</i>

ER	Endoplasmatischen Retikulum
et al.	et alii (lateinisch: und andere)
Fasn	Fettsäure Synthase
FFA	<i>free fatty acids</i> , freie Fettsäuren
FH	familiäre Hypercholesterinämie
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GAP	<i>Rab GTPase-activating protein</i>
Glut	Glukose Transporter
GVS	<i>Glut4 storage vesicles</i>
HDL	<i>High Density</i> Lipoprotein
HL	hepatische Lipase
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
HSL	<i>hormone sensitive lipase</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IDL	<i>Intermediate Density</i> Lipoprotein
IF	Immunfluoreszenz
IL10	Interleukin 10
INSIG	<i>insulin induced gene</i>
IR	Insulin Rezeptor
IRAP	<i>insulin-responsive aminopeptidase</i>
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
IVM	intravital Mikroskopie
ko	<i>knockout</i>
LE	<i>late endosome</i>
LDL	<i>Low Density</i> Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP1	<i>LDL-receptor related protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated-protein kinase</i>
MCP1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MEGF7	<i>multiple epidermal growth factor-like domains 7</i>
min	Minute
MTP	<i>microsomal transfer protein</i>
NEFA	unveresterten Fettsäuren
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NPC1/2	Niemann Pick Transporter
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>
NPxY	Asparagin-Prolin-x-Tyrosin
OGTT	Oraler Glukose Toleranz Test
OFTT	Oraler Fett Toleranz Test
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>plated-derived growth factor</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide kinase</i>
PET	<i>positron emission tomography</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pgc1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator-1<math>\alpha</math></i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PID1	<i>phosphotyrosine interacting domain containing 1</i>
PKA	Proteinkinase A
PLTP	<i>phospholipid transfer protein</i>
Ppara $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\alpha</math></i>
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding</i>
Ra	Rheumatoide Arthritis
Rab	<i>receptor-associated protein</i>
RCT	reversen Cholesterin Transport
RT	Raumtemperatur
RTK-	Rezeptor Tyrosin Kinase
S1P/S2P	<i>site-1/2-protease</i>
SCAP	<i>SREBP-cleaving-activating protein</i>
Scd1	Stearoyl-CoA desaturase
SE	<i>sorting endosome</i>
SGLT-1	<i>sodium-glucose cotransporter-1</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SLE	systemische <i>Lupus erythematoses</i>
SNX	<i>sortin nexin</i>
SR-A, SRB1	scavenger Rezeptor-A/B1
SRE	<i>sterol response element</i>
SREBP	<i>sterol regulation element binding protein</i>
Std.	Stunde
SVF	<i>stromal vascular fraction</i>
Tbp	<i>TATA-box binding protein</i>

T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
T2D	Typ 2 Diabetes
TGN	Transgolgi- <i>network</i>
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TRL	Triglyzerid-reichen Lipoproteine
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLDL	<i>Very Low-Density</i> Lipoprotein
WAT	<i>white adipose tissue</i>
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
WTD	<i>Western Type</i> Diät
Ucp-1	<i>uncoupling protein 1</i>
YWTD	Tyrosin-Tryptophan-Threonin-Asparaginsäure
YxxL	Tyrosin-x-x-Leucin
x	beliebige Aminosäure

## 9.2 Gefahrenstoffe

**Tabelle 9.2: Liste der Gefahrenstoffe nach GHS**

Gefahrenstoff	H-Sätze	P-Sätze	GHS-Hinweis
Borsäure	360FD	201, 308+313	GHS 06 (T)
Chloroform	302, 315, 319, 331, 351, 361D, 372	261, 280.1-4, 6, 7, 361, 309+310, 403+233	GHS 06 (T) GHS 08 (Xn)
EDTA	319	305+351+338	GHS07 (Xi)
Essigsäure	226, 314	280, 301+330+331, 307+310, 305+351+338	GHS05 (C)
Ethanol	225	210	GHS02 (F)
Kaliumbromid	315, 319, 335	261, 305+351+338	GHS07 (Xi)
Ketamin	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338	GHS 08 (Xn)
Methanol	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352	GHS02 (F) GHS 06 (T)
Paraformaldehyd	228, 302, 315, 317, 319, 332, 335, 351	281,302+352, 305+351+338, 308+313, 304+340	GHS05 (C) GHS 06 (T) GHS 08 (Xn)
Pikrinsäure	201, 301,311, 331	210, 280, 301+310, 312	GHS 06 (T)
Proteinase K	315, 319, 334, 335	261, 305+351+338, 342+311	GHS 08 (Xn)
Rompun	301	301+310	GHS 06 (T)
SDS	228, 302, 332, 315, 318, 335, 412	210, 261, 273, 280, 305+351+338	GHS02 (F) GHS 08 (Xn)
TCA	314, 410	273, 280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310	GHS05 (C) GHS09 (N)
TRIzol	302, 312, 314, 332, 335, 341, 373, 412	301 + 310, 261, 280, 304+340, 303+361+353, 305+351	GHS05 (C) GHS07 (Xi) GHS07 (Xi)
Wasserstoffperoxid	271, 332, 302, 314	220, 261, 280, 305+351+338, 310	GHS05 (C) GHS03 (O)

<b>Gefahrensymbole</b>	
C	ätzend
F	leichtentzündlich
N	umweltgefährlich
O	brandfördernd
T	giftig
Xn	gesundheitsschädlich
Xi	reizend

<b>H-Sätze</b>	
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen
H351	Kann vermutlich Krebs verursachen
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H361D	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H370	Schädigt die Organe
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition
H373	Kann die Organe schädigen
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

<b>P-Sätze</b>	
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P220	Von Kleidung/ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P301	Bei Verschlucken:
P302	Bei Berührung mit der Haut:
P303	Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
P304	Bei Einatmen:
P305	Bei Kontakt mit den Augen:
P308	Bei Exposition oder falls betroffen:
P309	Bei Exposition oder Unwohlsein:
P310	Sofort Giftinformationszentrum, oder Arzt anrufen.
P311	Giftinformationszentrum, oder Arzt anrufen.
P313	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P330	Mund ausspülen.
P331	Kein Erbrechen herbeiführen.
P338	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P340	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P342	Bei Symptomen der Atemwege:
P351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352	Mit viel Wasser und Seife waschen.
P353	Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
P361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

**9.3 Publikation: „*Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation*“**



# Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation

Lucia M. Krott,<sup>1,\*</sup> Fabiana Piscitelli,<sup>1,†</sup> Markus Heine,\* Simona Borrino,<sup>†</sup> Ludger Scheja,\*  
Cristoforo Silvestri,<sup>†</sup> Joerg Heeren,<sup>2,\*</sup> and Vincenzo Di Marzo<sup>2,†</sup>

Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology,\* University Medical Center Hamburg Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; and Endocannabinoid Research Group,<sup>†</sup> Institute of Biomolecular Chemistry, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 80078 Pozzuoli, Naples, Italy

**Abstract** The endocannabinoids and their main receptor, cannabinoid type-1 (CB1), suppress intracellular cyclic AMP levels and have emerged as key players in the control of energy metabolism. CB1 agonists and blockers have been reported to influence the thermogenic function of white and brown adipose tissue (WAT and BAT), affecting body weight through the inhibition and stimulation of energy expenditure, respectively. The purpose of the current study was to investigate the regulation of the endocannabinoid system in WAT and BAT following exposure to either cold or specific agonism of  $\beta$ 3-adrenoceptors using CL316,243 (CL), conditions known to cause BAT activation and WAT browning. To address this question, we performed quantitative PCR-based mRNA profiling of genes important for endocannabinoid synthesis, degradation, and signaling, and determined endocannabinoid levels by LC-MS in WAT and BAT of control, cold-exposed, and CL-treated wild-type mice as well as primary brown adipocytes. Treatment with CL and exposure to cold caused an upregulation of endocannabinoid levels and biosynthetic enzymes in WAT. Acute  $\beta$ 3-adrenoceptor activation increased endocannabinoids and a subset of genes of biosynthesis in BAT and primary brown adipocytes. We suggest that the cold-mediated increase in endocannabinoid tone is part of autocrine negative feed-back mechanisms controlling  $\beta$ 3-adrenoceptor-induced BAT activation and WAT browning.—Krott, L. M., F. Piscitelli, M. Heine, S. Borrino, L. Scheja, C. Silvestri, J. Heeren, and V. Di Marzo. Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation. *J. Lipid Res.* 2016. 57: 464–473.

