

# **Funktionelle Analysen zum Acyl-CoA- Bindeprotein (ACBP)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

**vorgelegt von**  
**Dipl.-Biol. Katja Klausz**

Kiel, 2009

Referentin: Prof. Dr. Manuela Dittmar  
Korreferent: Prof. Dr. Karl-Heinz Herzig  
Datum der mündlichen Prüfung: 29.04.2009

Zum Druck genehmigt durch den Dekan der Math.-Nat. Fakultät  
Kiel, den 29.04.2009

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Diabetes mellitus .....	1
1.2. Regulation des Blutzuckerspiegels .....	4
1.2.1. Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) der $\beta$ -Zellen.....	5
1.3. Nahrungslipide .....	7
1.3.1. Fettverdauung und -resorption.....	7
1.3.2. Lipidtransport im Blutplasma .....	8
1.3.3. $\beta$ -Oxidation und Lipidsynthese .....	8
1.4. Intrazelluläre Fettsäurebindeproteine.....	10
1.4.1. Acyl-CoA-Bindeprotein (ACBP) .....	10
1.4.1.1. Gen und Expression.....	11
1.4.1.2. Protein und Funktionen .....	12
1.4.2. Leber-Fettsäurebindeprotein (L-FABP).....	14
1.5. Nukleäre Transkriptionsfaktoren .....	15
1.5.1. „Peroxisome Proliferator-Activated Receptors“ (PPARs) .....	16
1.5.1.1. PPAR- $\alpha$ .....	16
1.5.1.2. PPAR- $\gamma$ .....	17
1.5.1.3. PPAR- $\delta$ .....	18
1.5.2. „Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c“ (SREBP-1c).....	19
1.5.3. „Liver X Receptor- $\alpha$ “ (LXR- $\alpha$ ) .....	20
1.5.4. „PPAR- $\gamma$ Coactivator-1 $\alpha$ “ (PGC-1 $\alpha$ ) .....	20
1.5.5. „Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$ “ (HNF-4 $\alpha$ ) .....	21
1.5.6. Sirtuin 1 (SIRT-1) .....	22
<b>2. Fragestellung und Ziele der Arbeit</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1. Tiere und Haltung.....	26
3.1.1. Fütterung und Diäten .....	26
3.1.2. Glukosetoleranztest und Probennahme .....	26
3.1.3. Gewebeentnahme.....	27
3.2. Bestimmung stoffwechselphysiologischer Parameter .....	27
3.2.1. Glukosemessung .....	27
3.2.2. Insulinmessung.....	27

---

3.2.3.	Bestimmung freier Fettsäuren .....	28
3.2.4.	Triglyzerid- und Cholesterinmessung .....	28
3.3.	Zelllinien.....	28
3.3.1.	INS-1E.....	28
3.4.	Zellkultur.....	28
3.4.1.	INS-1E-Medium.....	29
3.4.2.	Insulinsekretionsexperimente .....	29
3.4.3.	Probennahme und Lagerung.....	29
3.5.	RNA-Isolierung .....	30
3.5.1.	RNA-Isolierung aus Zellen .....	30
3.5.2.	RNA-Isolierung aus Geweben.....	30
3.6.	Verwendete Plasmidvektoren.....	31
3.6.1.	pBluescript SK(+) .....	31
3.6.2.	pcDNA3.1 (+).....	32
3.6.3.	pGEM-T .....	33
3.6.4.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	33
3.6.4.1.	Plasmid-Minipräparation.....	33
3.6.4.2.	Plasmid-Maxipräparation .....	34
3.6.5.	Anlegen & Verwenden von Glycerol-Stocks.....	34
3.7.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
3.7.1.	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	35
3.7.2.	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
3.8.	Proteinisolierung.....	35
3.8.1.	Proteingewinnung aus Zellen.....	36
3.8.2.	Proteingewinnung aus Geweben .....	36
3.8.3.	Konzentrationsbestimmung .....	36
3.9.	Western Blot.....	37
3.9.1.	Gelelektrophorese .....	37
3.9.2.	Blotten.....	37
3.9.3.	Entwicklung.....	38
3.9.4.	Detektion .....	38
3.10.	Transfektion von INS-1E-Zellen .....	38
3.10.1.	siRNA-Transfektionen.....	38
3.10.2.	Plasmid-Transfektionen .....	40
3.10.2.1.	Klonierung der ACBP-cDNA-Sequenz in pcDNA3.1 (+) .....	40
3.10.2.2.	Klonierung der ACBP-Gensequenz in pcDNA3.1 (+) .....	43
3.10.2.3.	Transiente Plasmidtransfektion.....	45

---

3.10.2.4. Stabile Transfektion.....	45
3.11. cDNA-Transkription.....	46
3.12. Quantitative real-time RT-PCR.....	47
3.12.1. Generierung der externen Standards .....	47
3.12.1.1. Primerdesign und -sequenzen.....	47
3.12.1.2. Amplifikation der Zielsequenz.....	48
3.12.1.3. Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	49
3.12.1.4. Klonierung und Transformation.....	50
3.12.1.5. Überprüfung Carbenicillin-resistenter Klone.....	50
3.12.1.6. Berechnung der Plasmidkonzentration.....	51
3.12.1.7. Erstellung der Standardkurven.....	52
3.12.2. Real-time RT-PCR-Messungen.....	53
3.13. Statistische Analysen.....	53
3.14. Puffer und Lösungen.....	54
3.15. Chemikalien und Reagenzien .....	55
3.16. Verbrauchsmaterialien .....	57
3.17. Geräte.....	58
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
4.1. Stoffwechselphysiologische Auswirkungen einer Hochfettdiät auf Wildtyp-Wistar-Ratten und ACBP-überexprimierende Tiere.....	59
4.1.1. Plasmaglukose und -insulin nach GTT .....	59
4.1.1.1. Glukose.....	59
4.1.1.2. Insulin .....	60
4.1.2. Serumgehalt an freien Fettsäuren (NEFA/FFA).....	62
4.1.3. Plasmatriglyzeride .....	63
4.1.4. Cholesterin .....	64
4.2. Transkriptionelle Veränderungen durch die Hochfettdiät in der Leber.....	65
4.2.1. ACBP.....	65
4.2.2. PPARs und SREBP-1c .....	66
4.2.3. Expression weiterer Transkriptionsfaktoren.....	68
4.2.4. L-FABP.....	70
4.3. Generierung eines <i>in vitro</i> -Zellmodells für die Untersuchung des Einflusses der ACBP-Überexpression auf die Insulinsekretion.....	71
4.3.1. Konstruktion eines eukaryotischen ACBP-Expressionsplasmids .....	71
4.3.1.1. Klonierung der ACBP-Gensequenz in pcDNA3.1 (+).....	71
4.3.1.2. Klonierung der ACBP-cDNA in pcDNA3.1 (+).....	74
4.3.2. Generierung einer stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinie.....	75

---

4.3.3.	Einfluss der ACBP-Überexpression auf die Insulinsekretion .....	77
4.3.4.	Einfluss der ACBP-Überexpression auf die mRNA-Expression.....	78
4.4.	Ergebnisse transienter Transfektionen von INS-1E-Zellen .....	82
4.4.1.	Plasmidtransfektion mit pcDNA3.1 (+).....	82
4.4.2.	siRNA-Transfektion .....	85
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
5.1.	Vergleich stoffwechselphysiologischer Effekte verschiedener Diäten auf Wildtypen und ACBP-überexprimierende Ratten.....	88
5.2.	Transkriptionelle Unterschiede in der Leber der Tiere .....	93
5.3.	Generierung einer ACBP-überexprimierenden $\beta$ -Zelllinie .....	98
5.3.1.	Konstruktion des Expressionsplasmids „pcDNA3.1 (+)/ ACBP“ .....	98
5.3.2.	Transiente und stabile Plasmid-Transfektion der INS-1E-Zellen.....	100
5.3.3.	Funktionelle & transkriptionelle Analysen zur stabilen ACBP-Überexpression in den INS-1E-Klonen 750.17 & 50.12 .....	102
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>110</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>123</b>
9.1.	Diäten.....	123
9.1.1.	Low Fat Diet (D12450B; Research Diets Inc., USA) .....	123
9.1.2.	High Fat Diet (D12451; Research Diets Inc., USA).....	123
	<b>Danksagung.....</b>	<b>124</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>125</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>126</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin/ Ampere
Abb.	Abbildung
ABCA	ABC-Transporter Klasse A
ACAT	Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase
ACBP	Acyl-CoA Binding Protein
ACC	Acyl-CoA-Carboxylase
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
ADD-1	Adipocyte Differentiation and Determination factor-1
AF 1 & 2	Aktivierungsdomänen nukleärer Hormonrezeptoren
AIVI	A.I. Virtanen Institute
AMPS	AMmoniumPeroxodiSulfat
ANOVA	ANalysis Of VAriance
Apo	Apolipoprotein
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
AT	Annealing Temperature
ATP	AdenosinTriPhosphat
<i>Bam</i> HI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
bp/BP	Basenpaare oder Blutdruck (Blood Pressure)
<i>Bgl</i> II	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus globigii</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin oder Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy DNA
cm/cm <sup>2</sup>	Zentimeter/Quadratcentimeter
CMV	CytoMegalieVirus
CoA	Coenzym A
Cp	Crossing point
CPT	Carnitine-Palmitoyl-Transferase
D	Dalton
DBD	DNA-Binde-Domäne nukleärer Hormonrezeptoren

---

DBI	Diazepam Binding Inhibitor
DEPC	DiEthylPyroCarbonat
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DMSO	DiMethylSulfOxid
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dNTP	DesoxyNukleosidTriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DR	Direct Repeat
ds	double stranded
DTT	DiThioThreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced ChemoLuminescence
EDTA	EthylenDinitritTetraAcetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und Koautoren)
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAD(H <sub>2</sub> )	FlavinAdeninDinukleotid(Dihydrogen)
FAS	Fatty Acid Synthase
FCS	Fetal Calf Serum
FFA	Free Fatty Acids
forw.	forward
FPG	Fasting Plasma Glucose
g	Gramm oder Erdschwerebeschleunigung
G	Guanin
GABA	Gamma-AminoButyricAcid
GLUT	GLUkoseTransporter
GPAT	Glycerol-3-Phosphat-Transferase
GPR40	G Protein-Coupled Receptor 40
griech.	griechisch
GSIS	Glukos-Stimulierte InsulinSekretion
(o)GTT	(oral) GlukoseToleranzTest
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDL	High Density Lipoprotein
HFD	High Fat Diet
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor



---

HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	HorseRadish Peroxidase
HSL	Hormon-Sensitive Lipase
Hte	High transformation efficiency
IDF	International Diabetes Federation
IFG	Impaired Fasting Glucose
IGT	Impaired Glucose Tolerance
INS-1(E)	Ratteninsulinomzelllinien
i.p.	intraperitoneal
kbp	Kilobasenpaare
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kg	Kilogramm
kJ	KiloJoule
KLBP	Keratinocyte Lipid Binding Protein
KRBH	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Hepes
l	Liter
LB	Lysogeny Broth (auch bekannt als "Luria Bertani")
LBD	Ligand Binding Domäne nukleärer Hormonrezeptoren
LCFA/ LCFA-CoA	Long-Chain Fatty Acid/ Long-Chain Fatty Acyl-CoA
LDL	Low Density Lipoprotein
L-FABP	Leber-FABP (= FABP 1)
LFD	Low Fat Diet
LPL	LipoProteinLipase
LXR(E)	Liver X Receptor (response Element)
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
MCFA/MCFA-CoA	Medium-Chain Fatty Acids/ Medium-Chain Fatty Acyl-CoA
MCS	Multi Cloning Site
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule

---

min	Minute
Mio.	Millionen
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
(m)mol	(milli-)molar
Mrd.	Milliarden
mRNA	messenger-RNA
MT	Messtemperatur
n	Anzahl
NADP(H)	NicotinAmidDinukleotidPhosphat(Hydrogen)
NEFA	Non-Esterified Fatty Acids
NF- $\gamma$	Nuclear Factor $\gamma$
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
<i>NotI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Nocardia otitidis</i>
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ODN	OctaDecaNeuropeptide
p	passage
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PBR	Periphere Benzodiazepin-Rezeptoren
PBS(T)	Phosphate Buffered Saline (Tween 20)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	PolyEthylenImin
PGC-1	Peroxisome proliferator activator-Gamma Coactivator 1
pH	potentia Hydrogenii ("Kraft des Wasserstoffs")
PMSF	PhenylMethylenSulfonFluorid
PPAR	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor
PPRE	Peroxisome-Proliferator-Response Element
PUFA	Poly-Unsaturated Fatty Acids
rel.	relativ(e)
rev.	reverse
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	RiboNucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription oder Raumtemperatur
RXR	Retinoic X Receptor
SCAP	SREBP-Cleavage Activating Protein
SCP-2	Sterol-Carrier-Protein 2

---

scr. siRNA	scrambled siRNA
SDS	SodiumDodecylSulfate
sec	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean
SIR2	Silent Information Regulator 2
siRNA	small interfering RNA
SIRT-1	Sirtuin 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
s.o.	siehe oben
SRE	Sterol-Response Element
SREBP	Sterol-Regulatory Element Binding Protein
ss	single stranded
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-TetraMethylEthylenDiamine
tg	transgen
TG	TriGlyzeride
Tm	melting Temperature
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor-alpha
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil oder Units
UCP2	UnCoupling Protein 2
UKUR	University of KUopio Rat line
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
u.U.	unter Umständen
V	Volt
v.a.	vor allem
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
z.T.	zum Teil
%	Prozent

## 1. Einleitung

### 1.1. Diabetes mellitus

Diese volkstümlich als Zuckerkrankheit bezeichnete häufigste endokrine Störung des Glukosestoffwechsels erreichte in den vergangenen Jahrzehnten in den Industrienationen gravierende Ausmaße. Die Zahl der Erkrankten lag 2005 laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) bei ca. 217 Mio. Menschen weltweit. Die „International Diabetes Federation“ (IDF) spricht von der „Epidemie des 21. Jahrhunderts“ und bezifferte die Mortalitätsrate im Jahr 2007 auf 3,8 Mio. Menschen (Typ-1- und Typ-2-Diabetes mellitus; 90 % Typ-2-Diabetiker). Das entsprach einem Anteil von 6 % an der Weltbevölkerung. Die zunehmende Inzidenz und der resultierende volkswirtschaftliche Schaden haben die Aufklärung der zugrunde liegenden zellulären und systemischen Zusammenhänge in den letzten Jahren und Jahrzehnten immer stärker in den Blickpunkt der Wissenschaft gerückt.

Unter dem Begriff Diabetes mellitus werden eine Reihe stoffwechselphysiologischer Störungen zusammengefasst, die als gemeinsames Charakteristikum eine chronische Hyperglykämie aufweisen. Dieser liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung oder auch beides zugrunde. Der Diabetes mellitus Typ 1 wird durch eine Autoimmunerkrankung oder idiopathisch verursacht und ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu kommt es beim Diabetes mellitus Typ 2 durch die Insulinresistenz der Zielorgane, die einhergeht mit chronischer Hyperinsulinämie, und/oder durch eine gestörte Insulinsekretion, zum Sekundärversagen der  $\beta$ -Zellen des Pankreas mit fortschreitendem Insulinmangel.

Abdominale Adipositas (Fettleibigkeit) gilt als ein wesentlicher Risikofaktor und kann für die Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 prädisponierend sein. Wenngleich nicht alle Erkrankten übergewichtig oder fettleibig sind, ist dies jedoch bei ca. 80 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose der Fall (Smyth *et al.* 2006). Zudem besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem „Body Mass Index“ (BMI) und der Diabetesinzidenz.

Laut WHO galten im Jahr 2005 ca. 1,6 Mrd. Menschen als übergewichtig (BMI > 25), darunter auch ca. 20 Mio. Kinder unter 5 Jahren. Ab einem BMI > 30 (im ostasiatischen Raum > 27) liegt Adipositas mit unterschiedlichem Schweregrad vor (ca. 400 Mio. Menschen weltweit). Allein in Deutschland sind 67 % der Männer und 53 % der Frauen übergewichtig und davon 19 bzw. 22 % adipös, insgesamt 37 Mio. Betroffene (Hoffmann *et al.* 2003).

Von besonderer Bedeutung für die prädisponierende Wirkung der Adipositas ist dabei das abdominale/viszerale Fett. Aus diesem Grund ist der Bauchumfang in der aktuellen IDF-Definition des Metabolischen Syndroms als einer der Risikofaktoren aufgeführt. Unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ (oder auch „Syndrom X“) werden stoffwechselphysiologische Veränderungen zusammengefasst, die unbehandelt zu einem 5-fach erhöhten Risiko einer Diabetes mellitus Typ 2-Erkrankung führen.

Die folgenden Risikofaktoren sind von der IDF gelistet:

- abdominale Adipositas (mit speziellen Grenzwerten für die verschiedenen ethnischen Gruppen; z.B. Europäer:  $\geq 94$  cm bei Männern,  $\geq 80$  cm bei Frauen) plus zwei der folgenden vier Kriterien:
  1. Hyperlipidämie (Plasmatriglyzeride  $\geq 150$  mg/dl)
  2. geringes HDL-Cholesterin (HDL  $< 40$  mg/dl bei Männern,  $< 50$  mg/dl bei Frauen)
  3. Hypertonie (systolischer BP  $\geq 130$  oder diastolischer BP  $\geq 85$  mmHg)
  4. erhöhte Nüchtern glukosewerte („Fasting Plasma Glucose“ (FPG)  $\geq 100$  mg/dl)

Dagegen erfolgt die Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 2 v.a. durch die Messung der Glukosekonzentration im Blut und gilt bereits als gesichert bei zweimaliger Feststellung einer FPG  $\geq 126$  mg/dl oder  $\geq 200$  mg/dl 1-2 h postprandial (Bruhn *et al.* 2008). Bei gestörter Glukosetoleranz (IGT) oder Nüchtern glukose (IFG) wird klinisch ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT; orale Administration von 75 g gelöster Glukose) nach mind. 8 h Nahrungskarenz durchgeführt. Für die dabei bestimmten venösen Plasma-Blutzuckerwerte gelten folgende Richtlinien (Tab. 1).