**Supplementary key words** cannabinoids • protein kinases/protein kinase A • gene expression • phospholipids

The recent discovery of active brown adipose tissue (BAT) in adult humans (1–3) is one of the most intriguing findings, as it raises hope for the treatment of obesity and

related chronic metabolic diseases. The natural function of BAT is to combust energy from high-caloric nutrients to defend the body against cold environments (4). The ability to burn energy-dense triglycerides as fuels for heat production could enable BAT to diminish hypertrophic white adipose tissue (WAT) depots, a prerequisite for the prevention of metabolic lifestyle diseases (5, 6). In humans, BAT activity, determined by positron emission tomography-computed tomography (PET-CT), is positively correlated with BAT mass (1–3), BAT activation status (2), and environmental factors such as low temperatures (7). Repeated cold exposure leads to increased BAT activity (8, 9), a condition that is associated with a self-reported decrease in sensitivity to cold. The thermogenic process is dependent on the presence of uncoupling protein 1 (UCP1), a protein located in the inner membrane of mitochondria that is able to separate electron transport in the respiratory chain from the production of energy in the form of ATP. The heat generated by this exothermic reaction is transported via the blood circulation system to maintain body temperature (10). Low BAT activity in humans correlates with ageing and obesity (2, 11), suggesting a causal link between decreased BAT activity, weight gain, and the development of metabolic diseases. In this context, channeling fatty acids and triglycerides into BAT could attenuate deleterious effects that saturated fatty acids cause by ectopic lipid accumulation in the liver or heart. In fact, up to 90% of energy for heat production is derived from fatty acids that are delivered by triglyceride-rich lipoproteins (4, 10, 12). These latter are hepatic VLDLs

Abbreviations: *Abhd4*,  $\alpha/\beta$  domain containing-4; AEA, *N*-arachidonylethanolamine (anandamide); 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; BAT, brown adipose tissue; CB1, cannabinoid type-1; CB2, cannabinoid type-2; CL, CL316,243; *Dagla*, diacylglycerol lipase- $\alpha$ ; *Faah*, fatty acid amide hydrolase; *Gde1*, glycerophosphodiester phosphodiesterase-1; *Mgl1*, monoglyceride lipase; NAE, *N*-acylethanolamine; *Napepld*, *N*-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D; OEA, *N*-oleylethanolamine; PEA, *N*-palmitoylethanolamine; SNS, sympathetic nervous system; UCP1, uncoupling protein 1; WAT, white adipose tissue.

<sup>1</sup>L. M. Krott and F. Piscitelli contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: heeren@uke.uni-hamburg.de (J.H.); vdimarzo@icb.na.cnr.it (V.D.M.)

This work was supported by the Graduiertenkolleg der Deutschen Forschungsgemeinschaft 1459 (L.M.K.) and by a grant from the Fondation Leducq-Triglyceride Metabolism in Obesity and Cardiovascular Disease (12CVD04) (J.H.).

Manuscript received 13 November 2015 and in revised form 12 January 2016.

Published, JLR Papers in Press, January 14, 2016  
DOI 10.1194/jlr.M065227

Copyright © 2016 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

and intestinal chylomicrons that are both processed by endothelium-bound lipoprotein lipase to allocate fatty acids to BAT and energy storing WAT, respectively.

In response to cold exposure, both brown and white adipocytes are activated via sympathetic neurons that release noradrenalin (10). Catecholamine release causes the activation of  $\beta_3$ -adrenoceptor signaling stimulating lipolysis of triglycerides stored in lipid droplets, a process mediated by the enzymatic activity of adipose tissue triglyceride lipase (ATGL) and hormone sensitive lipase (HSL) (13). In brown adipocytes, fatty acids are transferred to mitochondria for  $\beta$ -oxidation and UCP1-dependent heat production. In white adipocytes, lipid droplet-derived fatty acids are released into the circulation for hepatic VLDL production to maintain energy supply for cold-activated brown adipocytes. Thus, short term activation of  $\beta_3$ -adrenoceptors stimulates intracellular lipolysis orchestrating the systemic energy homeostasis. It is not surprising that both WAT and BAT undergo adaptive and dynamic changes in response to sustained  $\beta_3$ -adrenoceptor activation or cold exposure. In this context one of the most intensively studied cell types implicated in cold-induced tissue remodeling in WAT (browning) is the so-called beige adipocyte (14). Prolonged cold exposure or pharmacological treatment using  $\beta_3$ -adrenoceptor agonists, such as CL316,243 (CL), stimulate the development of these inducible brown-like adipocytes (14–17). Brown and beige adipocytes are characterized by a large number of mitochondria and numerous small lipid droplets and both cell types are functionally active with regard to adaptive thermogenesis (18).

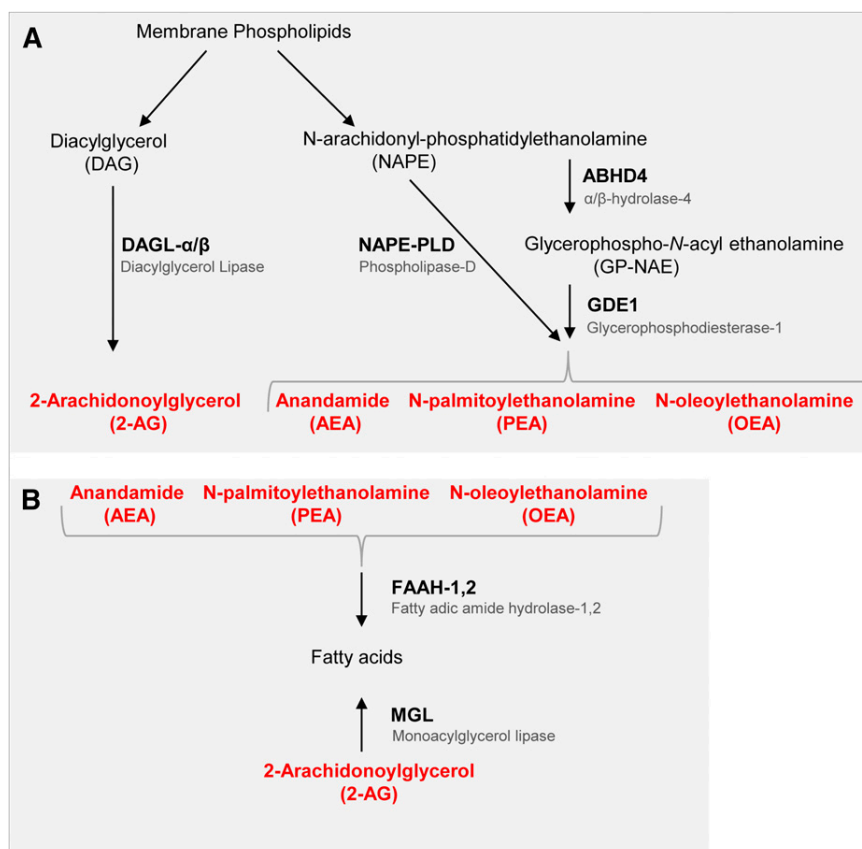
The endocannabinoid system and, in particular, the G protein-coupled receptor known as cannabinoid type-1 (CB1) and its endogenous agonists, *N*-arachidonylethanolamine (AEA, anandamide) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), have emerged as major players in the control of metabolism at both the central and peripheral level (19). Importantly, malfunctioning of this system due to enhanced tissue levels of endocannabinoids and subsequent overactivation of CB1 receptors in the hypothalamus, visceral WAT, liver, muscle, and pancreas, accompanies, and is probably one of the causes of, fat accumulation and insulin resistance in animal models of obesity. High plasmatic levels of endocannabinoids have been associated with increased cardiometabolic risk, visceral WAT accumulation, and type 2 diabetes in obese patients (19). Genetic impairment of CB1 receptors selectively in neurons of the brain and sympathetic nervous system (SNS) enhances energy expenditure by the BAT (20), and very recent evidence suggests an inhibitory role of prejunctional CB1 on brown adipocyte glucose utilization (21), thermogenesis, and lipid droplet formation (22). Furthermore, CB1 blockade in *Sim1*-expressing neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus enhances energy expenditure during high-fat diet feeding (23). While mice overexpressing neuropeptide Y on noradrenergic neurons of the brain and SNS exhibit age-dependent elevation of endocannabinoid levels in many target organs, including the WAT (24), genetic knockout