**Tab. 1: Leitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft (Kerner *et al.* 2004)**

	<u>Nüchternwert</u>	<u>2 h-oGTT-Wert</u>
Normalbefund	$< 100$ mg/dl ( $< 5,6$ mmol/l)	$< 140$ mg/dl ( $< 7,8$ mmol/l)
<b>Diabetes mellitus</b>	<b><math>\geq 126</math> mg/dl</b> <b>(<math>\geq 7,0</math> mmol/l)</b>	<b><math>\geq 200</math> mg/dl</b> <b>(<math>\geq 11,1</math> mmol/l)</b>
Impaired Fasting Glucose (IFG)	100 - 125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l)	wenn gemessen $< 140$ mg/dl
Impaired Glucose Tolerance (IGT)	wenn gemessen $< 126$ mg/dl	$\geq 140$ u. $< 200$ mg/dl ( $\geq 7,8$ u. $< 11$ mmol/l)

Die chronische Hyperglykämie beim Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Folge der Insulinresistenz der peripheren Organe. Die Insulinresistenz, d.h. die ineffiziente Interaktion zwischen dem Hormon Insulin und den Insulinrezeptoren der Zielzellen, führt anfangs zu chronischer Hyperinsulinämie bei normaler und erhöhter Blutzuckerkonzentration. Dies bedingt eine zunehmende funktionelle Erschöpfung der  $\beta$ -Zellen, woraus im Laufe der Zeit eine verminderte Insulinsekretion resultiert. Mit der fortschreitenden Apoptose der Zellen kommt es zum Insulinmangel mit einhergehender Hyperglykämie. Diese liegt zum einen im verminderten Glukoseaufnahmepotential des peripheren Muskel-, Leber- und Fettgewebes begründet, zum anderen in der erhöhten Glukoneogenese in Leber und Nierenrinde bei gleichzeitig reduzierter Glykogenese in der Leber und den skeletalen Muskelzellen. Weitere durch den Insulinmangel verursachte Stoffwechselveränderungen sind die verstärkte Lipolyse und der erhöhte katabole Proteinabbau, welche zu einem Anstieg der Plasmatriglyzeride, der freien Fettsäuren (FFA) und der Aminosäuren (AS) im Blut führen. Wird die Rückresorptionsfähigkeit überschritten, führt die fortschreitende Hyperglykämie zu Glukosurie und Polyurie. Bei absolutem Insulinmangel kommt es ohne Medikation zum ketoazidotischen Koma (*Coma Diabeticum*), dem umgangssprachlichen Zuckerschock.

Neben den ungesunden Lebensumständen in hochentwickelten, technisierten Gesellschaften (fette Ernährung, mangelnde körperliche Aktivität, höheres Lebensalter usw.), die zu der hohen Inzidenz führen, besteht auch eine genetische Prädisposition für Adipositas und eine Diabetes mellitus Typ 2-Erkrankung. So belegen Studien eine familiäre Häufung mit einer hohen Korrelation bei eineiigen Zwillingen (Weiss *et al.* 2004; Adeghate *et al.* 2006; Condon *et al.* 2008). Zahlreiche Mutationen und Polymorphismen in Genen von fettstoffwechselassoziierten Proteinen und Transkriptionsfaktoren werden im Hinblick auf ihre pathologische Bedeutung in diesem Zusammenhang diskutiert oder sind bereits identifiziert worden. Zum Beispiel führt ein „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) im humanen Acyl-Coenzym A (CoA)-Bindprotein (ACBP)-Gen zu einem verminderten Risiko für eine Diabetes mellitus Typ 2-Erkrankung (Fisher *et al.* 2007a; Fisher *et al.* 2007b). Die Mutation im Gen des Transkriptionsfaktors „Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-4 $\alpha$ “ hingegen ist direkt mit einer speziellen Form des Typ 2-Diabetes, dem „Maturity-Onset Diabetes of the Young“ (MODY), assoziiert (Wang *et al.* 2002).

## **1.2. Regulation des Blutzuckerspiegels**

Höhere Organismen nehmen Glukose entweder mit der Nahrung auf (ca. 80 % der absorbierten Kohlenhydrate) oder synthetisieren sie durch den Abbau von Stärke (bei Pflanzen) oder Glykogen (bei Säugern). Dabei ist Glukose für einige Teile des Gehirns, die Erythrozyten und das Nierenmark essentieller Energielieferant. Aus diesem Grund muss dessen stetige Verfügbarkeit im Organismus gewährleistet sein. Dies wird mit Hilfe der antagonistisch wirkenden Hormone Insulin und Glucagon erreicht, die den Glukosegehalt des Blutes bei ca. 0,1 % relativ konstant halten (Nüchternblutglukose: 80-120 mg/dl oder 4,5-6,7 mmol/l).

Das Gehirn, die Erythrozyten und das Nierenmark sind mit Hilfe spezieller, hochaffiner Glukosetransporter (GLUT-1) auf ihren Membranoberflächen in der Lage, die im Blut vorhandene Glukose direkt aufzunehmen und in Energie umzuwandeln. Die  $\beta$ -Zellen des Pankreas besitzen hingegen weniger affine GLUT-2-Transporter, deren Anzahl sich aber parallel zur Glukosekonzentration im Blut verhält. Ein Anstieg der Blutglukose führt daher zu erhöhter Glukoseaufnahme und ATP-Produktion in den Zellen, wodurch es letztlich zur Insulinsekretion kommt. Das freigesetzte Insulin zirkuliert im Blut und signalisiert den peripheren Zielorganen (Leber, Muskeln, Fettgewebe) über Insulinrezeptoren auf deren Oberfläche die Verfügbarkeit von Glukose. Die Bindung des Hormons setzt dabei intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die die Anzahl von GLUT-4-Transportern auf deren Zelloberflächen erhöhen und den Stoffwechsel der Effektorzellen sowie deren genetisches Expressionsmuster auf glykolytische Prozesse umstellen. In der Leber steigen Glukoseaufnahme und Glykogensyntheserate, gleichzeitig werden Glykogenolyse, Glukoneogenese und  $\beta$ -Oxidation gehemmt. In den Skelettmuskeln erhöht sich ebenfalls die Glukoseaufnahme und die Glykogensynthese, wohingegen im Fettgewebe die aufgenommene Glukose in Fettsäuren umgewandelt und in Form von Triglyzeriden gespeichert wird. So senkt Insulin nicht nur den Blutzuckerspiegel, sondern dient gleichzeitig als Energiespeicherhormon des Körpers.

Ist die verfügbare Glukose verbraucht, verringert sich die Insulinmenge im Blut. Gleichzeitig geht auch die Konzentration an  $\gamma$ -Aminobuttersäure („gamma-aminobutyric acid“, GABA) zurück, welche zusammen mit dem Insulin von den  $\beta$ -Zellen freigesetzt wird und als Neurotransmitter inhibitorisch auf die Glucagonsekretion der pankreatischen  $\alpha$ -Zellen wirkt. Für die Glucagonfreisetzung aus den  $\alpha$ -Zellen bedarf es daher einer verringerten GABA-

Sekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Glucagon fördert als Gegenspieler des Insulins die Glukoneogenese und Glykogenolyse in der Leber und den Skelettmuskeln. Gleichzeitig steigert es die Lipolyse durch Aktivierung der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) im Fettgewebe und stellt den Stoffwechsel der Hepatozyten auf die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren um.

Beide Hormone werden von spezialisierten Zellen des endokrinen Pankreas gebildet – den Langerhansschen Inseln (*Insulae pancreaticae*). Diese machen bei Erwachsenen einen Anteil von 2-3 % des Bauchspeicheldrüsengewebes aus und befinden sich vorwiegend im Abschnitt des *Corpus* und der *Cauda*. Den mengenmäßig größten Teil der humanen Inselzellen bilden die Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen (60-80 %) zusammen mit den Glucagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen (15-20 %). Alle pankreatischen Hormone, zu denen auch Ghrelin, Somatostatin und das Pankreatische Polypeptid gehören, werden über ein dichtes Netz an Inselkapillaren direkt ins Blut abgegeben und steuern sowohl den Blutzuckerspiegel und damit den Energieumsatz und -verbrauch des peripheren Gewebes als auch weitere wichtige Funktionen (z. B. exokrine Pankreassekretion, Gallefluss, gastrointestinale Funktionen).

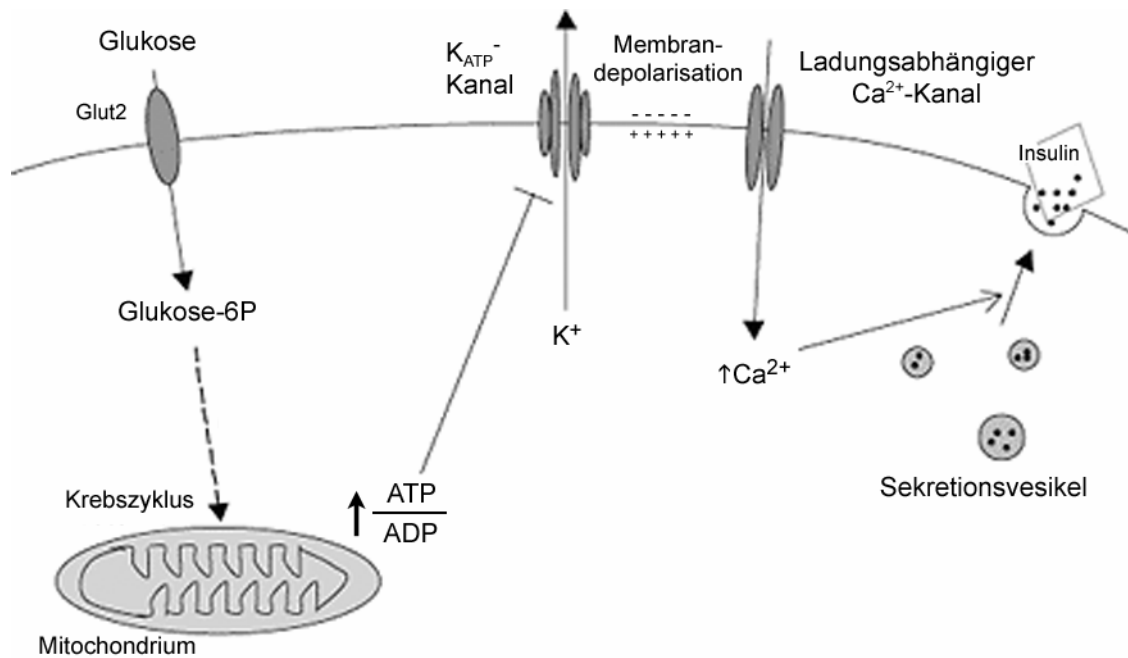
### **1.2.1. Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) der $\beta$ -Zellen**

Den Hauptreiz für die Ausschüttung von Insulin aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen liefert der Anstieg des Blutzuckerspiegels. Die Glukose wird von den GLUT-2-Transportern in der Zellmembran der  $\beta$ -Zellen insulinunabhängig in die Zellen transportiert und dort glykolytisch abgebaut. Die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran führen zum Anstieg des cytoplasmatischen ATPs. Die folgende GSIS findet in zwei Phasen statt (biphasische Sekretionsantwort).

Bei der ersten, akuten Phase kommt es durch die hohe intrazelluläre ATP-Konzentration zum Schließen der ATP-abhängigen Kalium ( $K^+$ )-Kanäle in der Zellmembran der  $\beta$ -Zellen, was zu deren Depolarisation führt. Die daraus resultierende Öffnung ladungsabhängiger Kalzium ( $Ca^{2+}$ )-Kanäle bewirkt einen Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zellen. Dies bewirkt den Transport cytoplasmatischer Insulinvesikel (Granula) an die Zellmembran und führt zur Freisetzung des gespeicherten Insulins. Gleichzeitig wird über Rückkoppelung durch die Wiederöffnung der  $K^+$ -Kanäle die Exocytose gestoppt (Feedback-Regulation). Diese pulsatile Freisetzung von Insulin läuft innerhalb von Minuten ab und führt zu einer maximalen



Insulinausschüttung des cytoplasmatisch vorrätigen Insulins, die sich nach einigen Minuten wieder abschwächt (Abb. 1).



**Abb. 1: Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) pankreatischer  $\beta$ -Zellen.**  
(modifiziert nach Parrizas, M., 2002)

Etwa 10 Minuten nach einem Glukosestimulus setzt dann die zweite, späte Phase der GSIS ein, die zu einer anhaltenden Erhöhung der Insulinsekretion aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen führt. Sie ist mit einer Vielzahl metabolischer Prozesse assoziiert, die potenzierend auf die GSIS wirken. Dazu zählen z.B. der Glutamat-Stoffwechsel (Maechler *et al.* 1999), der Pyruvat-Zyklus (Lu *et al.* 2002), das NADH-Shuttle-System (Eto *et al.* 1999), die *de novo*-Lipogenese langkettiger Acyl-CoAs (Prentki *et al.* 1992) und die NADPH-Produktion (Ivarsson *et al.* 2005; MacDonald *et al.* 2005; Ronnebaum *et al.* 2006).

Forschungen der letzten Jahrzehnte offenbarten zudem differenzierte Effekte von Fettsäuren und deren aktivierten, intrazellulären Formen auf die Insulinsekretion von  $\beta$ -Zellen und sind für deren adäquate Insulinantwort bzw. pathologische Vorgänge von entscheidender Bedeutung (Prentki *et al.* 1992; Zhou *et al.* 1994; Corkey *et al.* 2000; Yaney *et al.* 2000; Itoh *et al.* 2003; Yaney *et al.* 2003; Pappan *et al.* 2005; Winzell *et al.* 2006).

### **1.3. Nahrungslipide**

Der Begriff Lipide (griech.: *lípos* „Fett“) ist eine Sammelbezeichnung für eine Reihe hydrophober Naturstoffe, die in höheren Organismen wichtige Funktionen erfüllen. So sind sie wesentlicher Bestandteil biologischer Membranen, stellen eine entscheidende Energiereserve dar, wirken als thermische und mechanische Isolatoren und sind Lösungsmittel für lipidlösliche Substanzen. Circa 98 % der zugeführten Nahrungslipide sind Triglyzeridester aus dem Alkohol Glycerin und drei Fettsäuren. Bei den Fettsäuren unterscheidet man zwischen kurz- (1-3 Kohlenstoff (C)-Atome), mittel- (6-12 C-Atome; MC-) und langkettigen (> 12 C-Atome; LC-) Fettsäuren (FA) sowie zwischen gesättigten und ungesättigten (ein oder mehrere Doppelbindungen zwischen den C-Atomen). Etwa 90 % der aufgenommenen Nahrungsfette sind Triglyzeride aus gesättigten, LCFA mit 16-18 C-Atomen. Die ungesättigten Fettsäuren Linol-, Linolen- und Arachidonsäure sind essentiell und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Fette werden in Form von Triglyzeriden im weißen Fettgewebe gespeichert und bilden nach dem Glykogen die zweitwichtigste Energiespeicherform im menschlichen Organismus.

#### **1.3.1. Fettverdauung und -resorption**

Die Verdauung und Absorption der Nahrungslipide beginnt im Magen durch die vom Zungengrund sezernierten Lipasen, sodass bis zu 30 % der Triglyzeride verdaut werden. Anschließend bewirken die von der Leber gebildeten Gallensäuren, die mit pankreatischen Lipasen und dem Magensäure-neutralisierenden „Pankreassaft“ ins Duodenum gelangen, die Emulgierung der verbleibenden Lipide. Durch die Mizellenbildung kommt es zu einer starken Oberflächenvergrößerung. Die Pankreaslipasen, die z.T. von Gallensäuren aktiviert werden müssen, spalten die Triglyzeride in Mono- und Diglyzeride. Die Lipolyse ist dabei äußerst effektiv, denn bereits nach der Hälfte der Duodenalpassage sind 80 % der aufgenommenen Fette gespalten. Die in den Mizellen enthaltenen Mono- und Diglyzeride sowie Glycerin, FFA und Phospholipide werden über die Bürstensaummembran der duodenalen und jejunalen Epithelzellen absorbiert, das Cholesterin über die Epithelzellen des Ileums. Die Mono- und Diglyzeride werden im Cytoplasma der Mukosazellen mit aktivierten Fettsäuren (Acyl-CoA) zu Triglyzeriden reverestert, wobei vorrangig LCFA-CoA inkorporiert werden. Assoziiert mit verschiedenen Apolipoproteinen (Apo) gelangen die Triglyzeride als Chylomikronen durch Exocytose über die basolaterale Membran der Epithelzellen in das Lymphgefäßsystem und damit in den Blutkreislauf.

### **1.3.2. Lipidtransport im Blutplasma**

Albumin, dessen Konzentration mit 35-55 g/l die Menge aller übrigen Proteine im Plasma übersteigt, bindet und transportiert v.a. FFA. Triglyzeride, Phospholipide und Cholesterin zirkulieren umhüllt von (Apo-) Lipoproteinen im Blut. Diese Lipoproteinkomplexe besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Protein- und Lipidkomposition variierende Dichten. Entsprechend der Dichte unterscheidet man drei verschiedene Klassen: die „Very Low Density Lipoproteins“ (VLDL), die „Low Density Lipoproteins“ (LDL) und die „High Density Lipoproteins“ (HDL). Chylomikronen, deren Dichte noch geringer ist als die der VLDL, sind wie die VLDL besonders reich an Triglyzeriden (85-90 % bzw. 60 %) und weisen einen Proteingehalt unter 10 % auf.

Im Falle der Chylomikronen entstammen die Triglyzeride den Nahrungsfetten und gelangen ausgehend von den Epithelzellen des Verdauungstraktes ins Blut. Dort übernehmen sie von HDL das ApoCII, welches als Aktivator der plasmaseitigen Lipoproteinlipase (LPL) des Gefäßendothels fungiert. Auf diese Weise werden 70-90 % der in den Chylomikronen enthaltenen Triglyzeride in FFA und Glycerin gespalten. Der cholesterinreiche Rest, Chylomikronen-Remnant genannt, wird in Hepatozyten abgebaut. Die in den VLDL enthaltenen Triglyzeride entstammen z.T. auch der Nahrung sind aber v.a. endogen in der Leber gebildet und gelangen von dort in den Blutkreislauf. Auch sie werden durch die Aktivierung der endothelialen LPL mit Hilfe des ApoCII hydrolytisch gespalten. Durch diese fortschreitende Hydrolyse der Triglyzeride entstehen aus den Chylomikronen und VLDL die LDL, die hauptsächlich aus Cholesterin, Cholesterinestern und Phospholipiden bestehen. Über spezifische LDL-Rezeptoren auf der Membranoberfläche werden diese internalisiert und die Aufnahme von Cholesterin in die Zellen ermöglicht. Dieses wird vorrangig für die Synthese von Membranen verwendet. Die HDL sind die protein- und phospholipidreichste Fraktion mit der höchsten Dichte. Sie transportieren überschüssiges Cholesterin (HDL-Cholesterin) zu den Hepatozyten, die HDL-spezifische Rezeptoren besitzen, wo es zu Gallensäuren und Steroidhormonen umgebaut werden kann.

### **1.3.3. $\beta$ -Oxidation und Lipidsynthese**

Sind Kohlenhydrate als Energiequelle verbraucht und steigt der Glucagonspiegel im Blut werden durch die Aktivierung der HSL und intrazellulärer Lipasen in den Adipozyten gespeicherte Triglyzeride hydrolysiert (Lipolyse). Die entstehenden FFA gelangen in den Blutkreislauf und zirkulieren an Albumin gekoppelt. Mit Hilfe spezieller membranständiger

Transportproteine oder durch Diffusion werden diese aufgenommen und unter ATP-Verbrauch durch die intrazelluläre Acyl-CoA-Synthetase (ACS) an CoA gebunden. Da in Triglyceriden hauptsächlich gesättigte LCFA mit Glycerinen verestert sind, befinden sich demzufolge vermehrt LCFA-CoA im Cytoplasma der Zellen. Diese werden von intrazellulären Transportproteinen gebunden und u.a. an die Mitochondrienmembran befördert. Dort gelangen sie über ein System von zwei Carnitin-Palmitoyl-Transferasen (CPT-1 und -2; auch bekannt als Carnitin-Acyl-Transferasen) in die Matrix der Mitochondrien. Ausgehend vom Carboxylende des LCFA-CoAs werden mit jedem Zyklus am  $\beta$ -C-Atom oxidativ zwei C-Atome abgespalten, weshalb dieser Prozess auch als  $\beta$ -Oxidation bekannt ist. Pro Zyklus entstehen ein Molekül Acetyl-CoA sowie ein NADH und ein FADH<sub>2</sub>, welche durch die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran für die ATP-Synthese genutzt werden. Das Acetyl-CoA wird aus den Mitochondrien ins Cytoplasma transportiert und dort im Citratzyklus unter Energiegewinnung umgesetzt. Auch ungesättigte Fettsäuren und Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen sind mittels zusätzlicher Enzyme und Modifikationen durch  $\beta$ -Oxidation abbaubar und können für die Energiegewinnung herangezogen werden.  $\beta$ -Oxidation findet ebenfalls in den Peroxisomen statt, dient dort sie der Verkürzung sehr langkettiger Fettsäuren (> 18 C-Atomen) und damit deren Vorbereitung auf den mitochondrialen Abbau.

Die Lipidsynthese (Lipogenese) erfolgt mit Hilfe der ACC und dem FAS-Multienzymkomplex unter Energieverbrauch (NADPH) im Cytosol einer Vielzahl von Zellen. Dabei werden aus Acetyl- und Malonyl-CoA Fettsäuren gebildet, wobei pro Zyklus ein Acetyl-CoA (2 C-Atome) inkorporiert wird. Die endogen synthetisierten Fettsäuren besitzen daher immer eine gerade Anzahl von C-Atomen und sind zudem gesättigt. Im menschlichen Organismus werden bevorzugt die C16-Fettsäure Palmitat und die Stearinsäure (C18) produziert. Ungesättigte Fettsäuren können mit Hilfe der Acyl-CoA-Desaturase aus den gesättigten Fettsäuren gewonnen werden. Alle weiteren einfach und alle mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) müssen mit der Nahrung aufgenommen werden.

Direkt im Anschluss an ihre Synthese werden die Fettsäuren im Cytoplasma aktiviert und können an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu Triglyceriden verestert werden. Dabei werden mit Hilfe des Triacylglycerin-Synthase-Komplexes Acyl-CoAs an aktiviertes Glycerin ( $\alpha$ -Glyzerophosphat) gebunden. Die Triglyceride werden von den peripheren Geweben in Form von VLDL zum Fettgewebe transportiert und dort gespeichert.

## 1.4. Intrazelluläre Fettsäurebindeproteine

Die Regulation der cytosolischen Konzentration aktivierter, d.h. an CoA gekoppelter, Fettsäuren ist von entscheidender Bedeutung, denn in freier Form und hoher Konzentration wirken sie detergent und damit toxisch auf die Zelle. Dennoch bilden Acyl-CoAs die Grundlage wichtiger zellulärer Prozesse, wie der  $\beta$ -Oxidation, der Phospholipid-, Cholesterin- und Triglyzeridsynthese, und daher ist ihre Lokalisation und der intrazelluläre Transport streng geregelt. Für diesen Zweck existieren bei Säugern insgesamt drei Familien von Fettsäurebindeproteinen:

- das Acyl-CoA-Bindeprotein (ACBP),
- „Fatty Acid Binding Proteins“ (FABPs) und
- das Steroltransportprotein (SCP-2)

ACBP und FABPs binden LCFA-CoA im Cytosol, unterscheiden sich aber in ihrer Affinität und Spezifität. SCP-2 ist in den Peroxisomen, nicht aber im Nukleus lokalisiert und bindet langkettige sowie sehr langkettige Fettsäuren (Gossett *et al.* 1996). Aufgrund der spezifischen Lokalisation in den Zellen wird im Weiteren nicht näher auf die SCP-2-Proteinfamilie eingegangen. Hingegen soll insbesondere das ACBP, welches sich durch die höchste Affinität und Spezifität für LCFA-CoA auszeichnet, im Folgenden charakterisiert werden.

### 1.4.1. Acyl-CoA-Bindeprotein (ACBP)

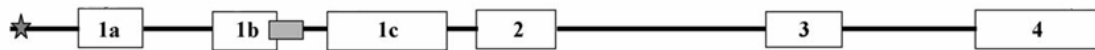
Das ACBP ist ein 10 kDa Polypeptid, welches ubiquitär in allen bislang untersuchten Eukaryoten vorkommt. Obwohl bislang keine homologen Proteine in Bakterien und Archaeen gefunden wurden, besitzen einige pathogene Eubakterien dem ACBP ähnliche Gene (Burton *et al.* 2005). ACBP-Gen und -Protein sind hochgradig konserviert, allerdings variieren Konzentration und Expression deutlich zwischen verschiedenen Spezies, in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen und unterliegen zudem Schwankungen durch metabolische Gegebenheiten. Eine wesentliche Funktion des ACBPs ist die intrazelluläre Bindung und der Transport von LCFA-CoAs, was dessen hohe Konzentration in Zellen und Geweben mit erhöhtem Lipidumsatz erklärt (Knudsen *et al.* 1993; Neess *et al.* 2006). Zusätzlich besitzt es die funktionelle Fähigkeit Diazepam von dessen Bindestelle am  $\gamma$ -Aminobutyrat-Rezeptor Typ A (GABA<sub>A</sub>-Rezeptor) zu entfernen und wird deshalb auch als Diazepam-Bindeinhibitor (DBI) bezeichnet (Costa *et al.* 1991).

#### 1.4.1.1. Gen und Expression

Die Exon-/Intron-Struktur des ACBP-Gens ist zwischen Mensch, Ratte und Maus identisch. Sie besteht aus vier Exons (inkl. des alternativen Exons 1) und drei Introns, unterscheidet sich aber in der Größe und der chromosomalen Lokalisation. So haben Menschen ein 5,6 kbp umfassendes Gen, welches sich auf dem Chromosom 2 befindet; Ratten hingegen mit 8,7 kbp ein größeres Gen auf dem Chromosom 13. Bei ihnen besteht die ACBP-Genfamilie aus einem funktionalen Gen und vier weiteren Pseudogenen. Dieses Gen kodiert für ein aus 87 AS bestehendes Protein, welches zu 79,3 % dem des Menschen ähnelt (Mandrup *et al.* 1992). Bei Mäusen findet sich neben dieser ACBP-Variante (87-AS-Protein), ein weiteres Transkript, welches für ein 135 AS großes Protein kodiert (Nitz *et al.* 2005). Das menschliche ACBP-Gen existiert in drei unterschiedlichen Varianten, die ein aus 86, 88 oder 104 AS bestehendes Protein liefern. Dabei entstehen die Unterschiede im N-Terminus durch alternative Exon-1-Verwendung, beeinflussen aber nicht die Acyl-Co-Bindemotive der resultierenden Proteine (Kolmer *et al.* 1995).

Die Promotorregion des ACBP-Gens weist nach Mandrup *et al.* (1992) alle Merkmale eines Housekeeping-Gens auf, nichtsdestotrotz unterliegt die Expression verschiedenen Regulationsmechanismen. Über ein funktionelles „Sterol Regulatory Element“ (SRE) sowie ein „Peroxisome Proliferator Response Element“ (PPRE), wird die ACBP-Genexpression durch die Transkriptionsfaktoren „Sterol Regulatory Element-Binding Protein“ (SREBP) und „Peroxisome Proliferator Activated Receptor“ (PPAR) in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus (Bhuiyan *et al.* 1995; Neess *et al.* 2006), dem Gewebe- bzw. Zelltyp und dem Differenzierungsgrad der Zelle gesteuert ((Swinnen *et al.* 1996; Helledie *et al.* 2002; Sandberg *et al.* 2005a); Abb. 2; siehe auch Transkriptionsfaktoren, Kapitel 1.5). Funktionelle Bindestellen im ACBP-Promotor für Sp1 und NF-Y, welche u.a. auch als Cofaktoren für SREBPs fungieren, sind ein weiteres Indiz für komplexe Regulationsmechanismen und liefern eine Erklärung für die hohe basale Expression des ACBP-Gens in Fibroblasten und Hepatozyten (Bhuiyan *et al.* 1995; Neess *et al.* 2006). Neben den erwähnten nukleären Transkriptionsfaktoren beeinflussen auch Hormone, wie Insulin (Bhuiyan *et al.* 1995; Neess *et al.* 2006), und Androgene die ACBP-Expression (Massotti *et al.* 1991; Swinnen *et al.* 1996).

Am C-Terminus der ACBP-Gensequenz von Mensch, Ratte und Maus findet sich zudem eine ER-Membranerkenntnissequenz, die als Signalsequenz bei der Translation des ACBP-Proteins von Bedeutung sein könnte (Nitz *et al.* 2005).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Acyl-CoA-Bindeprotein (ACBP)-Gensequenz** (Nitz *et al.* 2005).

Als weiße Boxen sind die vier Exons (mit den alternativen Exonvarianten 1a, 1b und 1c), als schwarze Linie die Introns dargestellt. Der graue Stern markiert die „sterol regulatory element (SRE)“, die graue Box die „peroxisome proliferator response element (PPRE)“-Bindesequenz.

Mutationen im humanen ACBP-Gen, und dabei insbesondere funktionale SNPs in der Promotorregion, sind mit einer Diabetes mellitus Typ 2-Erkrankung assoziiert und belegen die Bedeutung dieses Fettsäurebindeproteins (Fisher *et al.* 2007a).

#### 1.4.1.2. Protein und Funktionen

Das ACBP ist ein cytoplasmatisches 10 kDa-Protein, welches ubiquitär vorkommt und evolutionär hoch konserviert ist. Es besteht zu 48 % aus  $\alpha$ -Helices, die in „up-down-down-up“-Orientierung aufeinander folgen (Knudsen 1991; Faergeman *et al.* 1996). Das ACBP-Protein besitzt eine hydrophobe Binderegion durch die Acyl-CoAs monomerisch mit hoher Affinität und Spezifität gebunden werden ( $K_d$  1-10 nM; Knudsen *et al.* 2000). Vorzugsweise werden gesättigte LCFA-CoA der Kettenlänge C14-C22 transportiert und vor Hydrolyse geschützt, wodurch ACBP als intrazellulärer Acyl-CoA-Poolbildner fungiert (Faergeman *et al.* 1996; Knudsen *et al.* 2000). Im Cytoplasma und auch an Membranen interagiert ACBP direkt mit Proteinen und Enzymen, wie der Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) und der Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT) und reguliert auf diese Weise die Cholesterin-, Triglyzerid- und Phospholipidsynthese von Zellen (Rasmussen *et al.* 1994; Kerkhoff *et al.* 1997; Gossett *et al.* 1998; Chao *et al.* 2003; Kannan *et al.* 2003). Indem es die Transacylierung von ungesättigten LCFA-CoA durch die mikrosomale GPAT forciert und die der gesättigten LCFA-CoA inhibiert, sichert ACBP diese zudem für die mitochondriale Energiegewinnung (Jolly *et al.* 2000). So werden aufgrund der Spezifität des ACBPs vorrangig gesättigte LCFA-CoA an die mitochondriale CPT-1 übergeben, in die Mitochondrien transportiert und der  $\beta$ -Oxidation zur Verfügung gestellt (Abo-Hashema *et al.* 2001). Die hohe Affinität des ACBPs sorgt zugleich dafür, dass der Acyl-CoA-bedingten Inhibierung bestimmter Enzyme, wie der ACC, der ACS und der Adenin-Nukleotid-Transferase, im Cytoplasma entgegen gewirkt wird (Rasmussen *et al.* 1993). Auch membrangebundene LCFA-CoA werden von ACBP gebunden und können aus diesen gelöst



werden (Cohen Simonsen *et al.* 2003). Darüberhinaus ist es essentiell für die Reifung von Präadipozyten zu ausdifferenzierten Fettzellen (Mandrup *et al.* 1998). Zudem führt der ACBP-Knock-out in humanen Zellen zur Apoptose, was die fundamentale Bedeutung des Proteins unterstreicht (Faergeman *et al.* 2002). Im Hinblick auf die enge Verzahnung des Fettstoffwechsels mit der Insulinsekretion und -wirkung sowie den zellulären Funktionen des ACBPs, wurde auch ein Zusammenhang zwischen der ACBP-Proteinmenge und der Insulinfreisetzung pankreatischer  $\beta$ -Zellen bzw. der Insulinresistenz peripherer Organe beschrieben (Chen *et al.* 1988; Borboni *et al.* 1991; Ostenson *et al.* 1994; Franch *et al.* 2002).

Neben der Lokalisation im Cytoplasma der Zellen, ist ACBP nahe der Kernmembran im Nukleus zu finden (Elholm *et al.* 2000). Petrescu *et al.* (2003) gelang zudem erstmalig der Nachweis einer direkten Interaktion von ACBP mit einem nukleären Transkriptionsfaktor, dem HNF-4 $\alpha$ , im Zellkern von Hepatozyten und Fibroblasten. Da LCFA-CoA für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren als Liganden fungieren, ist ACBP durch die Bereitstellung dieser wahrscheinlich auch in die Regulation der Genexpression von Zellen involviert.

Neben den Funktionen im Lipidmetabolismus besitzt ACBP eine weitere wichtige Eigenschaft, die das Protein unter dem Namen DBI (Diazepam-Bindeinhibitor) bekannt gemacht hat. Da es als Ligand an periphere Benzodiazepin-Rezeptoren (PBRs) auf der äußeren Mitochondrienmembran bindet und damit die Bindung von Diazepam an neuronale GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verhindert, wirkt ACBP/DBI als negativer, allosterischer Modulator auf die (Neuro-) Steroidsynthese (Costa *et al.* 1991). Eine ganze Familie regulatorisch aktiver Peptide mit dieser Funktion, sogenannte Endozepine, entstammen als proteolytische Prozessierungsprodukte dem DBI. Zu ihnen zählen u.a. das Octadecaneuropeptid (ODN) und das Triakontatetraneuropeptid (TTN) (Gavish *et al.* 1997). In der vorliegenden Arbeit soll der Fokus auf die Acyl-CoA-bindende Funktion des ACBP/DBI gelegt werden, weshalb auch ausschließlich der Name ACBP verwendet wird.

ACBP kommt im Gastrointestinaltrakt (Herzig *et al.* 1998) und in einer Vielzahl von Zellen und Geweben zusammen mit einem weiteren intrazellulären Fettsäurebindeprotein, dem FABP vor (Yanase *et al.* 2001), auf dessen leberspezifische Isoform im Folgenden eingegangen werden soll.



### 1.4.2. Leber-Fettsäurebindeprotein (L-FABP)

FABPs kommen ubiquitär vor und besitzen zwei Bindestellen für LCFA und LCFA-CoA, allerdings mit geringerer Affinität und Spezifität (Martin *et al.* 2003a; Martin *et al.* 2003b). Bei diesen Proteinen handelt es sich um 14-15 kDa große Polypeptide, die 20-70 % identische AS-Sequenzen aufweisen und vorrangig im Cytoplasma, aber auch im ER (Peroxisomen, Mikrosomen) und dem Nukleus lokalisiert sind. Innerhalb der Proteinfamilie der FABP unterscheidet man eine Vielzahl von Subtypen, deren Bezeichnung sich von ihrer gewebespezifischen Verteilung ableitet. Zur Zeit sind zahlreiche Isoformen bei Säugern identifiziert, die parallel vorkommen können und deren Funktionen mit dem Fettstoffwechsel assoziiert sind. Besondere Bedeutung haben die FABP daher in Zellen und Geweben mit einem hohen Lipidumsatz, in denen auch ACBP vorrangig exprimiert ist. Der Schwerpunkt soll hier auf die Leberisoform, das L-FABP, gelegt werden.

Diese Isoform des FABP wurde erstmalig aus der Rinderleber isoliert und wird vom *FABP 1*-Gen kodiert. Es handelt sich um das am stärksten exprimierte Fettsäurebindeprotein in Hepatozyten und intestinalen Enterozyten (2-5 % der cytosolischen Proteine), wobei dessen Konzentration in diesen Geweben 4-10-mal höher ist als die des ACBPs (Gossett *et al.* 1997). Wie ACBP bindet L-FABP LCFA-CoA, allerdings vorrangig gesättigte und mit geringerer Affinität (Jolly *et al.* 2000). Durch L-FABP-Knock-out bleibt die LCFA- bzw. LCFA-CoA-Poolgröße in der Leber unverändert, jedoch ändert sich die Zusammensetzung (Martin *et al.* 2003a; Martin *et al.* 2003b). L-FABP inkorporiert LCFA-CoA vorrangig in Triglyzeride und Phospholipide und erhöht die Aufnahme gesättigter LCFA unabhängig vom intrazellulären Stoffwechsel (Jolly *et al.* 2000; Atshaves *et al.* 2004). Im Gegensatz zu ACBP ist L-FABP aber nicht in der Lage LCFA-CoA vor Hydrolyse durch die mikrosomale Acyl-CoA Hydrolase zu schützen (Jolly *et al.* 1997).