of CB1 in *Sim1*-expressing neurons is accompanied by increased mRNA expression of the  $\beta_3$ -adrenoceptor and UCP1 in the BAT of high-fat diet-fed mice (23). These data point to a strong and SNS-mediated association between the endocannabinoid system and the control of BAT and WAT function. While there are several examples of reports [summarized in (19)] pointing to an autocrine role of endocannabinoids and CB1 receptors on white adipocytes, also facilitating, among others, their transformation into beige adipocytes (25, 26), evidence for a similar role in brown adipocytes is still scant. Through the use of a peripherally restricted CB1 antagonist *in vivo*, and of T37i brown adipocyte-like cells *in vitro*, Boon et al. (22) very recently suggested that some of the above effects of CB1 blockade in the BAT, and in particular the stimulation of uncoupled respiration, may be exerted postjunctionally and directly on brown adipocytes, most likely by enhancing cyclic AMP/PKA signaling induced by  $\beta_3$ -adrenoceptor activation. However, the question of whether exposure to cold, via sympathetic stimulation of  $\beta_3$ -adrenoceptors in brown adipocytes, enhances endocannabinoid levels in BAT has not been tested so far. In the present study, we addressed this hypothesis by examining the effect of cold exposure and pharmacological  $\beta_3$ -adrenoceptor activation in mice using the selective agonist, CL, on: *a*) the levels of AEA, 2-AG, and nonendocannabinoid *N*-acylethanolamines (NAEs); and *b*) mRNA expression levels of genes encoding for CB1 receptors and endocannabinoid metabolic enzymes (Fig. 1). In order to analyze the effects on BAT activity, as well as browning of subcutaneous WAT, these studies were conducted under conditions of acute and chronic cold and  $\beta_3$ -adrenergic stimulation.

## METHODS

### Experimental animals and diets

All animal experiments were approved by the Animal Welfare Officers of University Medical Center Hamburg-Eppendorf and Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg. Mice were bred and housed in the animal facility of University Medical Center Hamburg-Eppendorf at 22–24°C with a day and night cycle of 12 h. Male age-matched (12–14 weeks) C57BL/6J wild-type mice, housed in single cages and fed a standard chow diet (Lasvendi) with ad libitum access to food and water, were used for the experiments. Cold exposure was performed by housing the mice at 6°C for 1 day or 7 days. The  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist, CL (0.2 mg CL/ml in 0.9% NaCl (w/v); Tocris) was administered by subcutaneous injection (1  $\mu$ g per gram body weight per day) either for: *a*) 7 days without treatment on the day of necropsy (chronic CL); *b*) only once, 4 h before necropsy (acute CL); or *c*) chronically for 7 days with an additional injection on day 8 before necropsy (chronic+acute CL). Mock-treated control mice and acute CL mice received corresponding 0.9% NaCl (w/v) injections throughout the treatment period. All tissue and blood collections were performed after 4 h fasting. Mice were anesthetized with a lethal dose (15  $\mu$ l per gram mouse body weight) of a mix containing ketamine (25 mg/ml)/xylazine (0.2%) in 0.9% NaCl. Blood was withdrawn transcardially and animals were perfused with 5 ml ice-cold PBS containing 10 U/ml



**Fig. 1.** Schematic diagram of enzymes involved in endocannabinoid synthesis and degradation. A: From membrane phospholipids, 2-AG is produced via DAGL $\alpha/\beta$ , while AEA, PEA, and OEA synthesis is enabled either directly via NAPE-PLD or by ABHD4 and GDE1. B: The 2-AG is degraded via MGL, whereas AEA, PEA, and OEA are hydrolyzed by FAAH.

heparin. Organs were harvested, immediately frozen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For RNA analysis samples were conserved in TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen).

### Gene expression analysis

Total RNA was isolated from inguinal subcutaneous WAT and subscapular BAT using NucleoSpin RNA II kit (Macherey and Nagel). Synthesis of cDNA was performed using SuperScript<sup>®</sup> III reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative real-time PCR reactions for indicated genes were conducted on a 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) using TaqMan Assay-on-Demand primer sets [*Ucp1*, Mm00494069\_m1; *Ppargc1a*, Mm00447183\_m1; *Dio2*, Mm00515664\_m1; *Elovl3*, Mm00468164\_m1; *Cnr1*, Mm01212171\_s1; *Cnr2*, Mm02620087\_s1;  $\alpha/\beta$  domain containing-4 (*Abhd4*), Mm00506368\_m1; glycerophosphodiester phosphodiesterase-1 (*Gde1*), Mm00450997\_m1; *N*-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (*Napepld*), Mm00724596\_m1; fatty acid amide hydrolase (*Faah*), Mm00515684\_m1; diacylglycerol lipase- $\alpha$  (*Dagla*), Mm00813830\_m1; *Daglb*, Mm00523381\_m1; monoglyceride lipase (*Mgl*), Mm00449274\_m1] supplied by Applied Biosystems and selected to recognize RefSeq sequences and a maximum of GenBank expressed sequence tags. Gene of interest cycle thresholds (Cts) were normalized to TATA-box binding protein (*Tbp*, Mm00446973\_m1) house keeper levels by the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method and displayed as normalized copy numbers relative to experimental control groups (fold).

### Extraction, purification, and quantitative analysis of endocannabinoids from adipose tissue

Lipids were extracted from inguinal subcutaneous WAT and interscapular BAT of mice, and endocannabinoid purified from lipid extracts, as previously described (27). Measurement of endocannabinoids (AEA and 2-AG), as well as of nonendocannabinoid NAEs, *N*-palmitoylethanolamine (PEA), and *N*-oleoylethanolamine (OEA), was carried out by isotope dilution LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS using deuterated standards, as previously described (27).