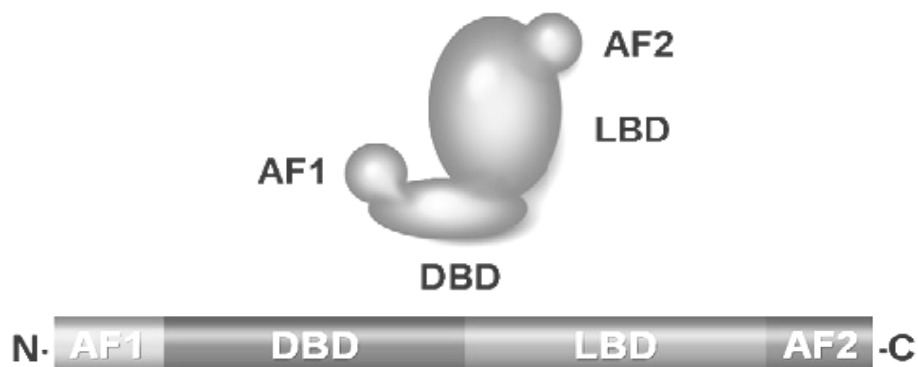
Die Expression und der Proteingehalt von L-FABP unterliegen ebenfalls metabolischen Schwankungen und steigen unter Hochfettdiät in der Leber und dem Intestinum an (Iseki *et al.* 1989; Iseki *et al.* 1990; Lin *et al.* 1994). L-FABP transportiert, wie alle FABP-Subtypen, LCFA-CoA im Cytosol und zu den Organellen (ER, Mitochondrien, Zellkern), wobei es teilweise mit diesen assoziiert ist. So lokalisierten Lawrence *et al.* (2000) L-FABP im Nukleus von Hepatozyten, wo es die PPAR- $\alpha$ -Transaktivierung von Genen beeinflusst. Zusätzlich zur PPAR- $\alpha$ -Colokalisation beschreiben Wolfrum *et al.* (2001) auch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit PPAR- $\gamma$ .

Die Transkription von L-FABP selbst wird über ein funktionales PPRE gesteuert, welches von allen PPAR gebunden wird, mit der effektivsten Induktion durch PPAR- $\alpha$  (Schachtrup *et al.* 2004).

Im Weiteren soll auf einige, fettstoffwechselassoziierte Transkriptionsfaktoren eingegangen werden, deren Ligandenverfügbarkeit im Nukleus möglicherweise über FABPs und ACBP reguliert wird.

### 1.5. Nukleäre Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren gehören zur nukleären Rezeptor-Superfamilie und können in Rezeptoren, die Hormone binden, Orphanrezeptoren („Waisenrezeptoren“) und adoptierte Orphanrezeptoren eingeteilt werden. Sie alle verfügen über eine N-terminale Aktivierungs- (AF1), eine DNA-Binde- (DBD), eine Ligandenbinde- (LBD) und eine C-terminale Aktivierungsdomäne (AF2; Abb. 3). Die Affinität für hormonelle Liganden, wie Östrogen, Testosteron, Schilddrüsenhormone und Vitamin D, liegt bei den Hormonrezeptoren im nanomolaren, bei den adoptierten Orphanrezeptoren, zu denen u.a. „Liver X Receptors“ (LXRs), PPARs und SREBPs gehören, im nanomolaren bis mikromolaren Bereich. Ihre Liganden sind Fettsäuren, LCFA-CoA, Oxysterole und andere Stoffwechselelderivate. Für die Orphanrezeptoren wurden hingegen bislang keine physiologischen Liganden identifiziert (Chawla *et al.* 2001; Alaynick 2008).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur nukleärer Transkriptionsfaktoren.** Alle Transkriptionsfaktoren der nukleären Hormonrezeptor-Superfamilie besitzen eine N- und C-terminale Aktivierungs- (AF1 & 2), eine DNA-Binde- (DBD) und eine Ligandenbindedomäne (LBD). (Alaynick 2008)

Liganden nukleärer Transkriptionsfaktoren wirken als Coaktivatoren agonistisch oder als Corepressoren antagonistisch auf die Expression verschiedener Zielgene, binden selbst aber

nicht an Promotorregionen. Sie müssen zudem bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um physiologisch wirksam zu sein. Nach Schröder *et al.* (2008) sollten sie in nanomolaren Konzentrationen im Nukleus vorkommen, dort hochaffine Bindeproteine (Transkriptionsfaktoren) besitzen, deren Konformationsänderung induzieren und die Rekrutierung weiterer Cofaktoren bzw. die Abspaltung von Repressoren bewirken.

### **1.5.1. „Peroxisome Proliferator-Activated Receptors“ (PPARs)**

PPARs gehören zu den adoptierten Orphanrezeptoren und regulieren die Expression einer Vielzahl von Genen der Reproduktion, des Stoffwechsels, der Entwicklung und der Immunantwort. Als Coaktivatoren fungieren Fettsäuren und bestimmte Fettsäurederivate, Acyl-CoAs wirken indes meist antagonistisch. PPARs können ligandenabhängig bzw. -unabhängig aktiviert werden, wobei die ligandenunabhängige Aktivierung durch Phosphorylierung über Kinasen hormonabhängig (z.B. durch die Bindung von Insulin oder dem „Epidermal Growth Factor“ (EGF) an deren spezifische Oberflächenrezeptoren) erfolgt. Weitaus häufiger werden PPARs jedoch von Liganden im Zellkern aktiviert, die sie mit einer Affinität von 2-50  $\mu\text{M}$  binden. Diese Ligandenbindung führt, entsprechend der Definition, zu einer Konformationsänderung des PPARs, der Dissoziation von Corepressorproteinen und der anschließenden Heterodimerisierung, wobei der entstehende Komplex PPRES in Promotoren von Zielgenen bindet und damit die Expressionsmaschinerie aktiviert oder reprimiert. PPRES, auch als „direct repeat 1“ (DR1) bezeichnet, sind konservierte DNA-Regionen aus einer Tandemwiederholung von sechs Nukleotiden, die durch ein Nukleotid voneinander getrennt sind (PPRES-Konsensussequenz: 5'-AACTAGGNCA A AGGTCA-3') und spezifisch über zwei Zinkfinger motive von der DNA-Bindedomäne der PPARs erkannt und gebunden wird. Die Heterodimerisierung der PPARs kann auch mit einem aktivierten, d.h. ligandengebundenen, „Retinoid X Receptor“ (RXR) oder LXR erfolgen, was zu einer Potenzierung des transkriptionellen Effektes beider Transkriptionsfaktoren führt (Alaynick 2008).

In Vertebraten unterscheidet man drei verschiedenen PPAR-Subtypen, PPAR- $\alpha$ , - $\gamma$  und - $\delta$ .

#### **1.5.1.1. PPAR- $\alpha$**

PPAR- $\alpha$  ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der auf dem humanen Chromosom 22 und auf dem Chromosom 6 der Ratte kodiert ist. PPAR- $\alpha$  konnte bislang in vielen Geweben und Organen von Säugern nachgewiesen werden, ist aber am prominentesten in der Leber, den

Skelettmuskeln, in Kardiomyozyten und Enterozyten (Ferre 2004). Dort steuert dieser Transkriptionsfaktor die Expression von membrangebundenen (z.B. LPL, ACS) und intrazellulären (z.B. FABP, ACBP) Fettsäuretransportern sowie von peroxisomalen, mikrosomalen und mitochondrialen, oxidativen Genen (z.B. Acyl-CoA Oxidase und CPT-1). Im Nukleus werden v.a. PUFA mit hoher Affinität von PPAR- $\alpha$  gebunden und vermitteln die lipolytische Genexpression. Deren Serumkonzentration ist im Fastenzustand und unter Stress deutlich erhöht, was zur Transaktivierung von PPAR- $\alpha$ -Zielgenen führt. In Hepatozyten ist die PPAR- $\alpha$ -Expression zudem hormonabhängig negativ durch Insulin und positiv durch Glukokortikoide beeinflussbar (Bernal-Mizrachi *et al.* 2003). Durch die Erhöhung der Fettsäureaufnahme in die Zellen und durch die Induktion lipolytischer Gene wirkt PPAR- $\alpha$  reduzierend auf die zirkulierende Lipidkonzentration. Glukose, die ebenfalls von PPAR- $\alpha$  gebunden wird, verringert die PPAR- $\alpha$ -Interaktion mit Fettsäuren, wirkt aber dennoch transaktivierend auf lipolytische Gene (Hostetler *et al.* 2008). In  $\beta$ -Zellen potenzieren PPAR- $\alpha$ /RXR $\alpha$ -Heterodimere die GSIS (Ravnskjaer *et al.* 2005). Im Nukleus von Hepatozyten wurde zudem eine direkte Interaktion von PPAR- $\alpha$  mit dem Fettsäurebindeprotein L-FABP beschrieben, die ligandenunabhängig stattfindet (Wolfrum *et al.* 2001). PPAR- $\alpha$ -Liganden sind neben Fettsäuren, Glukose und deren Derivaten auch LCFA-CoAs, wobei diese agonistisch oder antagonistisch wirken und die Transaktivierung von Genen aktivieren oder reprimieren.

Neben diesen Funktionen im Lipidstoffwechsel, verhindert PPAR- $\alpha$  Entzündungsreaktionen durch die reduzierte Freisetzung proinflammatorischer Moleküle, wie Interleukin 6 und von Prostaglandinen (Stienstra *et al.* 2007a; Stienstra *et al.* 2007b). Daher werden künstliche PPAR- $\alpha$ -Agonisten, wie Fibrate, aufgrund ihrer lipidreduzierenden und antiinflammatorischen Wirkung zur Behandlung der Hyperglyzeridämie beim Metabolischen Syndrom eingesetzt.

#### **1.5.1.2. PPAR- $\gamma$**

Von PPAR- $\gamma$  existieren zwei Isoformen, die durch alternative Exonnutzung entstehen und neben PPAR- $\gamma$ 1, das um 28 (human) bzw. 30 (Nager) AS N-terminal längere PPAR- $\gamma$ 2 beinhalten (Desvergne *et al.* 1999). Sie sind auf dem humanen Chromosom 3 bzw. dem Chromosom 4 der Ratte kodiert. Beide Isoformen werden vorrangig in den Adipozyten des Fettgewebes und, in geringerer Menge, auch in Makrophagen/Monozyten und Muskelzellen exprimiert. Als natürliche Aktivatoren für PPAR- $\gamma$  fungieren PUFA sowie Kortikosteroide

und auch Insulin. Corepressoren, wie der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und EGF, wirken ligandenunabhängig über phosphorylierende Kinasen und inhibieren die transkriptionelle Aktivität von PPAR- $\gamma$  (Raso *et al.* 2009).

PPAR- $\gamma$ , genauer PPAR- $\gamma$ 2, ist zugleich der zentrale adipogene Transkriptionsfaktor, da er während der Adipozytendifferenzierung die Expression von lipogenen Genen, wie ACBP, FABP, LPL und ACS, induziert und gleichzeitig antimitotisch wirkt (Tang *et al.* 2005; Zieleniak *et al.* 2008). In Hepatozyten und Muskelzellen erhöht sich durch PPAR- $\gamma$  die Glukoseaufnahme durch vermehrte GLUT-Expression. Gleichzeitig werden glykolytische, lipogene Gene aktiviert sowie die Glukoneogenese und die Lipolyse inhibiert. Aufgrund dieser insulinsensitivierenden Wirkung sind PPAR- $\gamma$ -Agonisten, sogenannte Thiazolidindione, bei der Behandlung von Adipositas und dem Metabolischen Syndrom im Einsatz. Zudem wirkt PPAR- $\gamma$ , wie auch PPAR- $\alpha$ , antiinflammatorisch, was die Wirksamkeit dieser Präparate unterstützt (Jay *et al.* 2007; Todd *et al.* 2007).

#### 1.5.1.3. PPAR- $\delta$

Dieser nukleäre Transkriptionsfaktor wird auch als PPAR- $\beta$  bezeichnet und ist auf dem humanen Chromosom 6 sowie auf dem Ratten-Chromosom 20 lokalisiert. PPAR- $\delta$  kommt ubiquitär in fast allen Zellen und Geweben der Säuger vor. Dabei ist es relativ gering in Hepatozyten und Adipozyten exprimiert, aber stellt die vorrangige Isoform im zentralen Nervensystem (ZNS) und dem Gehirn dar (Moreno *et al.* 2004). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens sind spezifische Aussagen zur Funktion schwieriger. Diese scheinen allerdings denen von PPAR- $\alpha$  stärker als denen von PPAR- $\gamma$  zu ähneln, da auch PPAR- $\delta$ , wie PPAR- $\alpha$  im peripheren Muskelgewebe und *in vitro* Gene des „energy uncouplings“ und der  $\beta$ -Oxidation aktiviert (Hondares *et al.* 2007). Eine wesentliche Rolle spielt PPAR- $\delta$  im kardiären Metabolismus (Burkart *et al.* 2007; Jucker *et al.* 2007). Zudem ist seine Beteiligung an einer Reihe weiterer zellulärer Prozesse, wie der Thermogenese, der Adipozytendifferenzierung und bei Entzündungsreaktionen beschrieben, wobei die genauen Funktionen teils noch nicht eindeutig geklärt werden konnten. PPAR- $\delta$  bindet, wie PPAR- $\alpha$  und - $\gamma$ , v.a. PUFA sowie deren Ester und zusätzlich Prostaglandine im Nukleus und wird von diesen aktiviert (Desvergne *et al.* 1999).

### 1.5.2. „Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c“ (SREBP-1c)

SREBP-1c gehört zur Familie der „Sterol Regulatory Element-Binding Proteins“ (SREBPs) und damit zu den membrangebundenen Transkriptionsfaktoren. Man unterscheidet die drei Isoformen SREBP-1a, -1c und -2. SREBP-1a und -1c werden durch ein aus zwei Exonen bestehendes Gen kodiert und entstehen durch alternative Promotorverwendung des Exons 1. Für SREBP-2 existiert ein eigenes Gen. SREBP-2 spielt eine zentrale Rolle im Cholesterinmetabolismus von Zellen (Shimano 2002; Shimano 2009). Auch beide SREBP-1-Isoformen sind an der Regulation des intrazellulären Cholesterin- und Fettstoffwechsels beteiligt, wobei SREBP-1c, ebenfalls unter der Bezeichnung „Adipocyte Differentiation and Determination factor-1“ (ADD-1) bekannt, hauptsächlich im Fettgewebe und der Leber exprimiert wird. SREBP-1a kommt hingegen vorrangig in nicht-hepatischen Geweben vor, weshalb für diese Arbeit insbesondere SREBP-1c interessant ist.

Der SREBP-1c-Promotor enthält Bindemotive für LXR, NF- $\kappa$ B, Sp-1 und SREBP-1c (Jump *et al.* 2005). Oxysterole und Insulin wirken als natürliche Agonisten auf die Expression. So aktivieren z.B. Oxysterole ligandenabhängig LXRs, die daraufhin an die Erkennungssequenz im SREBP-1-Promotor binden und die Expression von SREBP-1a und -1c induzieren. PUFA, die mit den Oxysterolen um die Bindung durch LXRs konkurrieren, und gleichzeitig ein Endprodukt der SREBP-1-vermittelten Transaktivierung darstellen, wirken inhibierend. Insulin hingegen stimuliert die SREBP-1c-Expression ligandenunabhängig über Kinasekaskaden und über die Reduktion von Corepressoren (Cagen *et al.* 2005).

SREBPs werden als inaktive ER-membrangebundene Vorstufen, sogenanntes pSREBP, synthetisiert und durch Bindung des „SREBP-Cleavage Activating Proteins“ (SCAP) in den Golgi-Apparat transportiert. Nach proteolytischer Prozessierung transloziert das Protein mittels Importin- $\beta$  als aktives N-terminales Fragment, das nSREBP, in den Nukleus und bindet dort an SRE-Sequenzen in Promotorregionen von lipogenen Genen (Yellaturu *et al.* 2009). Die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und Sp-1 wirken dabei als Coaktivatoren, auch auf die Expression von SREBP-1c. SREBP-1c ist also in der Lage, seine eigene Expression zu potenzieren und die Fettsäuresynthese in den Zellen zu forcieren. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie deren aktivierte CoA-Ester, wirken neben der kompetitiven Hemmung von LXRs inhibierend auf die Reifung des pSREBPs zu nSREBP und stimulieren die Proteolyse (Ou *et al.* 2001; Chen *et al.* 2004). Die SREBP-1c-Expression unterliegt demnach einer Feedback-Regulation.

### 1.5.3. „Liver X Receptor- $\alpha$ “ (LXR- $\alpha$ )

LXRs sind, wie die PPARs, Mitglieder der adoptierten Orphanrezeptor-Familie und kommen relativ weit verbreitet vor. Es existieren zwei Isoformen, von denen LXR- $\alpha$  vorrangig im Fettgewebe, der Leber und in Makrophagen zu finden ist, wohingegen LXR- $\beta$  ubiquitär exprimiert wird (Wojcicka *et al.* 2007). LXRs werden durch Oxysterole und LCFAs aktiviert und regulieren die Expression von hepatischen Gallensäuregenen sowie von Genen des Fett- und Cholesterinstoffwechsels (z.B. SREBP-1c) und der Energieproduktion (z.B. ABCA1; Fu *et al.* 2001; Hozoji *et al.* 2008)). Ihre transkriptionelle Aktivität üben sie durch die Bindung von „LXR Response Elements“ (LXREs oder auch DR 4) nach obligater Heterodimerisierung mit aktivierten RXRs aus. Da sie mit RXRs interagieren stellen sie Konkurrenten der PPARs dar (Yoshikawa *et al.* 2003). Ohne gebundene Liganden fungieren die LXR/RXR-Heterodimere als Repressoren.

Die Expression der LXRs wird über funktionale PPRE und LXRE in ihrer Promotorregion gesteuert (Li *et al.* 2002; Tobin *et al.* 2002).

### 1.5.4. „PPAR- $\gamma$ Coactivator-1 $\alpha$ “ (PGC-1 $\alpha$ )

Eine weitere Klasse nukleärer Transkriptionsfaktoren, welche vorrangig die mitochondriale Biogenese und Respiration steuern, sind die „PPAR- $\gamma$  coactivators“ (PGC-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ ). Ihre Aktivität ist daher in stoffwechselaktiven Geweben und Organen, wie Leber, Herz, Muskel und auch im ZNS, am höchsten, wobei PGC-1 $\alpha$  für diese Organe typische Prozesse (z.B. Thermogenese, Glukoneogenese und  $\beta$ -Oxidation) steuert (Benton *et al.* 2008). So steigt die Expression von PGC-1 $\alpha$  in gleichem Maße wie die von HNF-4 $\alpha$  während der Reifung von Hepatozyten an und erhöht die Expression der Glukose-6-Phosphatase, einem Enzym, welches in ausdifferenzierten Hepatozyten die Glukoneogenese steuert (Beaudry *et al.* 2006). In den pankreatischen  $\beta$ -Zellen inhibiert PGC-1 $\alpha$  die GSIS (Yoon *et al.* 2003) u.a. durch Aktivierung der Genexpression des „Uncoupling Proteins 2“ (UCP2). UCP2 ist ein negativer Modulator der GSIS, da es den Protonenrückfluss in die Mitochondrienmatrix und damit der ATP-Synthese entgegen wirkt, die andernfalls die Insulinsekretion antreiben würde (Oberkofler *et al.* 2006).

PGC-1 $\alpha$  selbst wird durch Phosphorylierung über Kinasen aktiviert (MAPK), da seine phosphorylierte Form nicht durch den Corepressor gebunden werden kann. Zudem ist die Expression insulin- bzw. glucagonabhängig und wird damit vom Ernährungszustand beeinflusst (Corton *et al.* 2005). Auch Sirtuin 1 (SIRT-1) aktiviert PGC-1 $\alpha$ , allerdings durch



Deacetylierung, und forciert damit dessen transaktivierende Wirkung auf  $\beta$ -oxidative und gluconeogenetische Gene (Rodgers *et al.* 2008).

Obwohl PGCs als PPAR- $\gamma$ -Coaktivatoren bezeichnet wurden, interagieren sie über ein N-terminales Bindemotiv mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. auch mit PPAR- $\alpha$  und HNF-4 $\alpha$  (Puigserver 2005; Ponugoti *et al.* 2007). Die exakten Mechanismen, wie PGC-1 $\alpha$  die Expression von Genen steuert sind bislang erst unzureichend verstanden und momentan Gegenstand intensiver Forschung.

### 1.5.5. „Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$ “ (HNF-4 $\alpha$ )

Bei HNF-4 $\alpha$  handelt es sich um einen nukleären Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Hepatozyten spielt und die Expression von Genen des intrazellulären (Apo-) Lipidtransports und -stoffwechsels steuert (Li *et al.* 2000; Naiki *et al.* 2002; Crestani *et al.* 2004; Prieur *et al.* 2005). HNF-4 $\alpha$  gehört, entgegen den PPARs, zur Gruppe der adoptierten Orphanrezeptoren und ist Mitglied einer Transkriptionsfaktorfamilie, die aus sechs Subtypen (HNF-1 bis -6) besteht und innerhalb einer Klasse mehrere Isoformen aufweisen kann (z.B. HNF-4 $\alpha$  und - $\gamma$ ). Die HNFs sind an einer Reihe stoffwechselphysiologischer Prozesse in metabolisch aktiven Organen und Geweben beteiligt, beeinflussen aber auch die Aktivität von Genen der Entwicklung, des Wachstums und der Fortpflanzung (Vecchini *et al.* 2005; Kyrmizi *et al.* 2006). Mutationen in HNF-Genen führen zu speziellen Formen des Diabetes mellitus, dem „Maturity-Onset Diabetes of the Young“ (MODY). MODY1 zum Beispiel, welchem eine Mutation im HNF-4 $\alpha$ -Gen zugrunde liegt, ist charakterisiert durch eine beeinträchtigte GSIS und belegt damit die wichtige Funktion dieses Transkriptionsfaktors in pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Miura *et al.* 2006). Zudem ist HNF-4 $\alpha$  in der Leber, der Niere und dem Intestinum exprimiert und hormonell reguliert (Oyadomari *et al.* 2000).

Im Gegensatz zu den PPARs bindet HNF-4 $\alpha$  als Homodimer nach Aktivierung durch einen spezifischen Liganden an die entsprechende Konsensussequenz an die DNA. Bei dieser handelt es sich um das DR 1-Motiv, welches ebenfalls von RXR/PPAR-Heterodimeren gebunden wird und kompetitive Wechselwirkungen dieser nukleären Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich macht.

Die transkriptionelle Aktivität von HNF-4 $\alpha$  wird durch die Bindung von LCFAs und LCFA-CoAs gesteuert und ist dabei von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad abhängig (Hertz *et al.* 1998; Hertz *et al.* 2005). Antagonistisch auf HNF-4 $\alpha$  wirken ungesättigte LCFA-CoAs,



wie C16:1 und C18:3, deren Konzentration im Nukleus von Hepatozyten am höchsten ist (Elholm *et al.* 2000), wohingegen durch gesättigte LCFA-CoAs die transkriptionelle Aktivität ansteigt (Hertz *et al.* 1998). In Hepatozyten beschreiben Petrescu *et al.* (2003) zudem eine direkte Interaktion zwischen ACBP und HNF-4 $\alpha$ , wobei die durch ACBP vorrangig gebundenen gesättigten LCFA-CoAs C14 und C16 agonistisch auf HNF-4 $\alpha$  wirken und die Transaktivierung von Zielgenen, wie UCP2, GLUT-2 und der Pyruvatkinase, erhöhen (Hertz *et al.* 1998; Huang *et al.* 2005; Schroeder *et al.* 2008).

### 1.5.6. Sirtuin 1 (SIRT-1)

Im Gegensatz zu den bislang aufgeführten Transkriptionsfaktoren, handelt es sich bei SIRT-1 um eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse in Abhängigkeit von metabolischen Gegebenheiten steuert. Das SIRT-1 der Säuger ist das Ortholog des „Silent Information Regulator 2“ (SIR2) der niederen Organismen. Für dieses werden lebensverlängernde Funktionen, und damit generell eine Beteiligung an Alterungsprozessen, bei reduzierter Kalorienzufuhr beschrieben (Kennedy *et al.* 2005). Insgesamt wurden beim Menschen bislang sieben Gene, die für SIR2-ähnliche Proteine kodieren, beschrieben. Diese nennt man Sirtuine (Frye 1999; Vakhrusheva *et al.* 2008). Unter ihnen ist SIRT-1 mit seiner Funktion als NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase dem SIR2 am ähnlichsten. Zudem ist es ubiquitär exprimiert und im Fastenzustand sowie durch kalorische Restriktion bei höheren Organismen ebenfalls induziert.

SIRT-1 deacetyliert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren und beeinflusst dadurch inflammatorische wie stoffwechselphysiologische Prozesse. Zum Beispiel deacetyliert SIRT-1 in der Leber und in Muskelzellen PGC-1 $\alpha$ , aktiviert diesen dadurch und erhöht die Expression von gluconeogenetischen Genen (Rodgers *et al.* 2005) und Genen der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation (Gerhart-Hines *et al.* 2007). Gleichzeitig kann SIRT-1 auch als Corepressor auf die Transkription wirken, z.B. durch Deacetylierung von p53 oder indem es die Interaktion von PPAR- $\gamma$  mit dessen Corepressor NcoR unterstützt (Yang *et al.* 2006).

Neben seiner nukleären Funktion besitzt SIRT-1 auch eine cytoplasmatische Enzymaktivität. So deacetyliert und aktiviert es spezifisch die ACS, die die Aktivierung von Fettsäuren nach deren Import in die Zellen katalysiert (Hallows *et al.* 2006), und gewährleistet damit gleichzeitig die Substratverfügbarkeit für die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation.

Die Beteiligung von zwei Sirtuinen, SIRT-1 und -4, an der Insulinsekretion und der  $\beta$ -Zell-Funktion wurde ebenfalls beschrieben. So haben  $\beta$ -zellspezifische, SIRT-1 überexprimie-

rende Mäuse eine erhöhte GSIS und *in vivo* eine höhere Glukosetoleranz (Ramsey *et al.* 2008). Hingegen zeigen Knock-out-Mäuse und  $\beta$ -Zelllinien, in denen durch siRNA die SIRT-1-Expression verringert ist, eine reduzierte Insulinsekretion (Bordone *et al.* 2006; Bordone *et al.* 2007).

Die Expression und die Proteinkonzentration von SIRT-1 selbst erhöht sich aufgrund seiner Funktionen unter reduzierter Kalorienzufuhr, dessen enzymatische Aktivität wird aber auch durch Veränderungen des intrazellulären  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnisses gesteuert (Rodgers *et al.* 2008).

Interaktionen zwischen Metaboliten des Fett- und Glukosestoffwechsels, deren Derivaten, Hormonen, intrazellulären Fettsäurebindeproteinen und nukleären Transkriptionsfaktoren sind demnach vielfach in der Literatur beschrieben. Dies unterstreicht die potentielle Funktion von ACBP über die Bereitstellung agonistisch bzw. antagonistisch wirkender Liganden, neben cytoplasmatischen Transportaufgaben, auch genregulatorisch von Bedeutung zu sein.

## **2. Fragestellung und Ziele der Arbeit**

Das Metabolische Syndrom ist durch erhöhte Nüchtern glukosewerte, Hypertonie, Hyperlipidämie und abdominale Adipositas gekennzeichnet und kann unbehandelt einen Diabetes mellitus Typ 2 auslösen. Durch die Insulinresistenz der Zielorgane kommt es bei dieser Erkrankung zur zunehmenden funktionellen Erschöpfung und fortschreitenden Apoptose der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, die langfristig zum Insulinmangel mit einhergehender, charakteristischer Hyperglykämie führen. Neben der gestörten Insulinsekretion ist auch der gesamte Fettstoffwechsel beeinträchtigt. Die auftretende Hyperlipidämie, der hohe Gehalt an Plasmatriglyzeriden und FFA im Blut, führt zur Akkumulation von Lipiden im peripheren Muskel-, Leber- und Fettgewebe, was wiederum für die Insulinresistenz dieser Organe verantwortlich gemacht wird. Gleichzeitig verstärkt die Lipotoxizität die Dysfunktion und Apoptose der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und bedingt deren langfristig verringerte Insulinsekretion.

Der dauerhafte Konsum hochkalorischer, fetthaltiger Nahrung, sogenannter „Western Style“-Diäten, führt zu solch einem chronischen Anstieg der zirkulierenden Lipide und damit der intrazellulären Acyl-CoAs, der aktivierten Form der Fettsäuren, in den Zellen.

Acyl-CoAs werden im Cytoplasma entsprechend ihrer Länge und ihres Sättigungsgrades von intrazellulären Fettsäurebindeproteinen, wie ACBP und FABPs, gebunden und transportiert. Sie erfüllen eine Reihe wichtiger Funktionen und fungieren als Liganden nukleärer Transkriptionsfaktoren. Neuere Forschungen haben ergeben, dass LCFA und LCFA-CoA mit Hilfe von Fettsäurebindeproteinen in den Kern transportiert werden und dort durch Interaktion mit PPARs, LXRs, HNFs sowie weiteren Transkriptionsfaktoren über ein kompliziertes Netzwerk die Genexpression in den Zellen steuern. Diese ist nicht nur vom Ernährungszustand bzw. den Stoffwechselederivaten und Hormonen, sondern auch vom Gewebe und den dort exprimierten Transkriptions- und Cofaktoren abhängig.

Um die Bedeutung des Acyl-CoA Bindeproteins in diesem komplexen Netzwerk genauer zu untersuchen, wurden transgene, ACBP-überexprimierende Ratten und Mäuse generiert und charakterisiert. Die Tiere haben eine stabile ACBP-Überexpression (u.a. in Leber, Fettgewebe und Hypothalamus), sind lebens- und fortpflanzungsfähig und unter Normaldiät ohne auffälligen Phänotyp. Allerdings zeigen sie in Abhängigkeit vom Fütterungszustand in der Leber und dem Fettgewebe veränderte Acyl-CoA-Muster und deutliche Unterschiede in der Expression von PPARs und SREBP-1c (Oikari *et al.* 2008b). Durch ernährungsphysiologische

Modulationen (Fütterung von MCFA- vs. LCFA-angereicherten Diäten) lassen sich bei transgenen Ratten zudem geringere Plasmaglukose- und -insulinspiegel induzieren (Oikari *et al.* 2008a). Diese Veränderungen weisen auf stoffwechselabhängige, (auto-)regulatorische Mechanismen und einen Einfluss des ACBPs auf die Insulinsekretion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen bzw. auf die Insulinsensitivität der peripheren Organe hin.

Daher bestand das erste Ziel dieser Arbeit darin, in einer Hochfettdiät-Studie die bislang unter Normal- und MCFA-angereicherter Diät beschriebenen stoffwechselphysiologischen Veränderungen transgener, ACBP-überexprimierender Ratten zu verifizieren. Zudem sollte das Augenmerk auf transkriptionelle Veränderungen fettstoffwechselassoziierter nukleärer Transkriptionsfaktoren in der Leber der Tiere gelegt werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit stellte die Generierung einer stabil, ACBP-überexprimierenden IN-1E-Zelllinie dar, durch die Rückschlüsse auf die zellulären Zusammenhänge zwischen dem Fettsäurebindeprotein ACBP und der GSIS pankreatischer  $\beta$ -Zellen unter basalen und stimulierenden Bedingungen ermöglicht werden sollten. Gleichzeitig sollte mit Hilfe dieses *in vitro*-Modell die Expression nukleärer Transkriptionsfaktoren und deren Beeinflussung durch die ACBP-Überexpression analysiert werden.

### **3. Material & Methoden**

#### **3.1. Tiere und Haltung**

Die Tierversuche für die im Folgenden beschriebenen Studien wurden am A.I. Virtanen Institute (AIVI) in Kuopio, Finnland, durchgeführt. Die transgene, ACBP-überexprimierende Rattenlinie UKUR 48 war durch Mikroinjektion des ACBP-Gens von *Mus musculus* (GenBank accession number AF220221; 11,1 kbp) in den Pronukleus der Zygoten von Wistar-Ratten generiert worden (Siiskonen *et al.* 2007). Das Mausgen ist homolog zu dem der Ratte und führt zu einer stabilen ACBP-Überexpression in den Geweben der transgenen Tiere. Diese sind lebens- und fortpflanzungsfähig und wurden im Tierstall der Universität von Kuopio unter kontrollierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur (RT):  $20 \pm 1$  °C; rel. Luftfeuchtigkeit: 50-60 %; Hell-Dunkel-Zyklus: 12 h). Die Versuche waren durch das „Animal Care & Use Committee of the University of Kuopio“ und die Regierung des Bezirks „Savo“ genehmigt und entsprechen den Richtlinien der „European Community Council Directives 86/609/EEC“.

##### **3.1.1. Fütterung und Diäten**

Für die „High Fat Diet“ (HFD)-Studie wurden zwei Monate alte männliche, transgene und Wildtyp-Ratten randomisiert in vier Gruppen mit je sieben Tieren eingeteilt, die für einen Zeitraum von vier Wochen entweder die Kontrolldiät (D12450B) oder die HFD (D12451; Research Diets Inc., USA) erhielten. In der HFD stammen die Kalorien zu 45 % aus Fett, zu 35 % aus Kohlenhydraten und zu 20 % aus Protein. Bei der Kontrolldiät handelt es sich um eine „Low Fat Diet“ (LFD), die zu 10 % aus Fett, 70 % aus Kohlenhydraten und 20 % aus Protein besteht. Die exakte Zusammensetzung beider Diäten befindet sich im Anhang.

##### **3.1.2. Glukosetoleranztest und Probennahme**

Im Anschluss an die einmonatige Fütterung mit LFD oder HFD wurde ein Glukosetoleranztest (GTT) mit intraperitonealer (i.p.) Applikation von 1 g Glukose/kg Körpergewicht durchgeführt. Die Tiere hatten 16 h Nahrungskarenz. Für die Bestimmung der stoffwechselfysiologischen Parameter Glukose und Insulin wurde vor Beginn des GTT (0 min) und zu den angegebenen Zeitpunkten Blut aus der Beinvene der Ratten mit heparinisierten Glaskapillaren entnommen, in 0,5-ml-Röhrchen überführt, bei 1000 Upm abzentrifugiert und der Plasmaüberstand bis zu den Messungen bei -80 °C gelagert. Für die Bestimmung des Triglyzerid- und Cholesteringehalts wurde auf die gleiche Art und Weise

Plasma gewonnen und eingefroren. Diese Werte spiegeln allerdings die stoffwechselphysiologischen Konzentrationen im gefütterten Zustand wider. Die Blutproben für die Messung der freien Fettsäuren wurden zum Zeitpunkt „0 min“ nach 16 h Fastenperiode ohne Heparinzusatz genommen, abzentrifugiert und das Serum bei -80 °C gelagert.

### **3.1.3. Gewebeentnahme**

Von den durch Enthauptung getöteten Tieren wurden Lebergewebeproben genommen. Für die RNA-Isolierung und anschließende real-time RT-PCRs (siehe 3.5.2 und 3.12.2) wurden diese in je 300 µl RNAlater in 1,5-ml-Eppendorftubes gegeben und bei -80 °C gelagert. Für die Proteingewinnung (siehe 3.8.2) in 2-ml-Eppendorftubes direkt in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

## **3.2. Bestimmung stoffwechselphysiologischer Parameter**

### **3.2.1. Glukosemessung**

Die Glukosebestimmung erfolgte mit einem optisch-enzymatischen UV-Test nach O. Warburg aus Plasmaproben. Dabei wird die NADPH-Bildung durch eine Glukose-Hexokinase-Reaktion photometrisch bei 334 nm mit einem EPOS 5060 (Eppendorf) gemessen. Als interner Standard diente „Seronorm“ (5,2 mmol Glukose/l; Roche).

### **3.2.2. Insulinmessung**

Die Insulinkonzentration im Plasma der Tiere sowie in den Überständen aus den INS-1E-Zellkulturexperimenten wurde mit Hilfe des „Rat Insulin ELISA Kit“ (Crystal Chem) photometrisch durch Messung der Absorption bei 492 gegen 630 nm quantitativ über eine Standardkurve in ng/ml mit Hilfe eines ELISA-Plattenlesegerätes (DYNEX Technologies) bestimmt. Der ELISA besteht aus einer mit Maus-Anti-Insulin-Antikörper (monoklonal) beschichteten 96-well-Platte, an die das Insulin in den Proben und anschließend ein Meerschweinchen-Anti-Insulin-Antikörper bindet. Dieser ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die nach Zugabe des Substrats die Bildung eines Farbkomplexes initiiert. Verwendet wurde das Protokoll für Serum- und Plasmaproben nach Angaben des Herstellers.

Die INS-1E-Überstände, der mit 3 mM Glukose stimulierten Zellen, wurden für die Messung 1:10, die der mit 15 mM stimulierten Zellen, 1:30 mit dem Puffer D2 des Kits verdünnt.

### **3.2.3. Bestimmung freier Fettsäuren**

Der Gehalt an freien, nicht veresterten Fettsäuren (NEFA/FFA) im Serum der Tiere wurde enzymatisch-kolorimetrisch unter Verwendung des „NEFA C 50t Kits“ (Wako) in mmol/l durch photometrische Messung bei 550 nm bestimmt. Als Standard diente Ölsäure mit einer Konzentration von 1,0 mmol/l.