### Culture of primary brown adipocytes

For the preparation of primary brown adipocytes, 9-week-old C57BL6/J mice were anesthetized, interscapular BAT was removed and digested in isolation buffer [123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 100 mM HEPES (pH 7.4)] containing collagenase II (Biochrom). The stromavascular fraction was isolated by filtration of the cell suspension through 100  $\mu\text{m}$  and 40  $\mu\text{m}$  nylon mesh and plated out. The cells (including preadipocytes) were cultured for 10 days and differentiated through addition of 20 nM insulin (Sigma), 1 nM tri-iodothyronine-sodium (Sigma), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma), 1  $\mu\text{M}$  dexamethasone (Sigma). The resulting primary brown adipocytes were treated with and without 1  $\mu\text{M}$  of CL in DMEM containing 0.1% fatty acid-free BSA (GE Healthcare) for 4 h. Supernatants were harvested and nonesterified fatty acids were determined using standard colorimetric assays (Wako). RNA

analysis of brown adipocytes was performed as described for the tissue samples.

## RESULTS

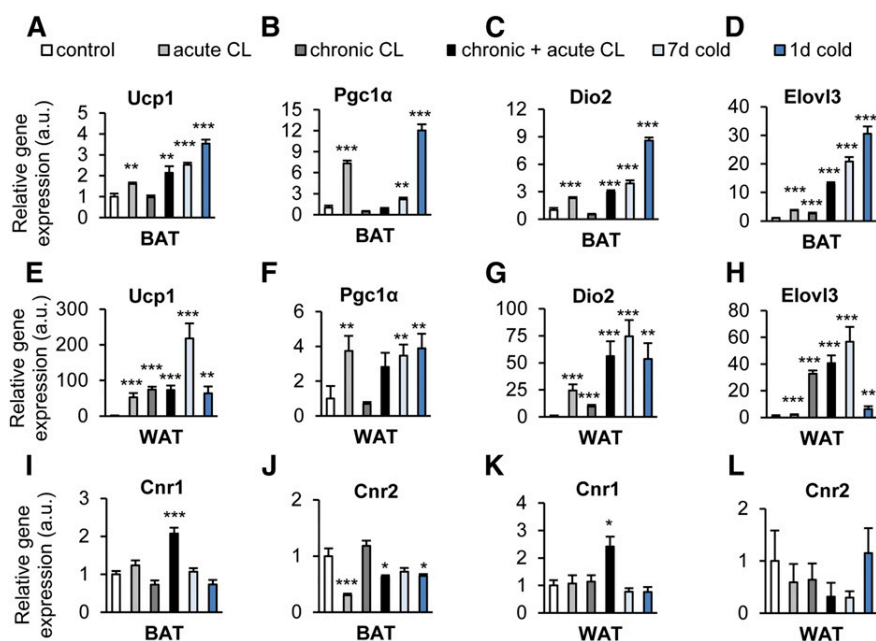
### Effect of cold and $\beta$ 3-adrenoceptor activation on the expression of thermogenesis markers and endocannabinoid receptors in BAT and WAT

In order to study the endocannabinoid system in cold-activated BAT and WAT, and to differentiate short-term from long-term effects, the following treatments were chosen: cold exposure was applied to mice for either 1 day or for 7 days. To another set of mice, the  $\beta$ 3-adrenergic agonist, CL, was administered either once, 4 h before necropsy (acute CL) for seven consecutive days and also on day 8 before necropsy (chronic+acute CL) or for 7 days, but not before necropsy (chronic CL).

Stimulation of  $\beta$ 3-adrenoceptors with CL and exposure to cold are known to markedly enhance the expression of characteristic markers of uncoupled respiration and thermogenesis via specific transcription factors in WAT and BAT (14, 15), revealing different degrees of WAT browning and BAT activation, respectively (Fig. 2). In both tissues, activation of the respective signaling pathways induced mRNA levels of *Ucp1* (Fig. 2A, E), which encodes the heat generating protein, UCP1, that is located in the

inner mitochondrial membrane of thermogenic adipocytes. In comparison to its expression in BAT, the basal *Ucp1* mRNA levels are much lower in WAT, leading to a much higher relative induction of *Ucp1* mRNA after CL treatment or cold exposure (10). The increased expression of the PPAR coactivator 1 $\alpha$  (*Ppargc1a*, Fig. 2B, F) indicates an upregulation of genes important for brown and beige adipocyte differentiation and their functional maintenance (28). The respective transcriptional networks also rely on enhanced activation of thyroid hormone receptors that is mediated by the induction of type II iodothyronine deiodinase (*Dio2*; Fig. 2C, G) mRNA (29), which encodes an enzyme converting inactive tetra-iodothyronine to active tri-iodothyronine. In addition, we observed a profound induction of *Elovl3* (Fig. 2D, H), a fatty acid elongase specifically expressed in brown adipocytes during increased fatty acid oxidation (30).

In both tissues, chronic+acute CL treatment, but not any of the other treatments, significantly stimulated the expression of *Cnr1*, the gene encoding for the CB1 endocannabinoid receptor (Fig. 2I, K). Finally, in BAT, but not in WAT, acute CL, as well as acute+chronic CL treatment, and 1 day exposure to cold, reduced the expression of *Cnr2*, the cannabinoid type-2 (CB2) receptor (Fig. 2J, L), which was, however, based on total copy numbers less expressed than CB1 in both adipose tissues (data not shown).



**Fig. 2.** Treatment with the  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist, CL, and cold exposure activate thermogenesis in BAT, induce browning in WAT, and alter endocannabinoid receptor expression in both adipose tissues. In order to activate BAT and/or browning of WAT, C57BL6/J wild-type mice housed at ambient temperature (22–24°C) received a single injection of CL (acute CL), 7 days of CL treatment (chronic CL), or the combination of both (chronic+acute CL), as described in the Methods. To stimulate BAT and/or WAT browning by cold, C57BL6/J wild-type mice were housed for 1 day (1d cold) or 7 days (7d cold) at 6°C. Expression of brown adipocyte activation marker genes relative to mock-injected controls was determined in BAT (A–D) and in subcutaneous WAT (E–H). I–L: Relative expression of endocannabinoid receptors *Cnr1* and *Cnr2* in BAT and WAT. Values are mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, Student's  $t$ -test.

### The endocannabinoid system is induced in BAT by acute $\beta$ 3-adrenergic stimulation

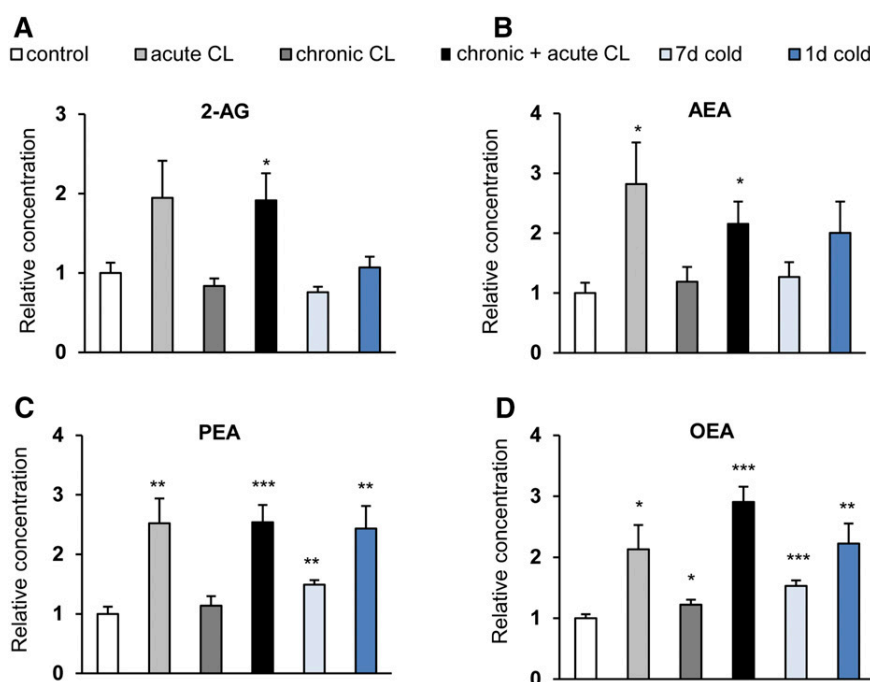
Both acute and chronic+acute CL treatment of the mice, but not chronic CL treatment per se, elevated the levels of the endocannabinoids, 2-AG and AEA, in BAT. The effect was statistically significant for AEA in both cases, however, for 2-AG only with chronic+acute CL treatment. Cold exposure did not cause the same effect, although a trend was observed for AEA with a 1 day exposure (Fig. 3A, B). Interestingly, acute and chronic+acute CL administration, as well as short-term cold exposure, caused a strong and significant elevation in the levels of the AEA congeners, PEA and OEA, which was also present after 1 day and 7 day cold exposure (Fig. 3C, D, Table 1). Thus, short-term  $\beta$ 3-adrenergic stimulation leads to increased levels of both CB1 agonists and nonendocannabinoid NAEs in BAT.

The mRNA expression of the 2-AG biosynthetic enzyme, *Dagla*, was significantly elevated by acute and chronic+acute CL, corresponding to the 2-AG concentrations observed in BAT (Fig. 4A). In contrast, the isoform, *Daglb*, was downregulated by short-term cold exposure, whereas no effect was observed with any of the treatments on the expression of the gene encoding for the 2-AG degrading enzyme, *Mgll* (Fig. 4A–C). Surprisingly, the mRNA levels of the NAE biosynthetic enzymes, *Abhd4*, *Gde1*, *Napepld*, and the degrading enzyme, *Faah*, did not mirror the AEA levels. Instead, they were all reduced by acute CL, whereas cold exposure elevated the mRNA levels of *Abhd4* and *Gde1* (Fig. 4D–G).

### WAT $\beta$ 3-adrenergic stimulation and browning are accompanied by upregulation of the endocannabinoid system

Next, we asked whether  $\beta$ 3-adrenergic stimulation or cold exposure has an effect on endocannabinoids in WAT. The 2-AG levels were significantly elevated after chronic, but not acute, CL treatment and, to a smaller extent, after prolonged cold exposure (Fig. 5A, Table 1). AEA concentrations in WAT were significantly enhanced by all treatments, the strongest effects being observed with prolonged cold exposure and chronic+acute CL treatment (Fig. 5B). As observed in BAT, the levels of OEA and PEA were enhanced by the treatments in a manner very similar to AEA, although the effect of chronic CL did not reach statistical significance for PEA (Fig. 5C, D).

All treatments, except for acute cold exposure, produced a statistically significant upregulation of *Dagla* (Fig. 6A), whereas these treatments (including acute cold exposure) produced an opposite downregulatory effect on *Daglb* (Fig. 6B). All chronic treatments enhanced the mRNA levels of *Mgll* (Fig. 6C). The mRNAs for NAE biosynthetic enzymes appeared to be regulated by the treatments in a similar manner, with chronic CL and, hence, chronic+acute CL producing statistically significant upregulation of *Abhd4*, *Gde1*, and *Napepld*, and long-term cold exposure causing significant upregulation only of *Abhd4* and *Gde1* (Fig. 6D–F). *Faah* expression was not altered by any treatment (Fig. 6G). Maximum induction of *Mgll*, *Abhd4*, and *Gde1* required chronic CL or cold stimulation, suggesting that beige, rather than white, adipocytes regulate the



**Fig. 3.** Acute  $\beta$ 3-adrenergic stimulation increases endocannabinoid levels in BAT. Mice were treated as described in the legend of Fig. 2. The concentrations of 2-AG (A), AEA (B), PEA (C), and OEA (D) were measured in BAT. Data are calculated as picomoles per milligram wet weight and presented relative to mock-injected controls. Values are mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, Student's  $t$ -test.

TABLE 1. Absolute values for endocannabinoids in WAT and BAT

	AEA (pmol/mg)	2-AG (pmol/mg)	PEA (pmol/mg)	OEA (pmol/mg)
<b>BAT</b>				
Control	0.25 ± 0.04	0.93 ± 0.12	1.31 ± 0.16	1.95 ± 0.12
Acute CL	0.70 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.80 ± 0.43	3.31 ± 0.55 <sup>a</sup>	4.16 ± 0.78 <sup>a</sup>
Chronic CL	0.30 ± 0.06	0.78 ± 0.09	1.49 ± 0.21	2.39 ± 0.15 <sup>a</sup>
Chronic and acute CL	0.54 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.33 ± 0.38 <sup>c</sup>	5.68 ± 0.49 <sup>c</sup>
1 day cold	0.50 ± 0.13	0.99 ± 0.06	3.19 ± 0.50 <sup>b</sup>	4.35 ± 0.64 <sup>b</sup>
7 day cold	0.32 ± 0.06	0.70 ± 0.13	1.96 ± 0.10 <sup>b</sup>	2.99 ± 0.17 <sup>c</sup>
<b>WAT</b>				
Control	0.03 ± 0.003	0.30 ± 0.04	0.75 ± 0.10	0.67 ± 0.11
Acute CL	0.06 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.06	1.08 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.13 <sup>a</sup>
Chronic CL	0.09 ± 0.010 <sup>c</sup>	0.85 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.12 ± 0.13	1.37 ± 0.08 <sup>c</sup>
Chronic and acute CL	0.11 ± 0.0013 <sup>c</sup>	0.94 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.99 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.23 <sup>c</sup>
1 day cold	0.10 ± 0.0015 <sup>c</sup>	0.40 ± 0.04	1.61 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.60 ± 0.08 <sup>c</sup>
7 day cold	0.13 ± 0.0015 <sup>c</sup>	0.52 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.62 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.29 <sup>b</sup>

Mice were treated as described in the legend of Fig. 2. The concentrations of 2-AG, AEA, PEA, and OEA were measured in BAT and WAT. Data are calculated as picomoles per milligram wet weight. Values are mean ± SEM.

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , Student's *t*-test.

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , Student's *t*-test.

<sup>c</sup> $P < 0.001$ , Student's *t*-test.

endocannabinoid system in brownish WAT. Taken together, in WAT, both endocannabinoids were increased by  $\beta$ 3-adrenergic and cold stimulation, and this was linked to an upregulation of biosynthetic enzymes of both 2-AG and NAEs.

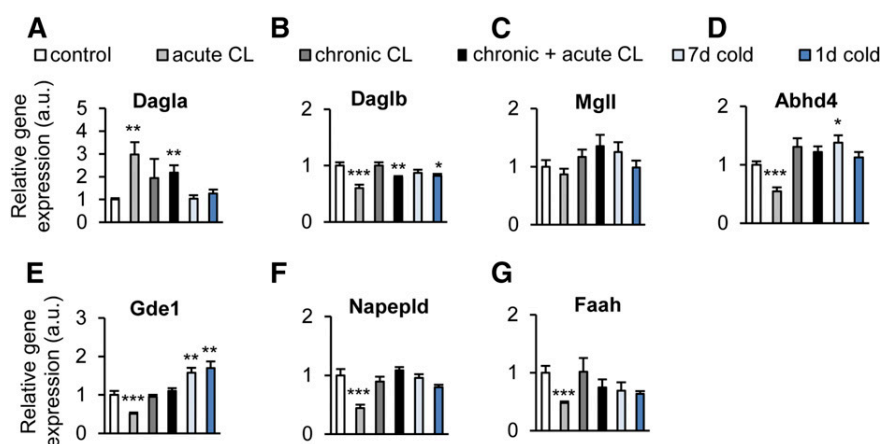
#### Acute $\beta$ 3-adrenoceptor activation induces the expression of *Cnr1* and endocannabinoid metabolic enzymes in primary brown adipocytes