### **3.2.4. Triglyzerid- und Cholesterinmessung**

Die Bestimmung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma der Ratten erfolgte mittels „Triglyzeride-“ bzw. „Cholesterin Ecoline S+“-Reagenz in mmol/l optisch-enzymatisch bei 550 (Triglyzeride) bzw. 490 nm (Cholesterin). „Konelab/DPC T Series sCal“ wurde in beiden Fällen für die Generierung der Standardkurven eingesetzt.

## **3.3. Zelllinien**

### **3.3.1. INS-1E**

Bei der INS-1E-Zelllinie handelt es sich um Ratten-Insulinom-Tumorzellen, die eine vergleichbare Insulinsekretion wie pankreatische  $\beta$ -Zellen nach Glukosestimulation zeigen. Diese Zelllinie ist eine in Bezug auf ihre Insulinproduktion verbesserte Variante der INS-1-Zellen. Sie wurde mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Pierre Mächler vom Institut für Zellphysiologie und Metabolismus des „Centre Médical Universitaire“, Genf, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen adhärent und erhalten ihre Charakteristika über 100 Passagen (p) lang, was einem Zeitraum von mehr als zwei Jahren entspricht (Merglen *et al.* 2004). Für die transienten Transfektionsexperimente (siehe 3.10) wurden Zellen mit einer Passagenzahl von 60-85 verwendet.

## **3.4. Zellkultur**

Frische Zellen wurden bei RT ca. 5 min aufgetaut, in ein 50-ml-Röhrchen überführt und durch vorsichtige Zugabe von 10 ml Medium resuspendiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 1000 Upm wurde das DMSO-haltige Medium entfernt, die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in einer T75-Kulturflasche ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im entsprechenden Medium (siehe 3.4.1) bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Athmosphäre im Brutschrank.

Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt und nach 5-7 Tagen, in Abhängigkeit von Zelldichte und der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, die Zellen passagiert. Dazu

wurden sie mit 15 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml 0,1%igem Trypsin-EDTA behandelt. Durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium wurde die enzymatische Proteolyse gestoppt. Nach 10 min Zentrifugation bei 1000 Upm wurde das trypsinhaltige Medium entfernt, die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in T75-Kulturflaschen überführt. Zellen für Experimente, wurden in 6- oder 12-well-Platten ausgesät (siehe 3.10). Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung eines Aliquots der nach Zentrifugation resuspendierten Zellen.

Für die Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen einer T75-Kulturflasche trypsinisiert, abzentrifugiert und in 1 ml FCS plus 10 % DMSO aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 1,5-ml-Kryogefäß überführt, zunächst für 24 h in einem „Freezing Container“ bei -80 °C gelagert und abschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.4.1. INS-1E-Medium**

Die INS-1E-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 11,1 mM Glukose kultiviert, welches zusätzlich 10 % FCS, 10 mM Hepes, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol sowie 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin enthält.

Für die stabile Transfektion wurde dem Medium zusätzlich Geneticin (G418) in Konzentrationen von 300 oder 100 µg/ml zugesetzt (siehe 3.10.2.4).

### **3.4.2. Insulinsekretionsexperimente**

Im Kulturmedium der INS-1E-Zellen sind 11,1 mM Glukose enthalten (siehe 3.4.1), daher war für die Analyse der glukoseinduzierten Insulinfreisetzung eine vorangehende Inkubation in physiologischem, glukosefreiem Puffer notwendig. Verwendet wurde Krebs-Ringer-Bicarbonat-Hepes (KRBH)-Puffer. Mit diesem wurden die INS-1E-Zellen zweimal gewaschen, 1 h inkubiert und anschließend für 60 min mit je 1 ml KRBH-Puffer stimuliert, der D(+) Glukose in einer Konzentration von 3 oder 15 mM enthielt. Die Zellen blieben für die Dauer des Insulinsekretionsexperimentes im Inkubator bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Athmosphäre.

### **3.4.3. Probennahme und Lagerung**

Im Anschluss an die 1 h Inkubation wurden die Überstände abgenommen, in 1,5-ml-Eppendorftubes überführt und auf Eis gelagert. Durch eine 5 min Zentrifugation bei



13000 Upm und 4 °C wurden die enthaltenen Zellen pelletiert, die Überstände in sterile Tubes überführt und bis zur Analyse im Insulin-ELISA (siehe 3.2.2) bei -20 °C gelagert. Für die RNA-Isolierung aus INS-1E-Zellen wurde wie unter 3.5.1 beschrieben verfahren. Die Proteingewinnung aus den Zellen folgte dem Protokoll unter Punkt 3.8.1.

### **3.5. RNA-Isolierung**

Das Arbeiten mit RNA und daher auch deren Isolierung erfordert aufgrund der hohen Stabilität und dem ubiquitären Vorkommen von RNasen besondere Sorgfalt. Daher wurde auf Sterilität der Lösungen und Materialien geachtet, die zusätzlich mit Hilfe von DEPC-Wasser von RNase-Kontaminationen befreit worden waren.

Die RNA-Isolierung, sowohl aus Geweben wie auch aus Zellen, erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach modifiziertem Herstellerprotokoll (siehe 3.5.1 und 3.5.2).

#### **3.5.1. RNA-Isolierung aus Zellen**

Zellen aus siRNA- und Plasmid-Transfektionsexperimenten (siehe 3.10) wurden nach Entfernen der Überstände direkt durch Zugabe von RLT-Puffer (versetzt mit 3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) lysiert. Die Zellysate wurden über QiaShredder® gegeben, um genomisches Material von zellulären Bestandteilen zu trennen. Die Zugabe von 70%igem Ethanol zum Filtrat sorgte für die Fällung der enthaltenen Nukleinsäuren und bereitete diese für die Bindung an die Silikagelmembranen der „RNeasy Mini“-Säulen® vor. Nach einem Waschschrift mit proteolytischem RW1-Puffer® wurde die genomische DNA durch DNase-Verdau („RNase-Free DNase Set“; Qiagen) aus den Proben entfernt. Nach weiteren Waschschriften mit RW1- und RPE-Puffern® konnte die RNA in 50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert werden.

#### **3.5.2. RNA-Isolierung aus Geweben**

Die RNA aus den bei -80 °C in „RNAlater“ (Qiagen) gelagerten Lebergewebeproben konnte mit demselben Protokoll, wie es für die Zellen verwendet wurde (siehe 3.5.1), isoliert werden.

Der erste Schritt bestand allerdings in der Homogenisierung der Gewebe. Diese erfolgte mechanisch mit dem Ultraturrax in je 500  $\mu$ l RLT-Lysispuffer, welcher mit 3%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt worden war bei einer Geschwindigkeit von max. 5000 Upm für 1 min bei

RT. Die Leberhomogenate wurden direkt über QiaShredder gegeben und wie unter 3.5.1 beschrieben weiter behandelt.

### 3.6. Verwendete Plasmidvektoren

#### 3.6.1. pBluescript SK(+)

Grundlage für die Generierung des ACBP-überexprimierenden Plasmids, welches für die stabile Transfektion in die INS-1E-Zellen verwendet wurde (siehe 3.10.2.4), bildete die ACBP-mRNA-Sequenz von *Rattus norvegicus*, welche als cDNA-Insert im prokaryotischen Expressionsvektor pBluescript SK(+) vorlag (3 kbp; Abb. 4). Die Insertgröße betrug 264 bp und damit die Gesamtgröße des Plasmids „pBluescript SK(+)/rat ACBP“ 3264 bp.

Auch der Vektor „pBluescript SK(+)/ACBP gene“, welcher die komplette ACBP-Gensequenz von *Mus musculus* inklusive eigener Promotorregion enthielt (ca. 11,4 kbp), und zunächst für die Generierung eines eukaryotischen Expressionsplasmids verwendet wurde (siehe 3.10.2.2), stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung (Gesamtgröße: 14,4 kbp).

Sowohl das ACBP-cDNA-Fragment der Ratte als auch die ACBP-Gensequenz der Maus waren in die „Multi Cloning Site“ (MCS) des Vektor pBluescript SK(+) integriert worden und sollten nun vollständig in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) kloniert werden.

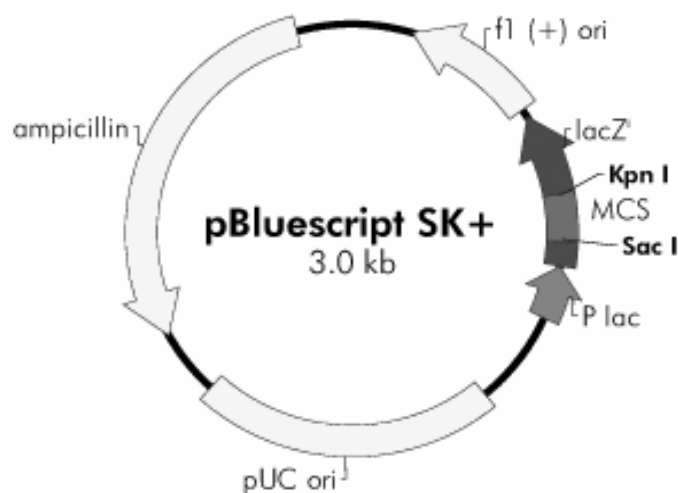


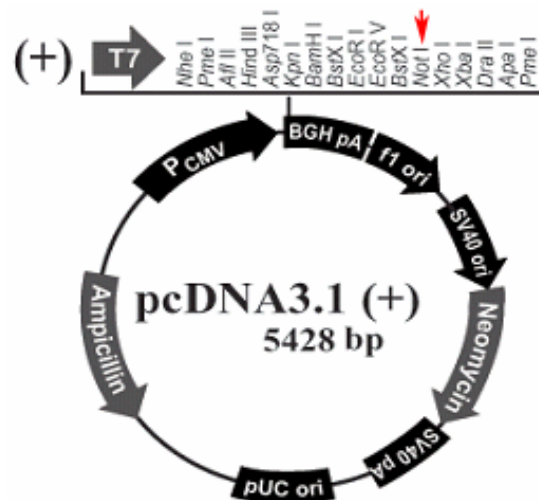
Abb. 4: Vektorschema des prokaryotischen Expressionsplasmids pBluescript SK(+) von Stratagene.

### 3.6.2. pcDNA3.1 (+)

Da es sich bei der verwendeten Zelllinie INS-1E um eine eukaryotische Zelllinie handelt, war für die transienten, aber besonders für die stabile Transfektion ein eukaryotischer Expressionsvektor Voraussetzung (siehe 3.10.2). Das Plasmid pcDNA3.1 (+) von Invitrogen mit einer Größe von 5428 bp besitzt neben einer Ampicillin-Resistenzkassette auch ein Neomycin-Resistenzgen, welches für die angestrebte stabile Transfektion der INS-1E-Zellen unerlässlich war, und wurde u.a. daher verwendet (Abb. 5).

Die Klonierung der modifizierten ACBP-cDNA-Sequenz erfolgte in der MCS des Vektors in die *NotI*-Schnittstelle (in der Abb. mit einem Pfeil gekennzeichnet). Die MCS befindet sich downstream des plasmideigenen, CMV-Promotors/-Enhancers ( $P_{CMV}$ ) und garantiert dadurch eine hohe Expression klonierter DNA-Sequenz. Eine detaillierte Beschreibung der Generierung des für die Transfektion der INS-1E verwendeten Plasmids „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ findet sich unter 3.10.2.1.

Auch die ACBP-Gensequenz aus „pBluescript SK(+)/ACBP gene“ sollte in pcDNA3.1 (+) kloniert werden. Da das Gen über die eigene Promotorregion verfügte und für Expressionsstudien verwendet werden sollte, wurde zu diesem Zweck aus pcDNA3.1 (+) zunächst der CMV-Promotor entfernt und anschließend versucht, die ACBP-Sequenz in die *NotI*-Schnittstelle zu integrieren. Die genaue Vorgehensweise ist unter 3.10.2.2 beschrieben.



**Abb. 5: Vektorschema des eukaryotischen Expressionsplasmids pcDNA3.1 (+) von Invitrogen.**

Der Pfeil markiert die *NotI*-Schnittstelle, die für die Klonierungen verwendet wurde.

### 3.6.3. pGEM-T

Der pGEM-T-Vektor wurde für die Klonierungen der real-time RT-PCR-Standards verwendet (siehe 3.12.1) und war aufgrund einer Ampicillin-/Carbenicillin-Resistenzkassette für die Transformation und Selektion aus *Escherichia coli* (*E. coli*) geeignet. Er stammt von Promega und ist 3 kbp groß (Abb. 6). Die Lokalisation der MCS inmitten zweier vektorspezifischer Primerbindestellen (pUC/M13-Primer), ermöglichte die unkomplizierte Überprüfung plasmidtragender *E. coli*-Klone auf das Vorhandensein des zu erwartenden Inserts durch Kolonie-PCR (siehe 3.12.1).

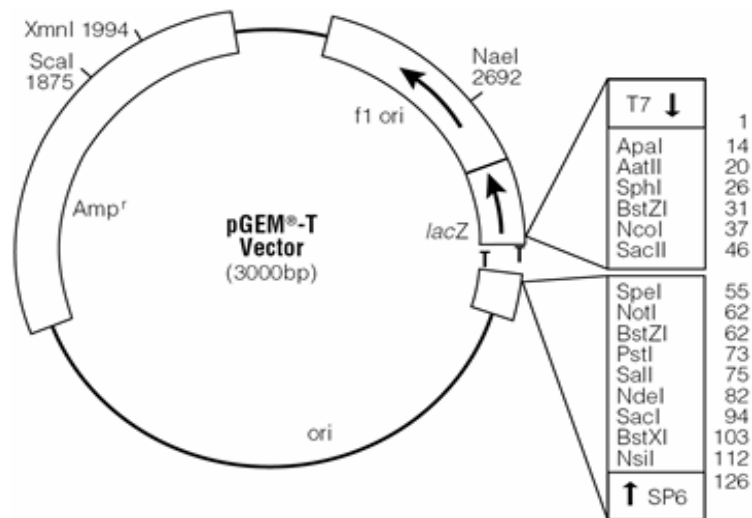


Abb. 6: Vektorschema des prokaryotischen Expressionsplasmids pGEM-T von Promega.

### 3.6.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Klonierung der ACBP-cDNA (siehe 3.10.2.1) und des ACBP-Gens (siehe 3.10.2.2) sowie der real-time RT-PCR-Standards (siehe 3.12.1) musste Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen („One Shot Top 10 Competent Cells“, Invitrogen; „XL10-Gold Ultracompetent Cells“, Stratagene; „JM109 Competent Cells, High Efficiency“, Promega) isoliert werden. Dies geschah in Abhängigkeit von der benötigten DNA-Menge entweder durch Plasmid-Mini- oder -Maxi-Präparation (siehe 3.6.4.1 und 3.6.4.2).

#### 3.6.4.1. Plasmid-Minipräparation

Die Plasmidisolierung erfolgte mittels „NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit“ von Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden aus 3 ml *E. coli*-Zellsuspension

durch Lyse, Abtrennung der genomischen DNA und Elution der Plasmid-DNA in 50 µl TE-Puffer die Vektoren pGEM-T (mit entsprechendem Insert), pcDNA3.1 (+), „pcDNA3.1 (+) ohne CMV“, „pcDNA3.1 (+)/ACBP-Gen“ und „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der dsDNA erfolgte photometrisch bei 260 nm (siehe 3.7.2), bevor die Plasmide bei -20 °C gelagert wurden.

#### 3.6.4.2. Plasmid-Maxipräparation

Für die transienten und die stabile Plasmid-Transfektion der INS-1E-Zellen waren größere Mengen „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ und pcDNA3.1 (+) erforderlich, die aus 250 ml *E. coli*-Kulturen gewonnen wurden. Die Isolierung aus diesen Volumina erfolgte mit dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip ist identisch dem der Minipräparation. Die Resuspension der Plasmid-DNA nach Elution, Isopropanol-Fällung und dem Waschen mit 70%igem Ethanol erfolgte in 1 ml TE-Puffer. Abschließend wurde die Konzentration bestimmt (siehe 3.7.2) und die Plasmide aliquotiert bei -20 °C gelagert.

#### 3.6.5. Anlegen & Verwenden von Glycerol-Stocks

Glycerol-Stocks dienen der Langzeitkonservierung transformierter *E. coli*-Kulturen. Zu diesem Zweck wurden, zuvor auf das Vorhandensein des entsprechenden Plasmids überprüfte, Klone bei 37 °C und 200 Upm in Flüssigkultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin) angezogen und bis zur logarithmischen Wachstumsphase im Schüttelinkubator belassen. Je 1,6 ml einer solchen Kultur wurden in ein steriles 2-ml-Schraubverschlußröhrchen überführt und mit 400 µl autoklaviertem 80 %igen Glycerol überschichtet. Nach gründlichem Vortexen konnten die Kulturen bei -80 °C gelagert werden. Es wurden Glycerol-Stocks folgender *E. coli*-Klone angelegt:

- „pBluescript SK(+)/rat ACBP“ in „One Shot Top 10 Competent Cells“
- “pBluescript SK(+)/ACBP gene“ in „XL10-Gold Ultracompetent Cells“
- pcDNA3.1 (+) in „One Shot Top 10 Competent Cells“
- „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ in „XL10-Gold Ultracompetent Cells“
- „pcDNA3.1 (+) ohne CMV“ in „XL10-Gold Ultracompetent Cells“

Um aus einem Glycerol-Stock einen Klon in Kultur zu bringen, wurde von der gefrorenen Oberfläche des Gemisches mit einer sterilen Pipettenspitze ein Aliquot abgenommen und in ein mit Flüssigmedium befülltes 5-ml-Röhrchen überführt. Durch 16 h Inkubation bei 37 °C und 200 Upm im Schüttelinkubator konnten die Klone angezogen werden.

### **3.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren wurden spektralphotometrisch mit dem „BioPhotometer“ von Eppendorf quantifiziert.