Next, we asked whether the acute regulation of *Cnr1* and endocannabinoid synthetic enzymes observed in BAT could be reproduced in brown adipocytes in vitro. Acute CL stimulation of primary brown adipocytes caused elevated lipolysis and thermogenic activation, as shown by upregulation of free fatty acids in the supernatant and *Ucp1* mRNA (Fig. 7A, B). Furthermore, it led to strong and statistically significant mRNA upregulation of *Cnr1*, as well as of *Faah*, *Dagla*, and *Daglb*, with no effect on *Mgll* (Fig. 7C–G). *Abhd4*, *Gde1*, and *Napepld* were significantly

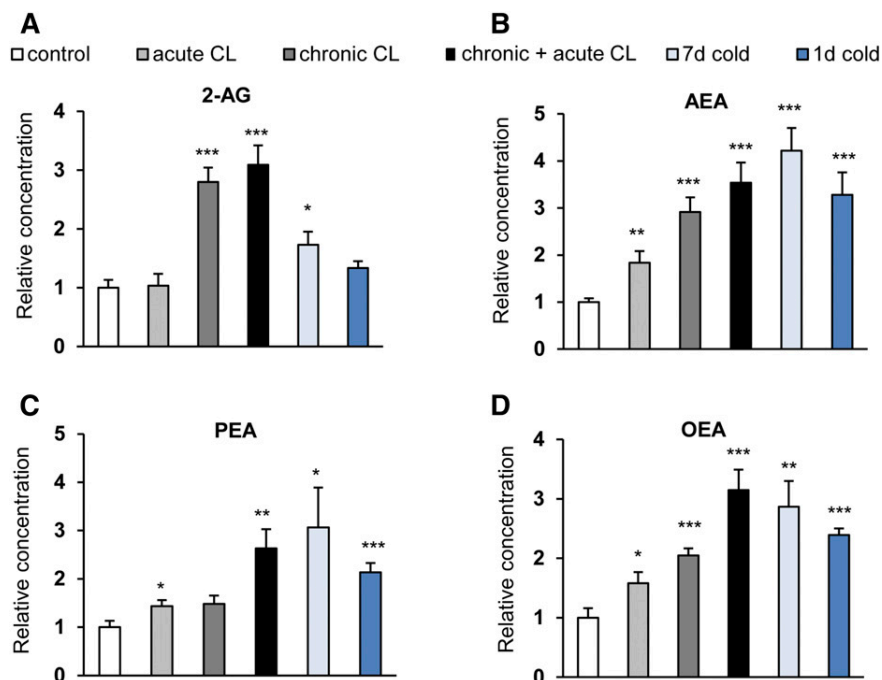
downregulated. These data show that most (*Cnr1*, *Dagla*, *Mgll*, *Abhd4*, *Gde1*, and *Napepld*), but not all (the exceptions being *Daglb* and *Faah*), gene expression effects observed in activated BAT in vivo could be mimicked in brown adipocytes by acute CL treatment.

#### DISCUSSION

In the present study, we have shown for the first time that activation of BAT and browning of WAT in mice cause upregulation of endocannabinoid levels and, presumably, endocannabinoid signaling via CB1 receptors in these tissues. Given that CB1 receptor stimulation leads to a decrease of cyclic AMP signaling, we hypothesize that the upregulation of endocannabinoids by thermogenic stimuli reported here constitutes a local autocrine negative feedback control by endocannabinoids over  $\beta$ 3-adrenoceptor-induced BAT activation and WAT browning, which could



**Fig. 4.** Cold exposure and  $\beta$ 3-adrenergic stimulation alter endocannabinoid system gene expression in BAT. C57BL/6/J wild-type mice were treated as described in the legend of Fig. 2. A–C: Relative expression of 2-AG synthesis (*Dagla*/ $\beta$ ) and degradation (*Mgll*) genes in BAT. D–G: Relative expression of AEA synthesis (*Abhd4*, *Gde1*, *Napepld*) and degradation (*Faah*) genes in BAT. Values are mean ± SEM; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t*-test.

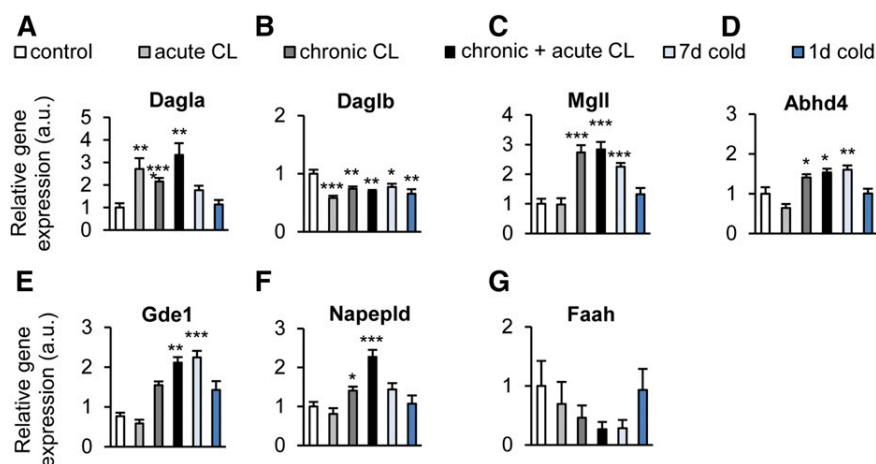


**Fig. 5.** Cold exposure and  $\beta$ 3-adrenergic stimulation increase endocannabinoid levels in WAT. C57BL6/J wild-type mice were treated as described in the legend of Fig. 2. The concentrations of 2-AG (A), AEA (B), PEA (C), and OEA (D) were measured in WAT. Data are calculated as picomoles per milligram wet weight and presented relative to mock-injected controls. Values are mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, Student's  $t$ -test.

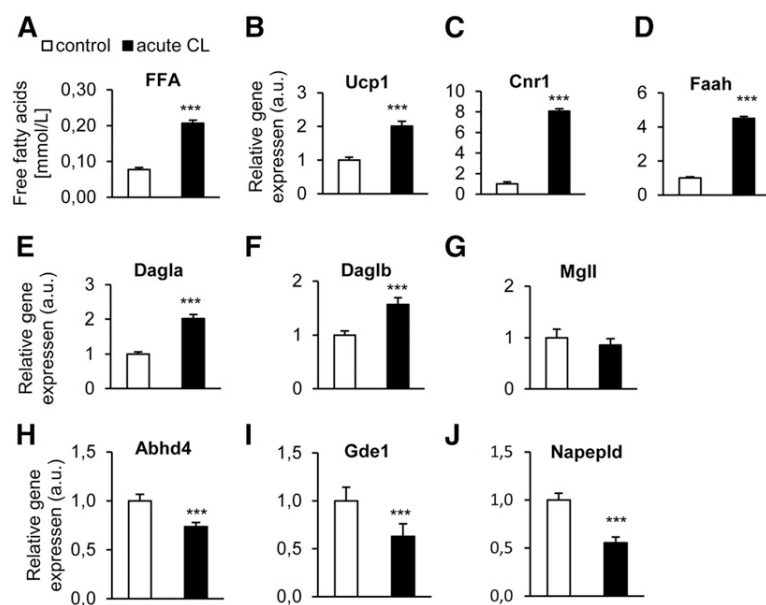
account, in part, for the previously demonstrated enhancement of thermogenesis and energy expenditure by CB1 receptor inverse agonists, both in animal models of obesity (21, 22) and in obese humans (31).

In the BAT, cold was ineffective at elevating endocannabinoid signaling in a statistically significant manner, and treatment of mice with CL had to be acute in order to achieve a statistically significant elevation of 2-AG and/or AEA (Fig. 3), and it had to be chronic to observe enhancement

of *Cnr1* expression (Fig. 2). It is possible that chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation under cold exposure leads to the desensitization of those intracellular signals required to elevate endocannabinoid levels following an acute stimulation; whereas, instead, the effect on the expression of CB1 receptors requires prolonged stimulation of other  $\beta$ -adrenoceptor-coupled intracellular signals. The reasons for these differences might also lie in the differential regulation of the expression of AEA and 2-AG metabolic enzymes



**Fig. 6.** Cold exposure and  $\beta$ 3-adrenergic stimulation change endocannabinoid system gene expression in WAT. C57BL6/J wild-type mice were treated as described in the legend of Fig. 2. A–C: Relative expression of 2-AG synthesis (*Dagla*, *Daglb*) and degradation (*Mgll*) genes in WAT. D–G: Relative expression of AEA synthesis (*Abhd4*, *Gde1*, *Napepld*) and degradation (*Faah*) genes in WAT. Values are mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001, Student's  $t$ -test.



**Fig. 7.** Acute  $\beta_3$ -adrenergic treatment of primary brown adipocytes significantly increases *Cnr1* and 2-AG synthesis gene expression. Adipocytes were treated with saline or 1  $\mu$ M CL for 4 h. A: Concentrations of unesterified fatty acids (FFA) were determined in cell supernatants. B–J: Relative mRNA expression of *Ucp1*, *Cnr1*, and endocannabinoid synthetic and degrading enzymes. Results are presented as means  $\pm$  SEM from triplicates of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Student's *t*-test.

in the two tissues, measured here by quantifying the levels of the mRNAs encoding for the corresponding proteins (Fig. 1). In BAT, the effect (or lack thereof) of CL on AEA levels cannot be accounted for by effects on the mRNA expression of enzymes encoding for AEA biosynthesis from *N*-arachidonoyl-phosphatidyl-ethanolamines and inactivation to arachidonic acid (Fig. 4). It is possible, therefore, that CL causes elevation of AEA levels by affecting the availability of its biosynthetic precursors, the *N*-arachidonoyl-phosphatidyl-ethanolamines, which are produced by enzymes that have not yet been molecularly characterized. In the case of 2-AG, instead, while *Mgll* was unchanged, *Dagla* was upregulated by acute and chronic+acute treatment with CL (Fig. 4), thus mirroring the effects of the drug on 2-AG levels and suggesting that the latter effects might be a consequence of the former. *Daglb* was downregulated by chronic+acute treatment with CL, suggesting that this enzyme does not play a role in 2-AG biosynthesis in the BAT of  $\beta_3$ -adrenoceptor-treated animals. Importantly, when we acutely stimulated  $\beta_3$ -adrenoceptors in mouse primary brown adipocytes, we found the same changes of the mRNA expression of AEA biosynthetic enzymes and *Dagla* and *Mgll* (Fig. 7) as those observed in the BAT in vivo (Fig. 4), suggesting cell-autonomous regulation triggered by  $\beta$ -adrenergic signaling. Conversely, *Faah* and *Daglb* were regulated in an opposite manner. This finding indicates that other cell types/tissue might also contribute to the acute effects of CL observed in vivo. However, it must be emphasized that the overall impact on the brown adipocyte endocannabinoid system of  $\beta_3$ -adrenoceptor stimulation, i.e., a strong activation, is likely to be similar both in vitro and in vivo, particularly because in isolated brown adipocytes such treatment also induced upregulation of *Cnr1* mRNA expression. Unfortunately, we could not assess the levels of endocannabinoids in primary brown adipocytes because of the lack of sufficient cell mass to overcome the detection limits of our LC-MS method.

In WAT, both acute and prolonged treatments with either CL or cold appeared to produce significant elevation of at least one of the two endocannabinoids (Fig. 5), although, again, only chronic treatment enhanced *Cnr1* mRNA expression (Fig. 2). The expression of at least one of the possible biosynthetic enzymes for AEA was stimulated to varying degrees by both CL and cold (Fig. 6), thus potentially explaining why the levels of this endocannabinoid were increased by these treatments. Likewise, and, in this case, similar to what observed in the BAT, *Dagla*, opposite to *Daglb*, was upregulated by the same treatments that led to elevation of 2-AG levels (Fig. 6), pointing once again to the former enzyme as the one potentially responsible for increased 2-AG biosynthesis in browning WAT. In summary,  $\beta_3$ -adrenergic receptor stimulation by either a synthetic agonist or cold differently affects the expression of endocannabinoid metabolic enzymes. This observation might be a consequence of the different effects of these stimuli in activated BAT and browning WAT. Differences between AEA and 2-AG regulation might reflect the fact that these two endocannabinoids also have additional targets apart from CB1 and CB2 receptors (32).

Slight differences in the effects of  $\beta_3$ -adrenoceptor stimulation on the expression of AEA and NAE metabolic enzymes might also explain why, both in the BAT and WAT, the levels of PEA and OEA were more often elevated in a statistically significant manner than those of AEA. For example, in the BAT, cold elevated the levels of these two NAEs, possibly due to its stimulatory action on the mRNA levels of *Abhd4* and *Gde1* (which, therefore, might contribute to the biosynthesis of PEA and OEA, but not AEA, in this tissue). It is important to remember that OEA and PEA do not directly activate CB1 and CB2 receptors, and were reported to act on other targets of potential importance for the regulation of adipose tissue metabolism, i.e., PPAR $\alpha$ , TRPV1 (33), and GPR55 (in the case of PEA) or GPR119 (in the case of OEA) (34, 35). Therefore, the role of these two mediators in the control of BAT activation



and WAT browning will have to be fully assessed when the function of their proposed receptors in this context is further clarified. Interestingly, conditional knockout of *Napepld* in the WAT was recently shown to reduce PEA and OEA, but not AEA, levels and to downregulate *Ucp1* expression in this tissue, suggesting a possible stimulatory role of either or both of these compounds on WAT browning (36).

The other major target for AEA and, particularly, 2-AG, i.e., the CB2 receptor, appeared to be regulated by CL and cold exposure in the BAT in a manner opposite to CB1 receptors and/or endocannabinoid levels. Unlike CB1, the role of CB2 in the WAT and, particularly, the BAT has hardly been investigated, and hence future studies will have to address this issue through the use of selective CB2 agonists and antagonists, as well as CB2-null mice.

In conclusion, we have provided here, for the first time, data on the regulation of the endocannabinoid system by stimuli leading to BAT activation and WAT browning, and have hypothesized a role for the endocannabinoids, when signaling at CB1 receptors, as negative feedback autocrine modulators of  $\beta$ 3-adrenoceptor-induced UCP1 upregulation and, hence, of thermogenesis. Given the wealth of data indicating that CB1 blockers induce thermogenesis and energy expenditure in obesity, our findings provide the first hint of what could be the possible role of CB1 receptors and their endogenous agonists in a more physiological type of acute and chronic perturbation of energy homeostasis, such as that induced by exposure to cold and subsequent  $\beta$ 3-adrenoceptor activation. Future studies should be carried out in primary brown adipocytes as well, as in BAT explants, with selective pharmacological tools or BAT-specific cannabinoid receptor knockout to conclusively assess whether brown adipocyte-derived endocannabinoids also negatively control thermogenesis via CB1-mediated autocrine and postjunctional, and not only "retrograde" and prejunctional, actions and to explore the role of CB2 receptors in this setting **■**

The authors thank S. Ehret for expert technical assistance.