#### **3.7.1. RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen in wässriger Lösung erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm in UV-durchlässigen Plastikkuvetten. Dafür wurden die durch Elution erhaltenen RNA-Lösungen 1:20 verdünnt. Sambrook *et al.* (1989) legten für doppelsträngige (ds) RNA bei einer OD<sub>260</sub> von 1 eine Konzentration von 40 µg/ml zugrunde. Die Reinheit der Nukleinsäuren im Hinblick auf Verunreinigungen durch Proteine lässt sich aus dem Verhältnis der OD<sub>260</sub> zur OD<sub>280</sub> abschätzen. Bei reinen RNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 2,0 (Sambrook *et al.* 1989), Werte zwischen 1,6 und 2,2 wurden toleriert.

$$\text{Konzentration RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

#### **3.7.2. DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Quantifizierung dsDNA in wässriger Lösung, wie sie für die Messung der Plasmidkonzentration (siehe 3.6.4) oder nach Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen (siehe 3.10.2, 3.10.2.2, 3.12.1.3) erforderlich war, erfolgte ebenfalls durch Messung der Absorption bei 260 nm in Plastikkuvetten. Für dsDNA wird bei einer OD<sub>260</sub> von 1 eine Konzentration von 50 µg/ml angenommen. Nach der Absorptionmessung konnte die DNA-Konzentration mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration dsDNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **3.8. Proteinisolierung**

Proteine wurden aus INS-1E-Zellen oder aus dem Lebergewebe von Ratten isoliert. In beiden Fällen wurde Lysispuffer, bestehend aus 25 mM Tris Base, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), verwendet. Der Puffer wurde als Stock hergestellt, bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch mit den entsprechenden Mengen DTT und Proteasehemmer versetzt.

### **3.8.1. Proteingewinnung aus Zellen**

Im Anschluss an Insulinsekretions- oder Transfektionsexperimente wurde das Medium von den 6-well-Platten abgenommen oder entfernt (siehe 3.4.2). Die Zellen wurden durch Zugabe von je 500 µl 0,1%igem Trypsin-EDTA pro well abgelöst, die Proteolyse mit je 1 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspensionen in sterile 1,5-ml-Eppendorftubes überführt. Anschließend wurden die Zellen durch eine 5 min Zentrifugation bei 2500 Upm und 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und die INS-1E in 30 µl kalten Lysispuffer resuspendiert. Mittels Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C für 10 min erfolgte die Trennung von Zellresten und prot1 haltigem Überstand. Die Proteinlösungen wurden entweder direkt für die Konzentrationsbestimmung 1:10 verdünnt und gemessen (siehe 3.8.3) oder bis zur Messung und weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.8.2. Proteingewinnung aus Geweben**

Die Leberproben aus der „High Fat Diet“-Studie waren nach Entnahme zunächst in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C gelagert worden (siehe 3.1.3). Im gefrorenen Zustand wurde pro Probe ca. 0,1 g Gewebe entnommen und mit je 600 µl kaltem Lysispuffer versetzt. Durch Homogenisierung mit dem Ultraturrax bei max. 5000 Upm und 10 sec Ultraschallbehandlung wurden die Zellen lysiert, Zellreste konnten anschließend durch 10 min Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C entfernt werden. Die prot1 haltigen Überstände wurden entweder direkt für die Konzentrationsbestimmung 1:100 verdünnt und gemessen (siehe 3.8.3) oder bis zur Messung und weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.8.3. Konzentrationsbestimmung**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein modifizierter Proteinassay nach Bradford mit dem BioRad-Reagenz der Fa. BioRad durchgeführt (Bradford 1976). Hierbei wurden pro Ansatz 5 µl der Probe bzw. deren Verdünnung in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je 250 µl einer 1:5 verdünnten BioRad-Reagenzlösung versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion im Plattenphotometer (Dynex Technologies) bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen. Die in den Proben enthaltene Proteinmenge wurde mit Hilfe einer Standardreihe (0 - 2 µg BSA) ermittelt, von deren Verdünnungen ebenfalls jeweils 5 µl mit 250 µl BioRad-Lösung versetzt, inkubiert und parallel gemessen worden waren. Alle Daten entstammen Doppel- oder Dreifachbestimmungen.

### 3.9. Western Blot

Eine gängige Methode zur Detektierung eines in einer Probe enthaltenen Proteins ist der Western Blot. Bei diesem werden identische Proteinkonzentrationen durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

#### 3.9.1. Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine wurden „10%ige NuPAGE BisTris“ Fertiggele (Invitrogen) in eine Novex-Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt und die Kammer mit 1x MES-Laufpuffer (Invitrogen) gefüllt. Der Probenkamm wurde entfernt und die Taschen mit den Proben befüllt. Diese waren zuvor auf eine Gesamtproteinkonzentration von 25 µg pro Probe eingestellt, mit Aqua dest. auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt, mit 5 µl 4x Probenpuffer (Invitrogen) versetzt und 10 min bei 95 °C erhitzt worden. Als Größenstandard diente „See Blue Plus 2“ (Invitrogen). Die Auftrennung der Proteinfractionen erfolgte für ½ h bei 200V.

#### 3.9.2. Blotten

Für den Blotvorgang wurden „PVDF Membrane Filter Paper Sandwiches“ (Invitrogen) mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet. Die Membran wurde in Methanol geschwenkt, mit Aqua dest. gewaschen und in Transferpuffer überführt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in kaltem Transferpuffer zusammen mit Whatman-Filterpapieren und Schwämmen äquilibriert und der Blot wie in Abb. 7 aufgebaut. Die Kammer wurde in die Novex-Apparatur eingesetzt, diese mit Transferpuffer gefüllt und die Proteine bei 30 mA 60 min auf die Membran geblottet.

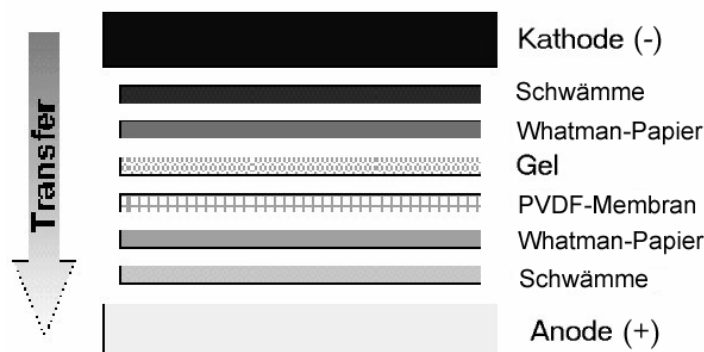


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Western Blots.



### **3.9.3. Entwicklung**

Für die Entwicklung wurden folgende Lösungen hergestellt:

1. Blocking Buffer (5%ige Magermilchlösung)

2,5 g Magermilchpulver in 50 ml 1x PBS mit 0,1 % Tween 20 (PBST) lösen

2. Primärantikörperlösung

15 ml 5%ige Magermilchlösung + „goat ACBP S-20“ Antikörper (Santa Cruz)

1:500 + „goat  $\beta$ -Actin I-19“ Antikörper (Santa Cruz) 1:500

3. Sekundärantikörperlösung

15 ml 5%ige Magermilchlösung + „anti-goat Ig“-Antikörper, HRP konjugiert (Santa Cruz) 1:1000

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst 5-10 min in PBST geschwenkt, um Reste des Transferpuffers zu entfernen. Daraufhin folgte eine 1 h Inkubation in 20 ml Blocking Buffer bei RT auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen à 15 min in PBST wurde die Membran 16 h bei 4 °C unter Schütteln mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Anschließend erneut dreimal mit PBST gewaschen und daraufhin 1h bei RT mit der Sekundärantikörperlösung auf dem Schüttler inkubiert. Durch einen erneuten Waschschrift (2x 10 min mit PBST) wurde die Membran für die Detektion vorbereitet.

### **3.9.4. Detektion**

Für die Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe wurde „ECL Plus Western Blotting Detection Reagent“ von GE Healthcare benutzt. Pro Membran wurden 500  $\mu$ l Puffer A mit 10  $\mu$ l Puffer B des Kits kurz vor Gebrauch gemischt, auf die Proteinseite der Membran gegeben und 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Entwicklung erfolgte im „Chemidoc“ mit Hilfe des „Quantity One 4.5.0“-Programms von BioRad. Dabei wurde die, durch die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase und das Luminol des ECL, erzeugte Chemolumineszenz detektiert. Das Luminol wird durch die Oxidation angeregt und fällt unter Lichtemission in seinen Grundzustand zurück. Das ausgesandte Licht konnte dann durch die „XRS ChemiHigh Sensitivity“-Einstellung registriert und visualisiert werden.

## **3.10. Transfektion von INS-1E-Zellen**

### **3.10.1. siRNA-Transfektionen**

Die für die folgenden Experimente verwendete sequenzspezifische ACBP-siRNA wurde mittels „BLOCK-iT RNAi Desinger“ von Invitrogen ausgehend von der mRNA-Sequenz von

*Rattus norvegicus* (NM 031853) generiert. Die ausgewählte siRNA besitzt einen geringen GC-Gehalt (33 %) und ist komplementär zur ACBP-mRNA-Sequenz im Bereich von 373-391 bp. Als Kontrolle diente eine sogenannte „scrambled siRNA“ (scr. siRNA), deren Sequenz keine Homologie zu jedweder mRNA aus *Rattus norvegicus* aufweist. Zusätzlich zu den je 19 Nukleotiden umfassenden Sequenzen wurden am 3'-Ende TT-Überhänge integriert, womit die finale Größe der siRNAs bei 21 Nukleotiden lag (siehe Tab. 2).

Die ACBP-siRNA, wie auch die Kontroll-siRNA, wurden als Duplex-RNA in gepufferter Lösung synthetisiert (Invitrogen), gefriergetrocknet und konnten durch Resuspension in 1 ml DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt werden. Die Lagerung erfolgte in Aliquots von je 100 µl bei -20 °C.

**Tab. 2: Für die Transfektion von INS-1E-Zellen verwendete siRNA-Duplexe:**

<u>Bezeichnung</u>	<u>siRNA-Sequenz</u>
<b>siACBP (ACBP-siRNA)</b>	5'- GGA AUA UAA ACG ACC AGA UTT- 3'
	5'- AUC UGG UCG UUU AUA UUC CTT- 3'
<b>scr. siRNA (scrambled siRNA)</b>	5'- AGC TTC AGA GAG ACT CAG ATT- 3'
	5'-UCU GAG UCU CUC UGA AGC UTT-3'

Für die siRNA-Transfektionen der INS-1E-Zellen wurden diese in 6-well-Platten in einer Zellzahl von 500.000 Zellen pro Vertiefung in Magermedium (ohne FCS und Antibiotika) ausgesät und bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Athmosphäre kultiviert. Nach 24 h erreichten sie eine Zelldichte von 30-50 %. Das Transfektionsreagenz („Lipofectamine 2000“, Invitrogen) wurde nach Herstellerangaben in Magermedium verdünnt und 5 min bei RT belassen. Parallel wurden je 10 µl ACBP-siRNA und scr. siRNA mit Magermedium gemischt, die Ansätze anschließend im gleichen Verhältnis mit dem verdünnten Lipofectamine kombiniert und 20 min bei RT inkubiert (Komplexbildung). Die einzelnen Transfektionsansätze wurden tropfenweise zu dem Magermedium in den einzelnen Vertiefungen der Zellkulturplatte gegeben und die Zellen 4-6 h bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Athmosphäre damit inkubiert. Die finale siRNA-Konzentration in 2 ml Medium betrug 100 nM pro Ansatz. Nach der 4-6 h Inkubationszeit wurde dem Medium FCS zugesetzt und die Transfektion für insgesamt 48 h fortgesetzt. Die Zellernte erfolgte nach Insulinsekretionsexperiment (siehe 3.4.2) wie unter 3.5.1 (RNA-Isolierung) bzw. 3.8.1 (Proteingewinnung) beschrieben.

### 3.10.2. Plasmid-Transfektionen

#### 3.10.2.1. Klonierung der ACBP-cDNA-Sequenz in pcDNA3.1 (+)

Als Template diente die im pBluescript SK(+)-Vektor enthaltene ACBP-cDNA (siehe 3.6.1). Für die PCR wurde eine DNA-Polymerase mit „proof-reading“-Funktion eingesetzt, um eine exakte Vervielfältigung der ACBP-cDNA zu gewährleisten („Phusion High-Fidelity PCR Kit“). Weiterhin wurden spezielle Primer verwendet, durch die sowohl am 5'-, als auch am 3'-Ende der doppelsträngigen cDNA eine *NotI*-Erkennungssequenz (5'-GCGGCCGC-3') eingefügt werden konnte, die für die spätere Klonierung in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3.1 (+) von Nöten war. Zudem wurde über den forward Primer zusätzlich eine, das Start-Codon umgebende, Kozak-Sequenz integriert, welche bei der mRNA-Translation dem Initiationskomplex als Binderegion dient. Die Primersequenzen und ihre Besonderheiten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Für die Amplifikation der ACBP-cDNA verwendete Primer:

Name	Primer-Sequenz	Länge (nt)	Konz. ( $\mu$ M)
cDNA forward	5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG CCG CCG CGC CAC <u>CAT GTC</u> TCA GGC TGA TTT TGA C -3'	64	60
cDNA reverse	5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CCG CCG <u>CIT ATA TTC</u> CAT ATT TCT TCT T -3'	58	60

G CCG CCG C = *NotI*-Erkennungssequenz; AC CAT GT = Kozak-Sequenz; ATG = AUG auf mRNA-Ebene = Startcodon; ... = komplementäre 21 nt zur ACBP-mRNA aus *Rattus norvegicus*; TTA = UAA auf mRNA-Ebene = Stoppcodon

Der PCR-Ansatz enthielt die folgenden Komponenten in den aufgeführten Mengen:

„pBluescript SK(+)/rat ACBP“	10 ng
5 x HF-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	10 $\mu$ l
10 mM dNTP	1 $\mu$ l
DNA-Polymerase	0,5 $\mu$ l
cDNA forward Primer	0,2 $\mu$ l
cDNA reverse Primer	0,2 $\mu$ l
DNase-freies H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Das gewählte Programm bestand aus folgenden Schritten:

<i>ininitiale Denaturierung</i>	98 °C	30 sec		
<i>Denaturierung</i>	98 °C	10 sec	}	35 Zyklen
<i>Annealing</i>	51 °C	20 sec	}	
<i>Elongation</i>	72 °C	15 sec	}	
<i>finale Elongation</i>	72 °C	7 min	}	
	4 °C	∞		

Die PCR-Produktgröße betrug 344 bp (264 bp ACBP-cDNA + 80 bp integrierte Primersequenzen) und wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft, um das Produkt wie unter 3.12.1.3 beschrieben aufzureinigen.

Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Klonierung der modifizierten ACBP-cDNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) waren identische Überhänge der DNA-Fragmente. Daher wurden sowohl das Plasmid als auch die aufgereinigte ACBP-cDNA mit dem Restriktionsenzym *NotI* 1 h bei 37 °C verdaut. Der Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

<b>DNA</b>	1 µg
<b>10x NEB3-Puffer</b>	5 µl
<b>100x BSA</b>	0,5 µl
<b><i>NotI</i></b>	1 µl
<b>DNase-freies H<sub>2</sub>O</b>	ad 50 µl

Im Anschluss wurde das Enzym *NotI* durch 20 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert (nicht im Plasmid-Ansatz). Durch die Restriktion verkleinerte sich die Größe der ACBP-cDNA auf 285 bp. Nach Überprüfung im Agarosegel wurde die ACBP-cDNA aus dem Gel aufgereinigt (siehe 3.12.1.3).

Der Vektor pcDNA3.1 (+) wurde zusätzlich einem alkalischen Phosphatase-Verdau zur Entfernung der 5'-Phosphate unterzogen. Diese Modifikation sollte die Autoligation des Plasmids während der Ligation verringern. Zu diesem Zweck wurden dem Restriktionsansatz 5 µl „Antartic Phosphatase Buffer“ und 1 µl „Antarctic Phosphatase“ zugesetzt und dieser für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C.

Nach photometrischer DNA-Konzentrationsmessung (siehe 3.7.2) wurden die *NotI*-geschnittene ACBP-cDNA sowie das linearisierte Plasmid bei -20 °C gelagert.

Für die Ligation der ACBP-cDNA in den pcDNA3.1 (+)-Vektor wurde das „Zero Blunt Topo Cloning Kit“ (Invitrogen) wie folgt verwendet:

<b>Plasmid-DNA</b>	50 ng
<b>ACBP-cDNA</b>	10 ng
<b>2x Rapid Ligation Buffer</b>	2,5 µl
<b>T4-DNA Ligase (3 U/µl)</b>	0,5 µl
<b>DNase-freies H<sub>2</sub>O</b>	ad 5 µl

Die Ligation erfolgte für 16 h bei 4 °C. Die finale Größe des Expressionsplasmids belief sich auf 5,7 kbp, wobei die ACBP-cDNA in die MCS des Vektors integriert wurde. Diese MCS befindet sich hinter dem plasmideigenen CMV-Promotor und sollte eine hohe Expression des ACBPs in den INS-1E gewährleisten. Die Ligation wurde mittels eines *NotI*-Kontrollverdau und anschließender Auftrennung der erhaltenen Restriktionsfragmente im Agarosegel überprüft.

Für die Überamplifikation wurde der ACBP-tragende Vektor in ultrakompetente *E. coli*-Zellen („XL10-Gold Ultracompetent Cells“, Stratagene) nach Angaben des Herstellers transformiert. Ultrakompetente Zellen sind durch ihren Hte („high transformation efficiency“)-Phänotyp besonders für die Transformation großer Plasmide mit hoher Effizienz geeignet. Zunächst wurden die ultrakompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend 100 µl Zellsuspension mit 4 µl β-Mercaptoethanol vorsichtig auf Eis vermischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 2 µl Ligationsansatz zu der Zellsuspension geben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen 30 sec Hitzeschock bei 42 °C und eine darauffolgende 2 min Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation des Plasmids in die *E. coli*-Zellen. Die Regeneration der Zellen wurde durch die Zugabe von 900 µl SOC-Medium und 1 h Inkubation bei 37 °C unter Schütteln (225-250 Upm) ermöglicht, bevor 100 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden.

Das Ampicillin-Analogon Carbenicillin selektionierte plasmidtragende von untransformierten *E. coli*-Zellen, aufgrund der im pcDNA3.1 (+)-Vektor enthaltenen Ampicillin-Resistenzkassette. Positive Klone wurden in flüssigem LB-Medium, welches 100 µg/ml Carbenicillin enthielt, 16 h bei 37 °C unter Schütteln (225-250 Upm) angezogen. Die

anschließende Plasmidisolierung erfolgte wie unter 3.6.4.1 beschrieben. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch durchgeführt (siehe 3.7.2).

Im Anschluss an die Aufreinigung, wurden die Plasmide einem *NotI*-Kontrollverdau unterzogen und die erhaltenen DNA-Fragmente mittels anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 3.12.1.3). Konnte neben der Vektor-DNA auch die inserierte ACBP-cDNA bei 285 bp detektiert werden, so wurde der entsprechende Klon in Flüssigkultur 16 h bei 37 °C angezogen. Diese 5-ml-Vorkultur diente am darauffolgenden Tag dem Animpfen einer 250-ml-Hauptkultur, die wiederum für 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert wurde. Aus dieser Kultur wurde mittels Maxipräparation nach Angaben des Herstellers erneut die Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.6.4.2).