## REFERENCES

- Cypess, A. M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A. B. Goldfine, F. C. Kuo, E. L. Palmer, Y. H. Tseng, A. Doria, et al. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**: 1509–1517.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., J. W. Vanhommel, N. M. Smulders, J. M. Drossaerts, G. J. Kemerink, N. D. Bouvy, P. Schrauwen, and G. J. Teule. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360**: 1500–1508.
- Virtanen, K. A., M. E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. J. Savisto, S. Enerback, et al. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* **360**: 1518–1525.
- Bartelt, A., and J. Heeren. 2012. The holy grail of metabolic disease: brown adipose tissue. *Curr. Opin. Lipidol.* **23**: 190–195.
- Eriksson, J., J. Lindstrom, and J. Tuomilehto. 2001. Potential for the prevention of type 2 diabetes. *Br. Med. Bull.* **60**: 183–199.
- Knowler, W. C., E. Barrett-Connor, S. E. Fowler, R. F. Hamman, J. M. Lachin, E. A. Walker, and D. M. Nathan; Diabetes Prevention Program Research Group. 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* **346**: 393–403.
- Ouellet, V., A. Routhier-Labadie, W. Bellemare, L. Lakhal-Chaieb, E. Turcotte, A. C. Carpentier, and D. Richard. 2011. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**: 192–199.
- Yoneshiro, T., S. Aita, M. Matsushita, T. Kayahara, T. Kameya, Y. Kawai, T. Iwanaga, and M. Saito. 2013. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest.* **123**: 3404–3408.
- van der Lans, A. A., J. Hoeks, B. Brans, G. H. Vijgen, M. G. Visser, M. J. Vosselman, J. Hansen, J. A. Jorgensen, J. Wu, F. M. Mottaghy, et al. 2013. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J. Clin. Invest.* **123**: 3395–3403.
- Cannon, B., and J. Nedergaard. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**: 277–359.
- Yoneshiro, T., S. Aita, M. Matsushita, Y. Okamatsu-Ogura, T. Kameya, Y. Kawai, M. Miyagawa, M. Tsujisaki, and M. Saito. 2011. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity (Silver Spring)*. **19**: 1755–1760.
- Bartelt, A., O. T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Itrich, K. Peldschus, M. G. Kaul, U. I. Tromsdorf, H. Weller, C. Waurisch, et al. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* **17**: 200–205.
- Young, S. G., and R. Zechner. 2013. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* **27**: 459–484.
- Wu, J., P. Cohen, and B. M. Spiegelman. 2013. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev.* **27**: 234–250.
- Bartelt, A., and J. Heeren. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**: 24–36.
- Lowell, B. B., and B. M. Spiegelman. 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. **404**: 652–660.
- Zhao, J., B. Cannon, and J. Nedergaard. 1998. Thermogenesis is beta3- but not beta1-adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *Am. J. Physiol.* **275**: R2002–R2011.
- Shabalina, I. G., N. Petrovic, J. M. de Jong, A. V. Kalinovich, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2013. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Reports*. **5**: 1196–1203.
- Silvestri, C., and V. Di Marzo. 2013. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* **17**: 475–490.
- Quarta, C., L. Bellocchio, G. Mancini, R. Mazza, C. Cervino, L. J. Braulke, C. Fekete, R. Latorre, C. Nanni, M. Bucci, et al. 2010. CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metab.* **11**: 273–285.
- Bajzer, M., M. Olivieri, M. K. Haas, P. T. Pfluger, I. J. Magrisso, M. T. Foster, M. H. Tschop, K. A. Krawczewski-Carhuatanta, D. Cota, and S. Obici. 2011. Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice. *Diabetologia*. **54**: 3121–3131.
- Boon, M. R., S. Kooijman, A. D. van Dam, L. R. Pelgrom, J. F. Berbee, C. A. Visseren, R. C. van Aggele, A. M. van den Hoek, H. C. Sips, M. Lombes, et al. 2014. Peripheral cannabinoid 1 receptor blockade activates brown adipose tissue and diminishes dyslipidemia and obesity. *FASEB J.* **28**: 5361–5375.
- Cardinal, P., L. Bellocchio, O. Guzman-Quevedo, C. Andre, S. Clark, M. Elie, T. Leste-Lasserre, D. Gonzales, A. Cannich, G. Marsicano, et al. 2015. Cannabinoid type 1 (CB1) receptors on Sim1-expressing neurons regulate energy expenditure in male mice. *Endocrinology*. **156**: 411–418.
- Vähätalo, L. H., S. T. Ruohonen, S. Mäkelä, L. Ailanen, A. M. Penttinen, T. Stormi, T. Kauko, F. Piscitelli, C. Silvestri, E. Savontaus, et al. 2015. Role of the endocannabinoid system in obesity induced by neuropeptide Y overexpression in noradrenergic neurons. *Nutr. Diabetes*. **5**: e151.
- Perwitz, N., J. Wenzel, I. Wagner, J. Buning, M. Drenckhan, K. Zarse, M. Ristow, W. Lilienthal, H. Lehnert, and J. Klein. 2010. Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes. Metab.* **12**: 158–166.

26. Wagner, I. V., N. Perwitz, M. Drenckhan, H. Lehnert, and J. Klein. 2011. Cannabinoid type 1 receptor mediates depot-specific effects on differentiation, inflammation and oxidative metabolism in inguinal and epididymal white adipocytes. *Nutr. Diabetes*. **1**: e16.
27. Bartelt, A., P. Orlando, C. Mele, A. Ligresti, K. Toedter, L. Scheja, J. Heeren, and V. Di Marzo. 2011. Altered endocannabinoid signalling after a high-fat diet in Apoe (-/-) mice: relevance to adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetologia*. **54**: 2900–2910.
28. Puigserver, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright, and B. M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. **92**: 829–839.
29. de Jesus, L. A., S. D. Carvalho, M. O. Ribeiro, M. Schneider, S. W. Kim, J. W. Harney, P. R. Larsen, and A. C. Bianco. 2001. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **108**: 1379–1385.
30. Jakobsson, A., J. A. Jørgensen, and A. Jacobsson. 2005. Differential regulation of fatty acid elongation enzymes in brown adipocytes implies a unique role for Elovl3 during increased fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**: E517–E526.
31. Addy, C., H. Wright, K. Van Laere, I. Gantz, N. Erondou, B. J. Musser, K. Lu, J. Yuan, S. M. Sanabria-Bohorquez, A. Stoch, et al. 2008. The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab.* **7**: 68–78.
32. Di Marzo, V., and L. De Petrocellis. 2012. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**: 3216–3228.
33. Matias, I., M. P. Gonthier, S. Petrosino, L. Docimo, R. Capasso, L. Hoareau, P. Monteleone, R. Roche, A. A. Izzo, and V. Di Marzo. 2007. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br. J. Pharmacol.* **152**: 676–690.
34. Godlewski, G., L. Offertaler, J. A. Wagner, and G. Kunos. 2009. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **89**: 105–111.
35. Di Marzo, V., and F. Piscitelli. 2015. The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. **12**: 692–698.
36. Geurts, L., A. Everard, M. Van Hul, A. Essaghir, T. Duparc, S. Matamoros, H. Plovier, J. Castel, R. G. Denis, M. Bergiers, et al. 2015. Adipose tissue NAPE-PLD controls fat mass development by altering the browning process and gut microbiota. *Nat. Commun.* **6**: 6495.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe

Hamburg, den 01.05.2016