Die Überprüfung der Orientierung und Vollständigkeit der integrierten ACBP-cDNA-Sequenz im Plasmid erfolgte durch Sequenzierung („Sequence Laboratories“, Göttingen). Nach abschließender Konzentrationsbestimmung (siehe 3.7.2) konnte der so für die Plasmid-Transfektionen vorbereitete eukaryotische Expressionsvektor „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ bei -20 °C gelagert werden.

### **3.10.2.2. Klonierung der ACBP-Gensequenz in pcDNA3.1 (+)**

Neben dem Plasmid „pBluescript SK(+)/rat ACBP“, dessen integrierte ACBP-cDNA-Sequenz in pcDNA3.1 (+) kloniert worden war, stand ein weiteres Plasmid zur Verfügung, welches die gesamte ACBP-Gensequenz von *Mus musculus* enthielt (siehe 3.6.1).

Die Klonierung des ACBP-Gens in den Vektor „pBluescript SK(+)/ACBP gene“ war über die *NotI*-Erkennungssequenz innerhalb der MCS erfolgt. Daher bestand der erste Schritt in einem Restriktionsverdau des Plasmids mit *NotI* zur Gewinnung der ACBP-Gensequenz. Der Restriktionsansatz und die Inkubationszeiten sind identisch dem unter 3.10.2.1 beschriebenen Verdau. Durch anschließende präparative Gelelektrophorese wurde die ACBP-Gensequenz (11,4 kbp) aus dem Agarosegel aufgereinigt (siehe 3.12.1.3), die Konzentration bestimmt (siehe 3.7.2) und die DNA bei -20 °C gelagert.

Da der Vektor „pBluescript SK(+)/ACBP gene“ die komplette ACBP-Gensequenz inklusive eigenem Promotor enthielt, musste zunächst der CMV-Promotor aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) entfernt werden (Vektorschema siehe 3.6.2). Dafür eigneten sich die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Bam*HI und *Bgl*II. Sie befinden sich an Position

13 (*Bgl*III) und 930 (*Bam*HI) und flankieren die CMV-Promotorregion. Beide Endonukleasen besitzen nur eine Erkennungssequenz im Vektor und produzieren kompatible überhängende Enden. Der Restriktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen und wurde 1 h bei 37 °C inkubiert:

<b>pcDNA3.1 (+)</b>	1 µg
<b>10x NEBU-Puffer</b>	5 µl
<b>100x BSA</b>	0,5 µl
<b><i>Bam</i>HI</b>	1 µl
<b><i>Bgl</i>III</b>	1 µl
<b>DNase-freies H<sub>2</sub>O</b>	ad 50 µl

Im Anschluss fand eine präparative Agarose-Gelelektrophorese statt (siehe 3.12.1.3), bei der das Plasmid „pcDNA3.1 (+) ohne CMV“ mit einer Größe von 4510 bp aus dem Gel aufgereinigt wurde. Nach abschließender Konzentrationsbestimmung (siehe 3.7.2) wurde der Vektor wie folgt autoligiert:

<b>Plasmid-DNA</b>	50 ng
<b>2x Rapid Ligation Buffer</b>	2,5 µl
<b>T4-DNA Ligase (3 U/µl)</b>	0,5 µl
<b>DNase-freies H<sub>2</sub>O</b>	ad 5 µl

Die Ligation erfolgte für 16 h bei 4 °C. Nach Transformation in ultrakompetente *E. coli*-Zellen (siehe 3.10.2.1) wurde von dem Plasmid „pcDNA3.1 (+) ohne CMV“ wie unter 3.6.5 beschrieben ein Glycerol-Stock angelegt und bei -80 °C gelagert. Durch Anzucht und anschließende Maxipräparation eines plasmidtragenden Klons (siehe 3.6.4.2) stand genügend Material für die folgenden Ligationsversuche mit *Not*I-geschnittener ACBP-DNA (siehe 3.10.2.1) zur Verfügung.

Vor der Ligation des Plasmids „pcDNA3.1 (+) ohne CMV“ mit der *Not*I-geschnittene ACBP-Gensequenz musste der Vektor ebenfalls mit *Not*I restrigiert werden. Beide DNA-Fragmente wurden zusätzlich einem „Antarctic Phosphatase“-Verdau unterzogen. Dies geschah wie unter 3.10.2.1 beschrieben. Anschließend erfolgte die Ligation für 16 h bei 4 °C in folgendem Ansatz:



<b>Plasmid-DNA</b>	90 ng
<b>ACBP-Gen</b>	25 ng
<b>2x Rapid Ligation Buffer</b>	2,5 µl
<b>T4-DNA Ligase (3 U/µl)</b>	0,5 µl
<b>DNase-freies H<sub>2</sub>O</b>	ad 5 µl

Die finale Größe des eukaryotischen Expressionsvektors „pcDNA3.1 (+)/ACBP-Gen“ betrug 15,9 kbp. Nach Transformation in ultrakompetente *E. coli*-Zellen konnte der Erfolg der Ligation durch Plasmidisolierung aus Carbenicillin-resistenten Klonen, einem *NotI*-/*BglIII*-Doppelverdau für 1 h bei 37 °C und anschließender Auftrennung der Restriktionsfragmente im Agarosegel überprüft werden (siehe 3.10.2.1).

### 3.10.2.3. Transiente Plasmidtransfektion

Für die transienten Plasmidtransfektionen der INS-1E-Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1 (+) bzw. mit dem generierten Expressionsplasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ wurde ein ähnliches Protokoll wie für die siRNA-Transfektion der Zellen verwendet (siehe 3.10.1).

In Kürze: Durch Aussäen von 500.000 Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in Magermedium und deren 24 h Kultivierung bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Athmosphäre erreichten diese eine Zelldichte von 30-50 %. Als Transfektionsreagenzien dienten FuGENE HD, PEI 750 und PEI 50 mit denen die Plasmide „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ bzw. pcDNA3.1 (+) im Verhältnis 6 µl Transfektionsreagenz zu 2 µg Plasmid pro Ansatz in Magermedium bzw. NaCl verdünnt, zur Komplexbildung bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben wurde. 4-6 h nach der Transfektion und Inkubation bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Athmosphäre wurde dem Medium FCS zugesetzt und die Zellen für insgesamt 48 h transfiziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Insulinsekretionsexperimente durchgeführt (siehe 3.4.2) und letztlich, wie unter 3.5.1 (RNA-Isolierung) bzw. 3.8.1 (Proteingewinnung) beschrieben, die Zellen geerntet.

### 3.10.2.4. Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird Plasmid-DNA in die genomische DNA einer Zelle integriert und eine genetisch modifizierte Zelllinie generiert, die über viele Generationen die erwünschte Eigenschaft besitzt. Für diesen Zweck besaß der verwendete Expressionsvektor



pcDNA3.1 (+) eine Neomycin-Resistenzkassette, die für die Selektion der transfizierten INS-1E-Zellen genutzt werden sollte. Das Antibiotikum G418 (Geneticin, Invitrogen) ist ein Neomycin-Analogon, dessen cytotoxische Wirkung in Abhängigkeit von der Zelllinie und dem Zustand und Alter der Zellen schwankt. Deshalb wurde zunächst mit Hilfe von „dose-to-kill“-Versuchsreihen (G418-Konzentrationen von 800-25 µg/ml Medium) die für INS-1E-Zellen minimal toxische Konzentration ermittelt.

Die stabile Transfektion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: 200.000 INS-1E-Zellen der Passage p 64 wurden pro well einer 12-well-Platte 24 h vor der Transfektion in Magermedium ausgesät. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurden Ansätze mit FuGENE, PEI 750 und PEI 50 hergestellt. Dabei wurde das Plasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ im Verhältnis 6 µl Transfektionsreagenz zu 2 µg Plasmid pro Ansatz in Magermedium bzw. NaCl verdünnt, zur Komplexbildung bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. 4-6 h nach der Transfektion und Inkubation bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Athmosphäre wurde dem Medium FCS zugesetzt und die Zellen für weitere 72 h transfiziert. Daraufhin erhielten die INS-1E 4 Tage normales Kulturmedium, dem zusätzlich 300 µg G418/ml beigegeben waren. Die hohe Antibiotikakonzentration sorgte für das Absterben aller untransfizierten bzw. transient transfizierten INS-1E-Zellen, deren Anteil bei ca. 95 % lag. Durch mehrmaligen Mediumwechsel konnten toxische Effekte apoptotischer Zellen vermieden werden. Ab dem sechsten Tag erhielten die verbleibenden stabil transfizierten Zellen Kulturmedium mit einer G418-Konzentration von 100 µg/ml und wurden über 6-well-Platten und T25-Flaschen in T75-Kulturflaschen überführt. Die Überprüfung der ACBP-Expression dieser INS-1E-Klone erfolgte durch RNA-Isolierung (siehe 3.5.1) und anschließender quantitativer real-time RT-PCR (siehe 3.12).

### **3.11. cDNA-Transkription**

Für die reverse Transkription der RNA aus Zellen sowie aus Lebergewebe wurden jeweils 2 µg RNA für 10 min bei 68 °C denaturiert und anschließend mittels „SuperScriptII RNaseH“ (Invitrogen) bei 42 °C für 1 h in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Transkription wurde mit Oligo-dT-Primern (Promega) gearbeitet, um ausschließlich die in den Proben enthaltene mRNA in cDNA umzuschreiben. Nach der 60 min Inkubation wurden die Proben auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt, wodurch die cDNA-Konzentration bei 20 ng/µl lag. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

### **3.12. Quantitative real-time RT-PCR**

Zur Ermittlung der Genexpression von ACBP und L-FABP sowie nukleärer Transkriptionsfaktoren im Lebergewebe und den INS-1E-Zellen wurden die zuvor durch reverse Transkription hergestellten cDNA-Proben mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR wird dem PCR-Ansatz bei der real-time PCR ein fluoreszierender Farbstoff („SYBR Green I“) zugesetzt, der spezifisch für dsDNA ist. Dieser interkaliert bei jedem Zyklus der PCR-Reaktion in die neu synthetisierten Produkte. Die Fluoreszenz der Reaktion steigt somit proportional zur Konzentration an synthetisierter dsDNA an. Die Quantifizierung dieser Fluoreszenzsignale erfolgt innerhalb der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion. Übersteigt in dieser Phase die Fluoreszenz der synthetisierten DNA erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz, so ergibt sich daraus der Cp- („Crossing point“-)Wert einer Probe.

Bei der quantitativen Variante der real-time RT-PCR, der eine Standardkurve für die entsprechende cDNA-Zielsequenz zugrunde liegt, lässt sich jedem Cp-Wert die exakte Kopienzahl zuordnen. Da diese wiederum proportional zur eingesetzten RNA-Menge ist, kann gleichzeitig auf die vorhandene mRNA-Konzentration des Zielproteins in den ursprünglichen Gewebe- oder Zellproben geschlossen werden. Voraussetzung für die quantitative real-time RT-PCR ist daher eine Standardkurve, welche mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eines Zielsequenz-tragenden Plasmids erstellt wird (Kiehne *et al.* 2005).

#### **3.12.1. Generierung der externen Standards**

##### **3.12.1.1. Primerdesign und -sequenzen**

Basierend auf den mRNA-Sequenzen der Zielproteine wurden mittels „Primer 3 Software“ von Rozen und Skaletzky ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) forward und reverse Primer ausgewählt, die jeweils 19-21 Nukleotide umfassten und intronüberspannende Amplifikate von 95–269 Basenpaarlänge mit Annealing-Temperaturen (AT) zwischen 52 und 60 °C lieferten. Die auf diese Weise erhaltenen Primersequenzen wurden auf ihre Spezifität für die entsprechende Zielsequenz durch „Blasten“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) überprüft. Erfüllten die Primersequenzen alle erforderlichen Voraussetzungen wurden sie über Sigma-Genosys bezogen und entsprechend den Herstellerangaben auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Diese Lösungen wurden für den PCR-Ansatz erneut 1:10 verdünnt und als 10 µM-Stocks bei – 20 °C gelagert.

Die Primer, sowohl für die Fettsäurebindepoteine als auch für die Transkriptionsfaktoren, sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tab. 4: Real-time RT-PCR Primersequenzen und -charakteristika:**

Name mRNA-Sequenz-Nr.		Sequenz (5' - 3')	Produkt -größe [bp]	Tm [°C]	AT [°C]	MT [°C]
<b>ACBP</b> NM 031853	forw. rev.	GAA GCG CCT CAA GAC TCA GC TTC AGC TTG TTC CAG GAG TCC	150	64 64	59	-
<b>β-Aktin</b> NM 031144	forw. rev.	CAA CCG TGA AAA GAT GAC CCA GA GTC CCT GTA TGC CTC TGG TCG T	100	66 70	60	82
<b>L-FABP/ FABP 1</b> NM 012556	forw. rev.	GTG TCA GAA ATC GTG CAT GAA ATG GTC TCC AGT TCG CAC TCC	110	60 66	57	-
<b>HNF-4α</b> NM 022180.1	forw. rev.	CTT CCT TCT TCA TGC CAG ACA CGT CCC CAT CTG AAG	269	54 52	55	85
<b>LXR-α</b> NM 013839	forw. rev.	TGC AGG ACC AGC TCC AAG TA GAA TGG ACG CTG CTC AAA GTC	150	62 64	58	-
<b>PGC-1α</b> NM 031347	forw. rev.	ACT GAG CTA CCC TTG GGA TG TAA GGA TTT CGG TGG TGA CA	112	60 55	50	82
<b>PPAR-α</b> NM 013196	forw. rev.	TGA ACA AAG ACG GGA TG TCA AAC TTG GGT TCC ATG AT	106	50 56	58	80
<b>PPAR-δ</b> NM 013141	forw. rev.	GAG GGG TGC AAG GGC TTC TT CAC TTG TTG CGG TTC TTC TTC TG	101	64 68	60	-
<b>PPAR-γ</b> NM 013124	forw. rev.	CAT GCT TGT GAA GGA TGC AAG TTC TGA AAC CGA CAG TAC TGA CAT	131	62 68	58	-
<b>SIRT-1</b> NM 019812	forw. rev.	CAG TGT CAT GGT TCC TTT GC CAC CGA GGA ACT ACC TGA T	104	57 57	52	-
<b>SREBP-1c</b> NM 213329.3	forw. rev.	AGC GCT ACC GTT CCT CTA TC GCG CAA GAC AGC AGA TTT AT	95	62 58	54	-

### 3.12.1.2. Amplifikation der Zielsequenz

Die für die quantitative real-time RT-PCR designten Primer waren so konzipiert, dass sie auch für die im Vorfeld nötige Amplifikation der entsprechenden Zielsequenzen durch RT-PCR eingesetzt werden konnten. Als Template diente jeweils eine cDNA-Probe, die aufgrund ihrer Herkunft und der gewebespezifischen Expression von Fettsäurebindepoteinen und nukleären Transkriptionsfaktoren, über die gewünschte Zielsequenz in hoher Konzentration verfügte. Die PCR-Reaktionen wurden mit folgenden Komponenten im „Gene Amp 2400 Thermocycler“ (Perkin Elmer) mit der „TaqMan DNA-Polymerase“ (Invitrogen) in einem 60 µl-Ansatz durchgeführt.

<b>80 ng cDNA</b>	4 $\mu$ l
<b>10 x PCR- Puffer</b>	6 $\mu$ l
<b>1,5 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1,8 $\mu$ l
<b>10 mM dNTP</b>	4,8 $\mu$ l
<b>5 U/<math>\mu</math>l Taq-Polymerase</b>	0,6 $\mu$ l
<b>10 <math>\mu</math>M forw. Primer</b>	1,5 $\mu$ l
<b>10 <math>\mu</math>M rev. Primer</b>	1,5 $\mu$ l
<b>Aqua dest.</b>	ad 60 $\mu$ l

Das gewählte Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

94 °C	5 min	} 35 Zyklen
95 °C	45 sec	
AT (Tab. 4)	45 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	}
4 °C	$\infty$	

### 3.12.1.3. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden den PCR-Ansätzen je 6  $\mu$ l Auftragspuffer zugesetzt und die Größe der PCR-Produkte in einem 1,7%igen Agarosegel überprüft. Zu diesem Zweck wurde „Low Melting Agarose Ultra Pure“ in 1x TAE-Puffer aufgekocht und vor dem Gießen mit 5  $\mu$ l Ethidiumbromid versetzt. Als Größenkontrolle dienten unterschiedliche „GeneRuler DNA Ladder“ (Fermentas). Nach 1 hr Elektrophorese bei 100 V in 1x TAE-Puffer wurden die produktspezifischen Banden durch die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht (266 nm) detektiert. Nach dem Ausschneiden der entsprechenden Bande wurde die cDNA mit Hilfe des „QIAExII Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert. Zu je 100 mg Gel wurden 300  $\mu$ l einer Silikatgelpartikel-enthaltenden Suspension gegeben, welche die cDNA aufgrund ihrer positiven Ladung binden. Nach 10 min Inkubation bei 50 °C unter gelegentlichem Vortexen, wurden die Gelpartikel durch Zentrifugation sedimentiert, dann gewaschen und getrocknet. Die Elution der cDNA erfolgte mit 20  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl (pH 8). Abschließend wurde photometrisch die DNA-Konzentration bestimmt (siehe 3.7.2).

#### 3.12.1.4. Klonierung und Transformation

Die aufgereinigten PCR-Produkte, und damit die Zielsequenzen, wurden mit dem „Zero Blunt Topo Cloning Kit“ (Invitrogen) in den pGEM-T-Vektor (3000 bp) von Promega ligiert, welcher eine Ampicillin-/Carbenicillin-Resistenzkassette trägt. Ein Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<b>PCR-Produkt</b>	1,5 µl
<b>2x Rapid Ligation Buffer</b>	2,5 µl
<b>50 ng pGEM-T-Vektor</b>	0,5 µl
<b>3 U/µl T4-DNA Ligase</b>	0,5 µl

Die Ansätze wurden für 16 h bei 4 °C inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen („One ShotTop10 Competent Cells“, Invitrogen) transfiziert. Für diesen Zweck wurden je 50 µl *E. coli*-Zellsuspension mit 2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 45 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und nochmals 2 min auf Eis belassen. Danach wurde den Zellen durch die Zugabe von 125 µl SOC-Medium und einer 1 hn Inkubation bei 37 °C und 200 Upm die Regeneration ermöglicht. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte für 16 h bei 37 °C durch Ausplattierung der Zellsuspension auf LB-Agarplatten, die mit 100 µg/ml Carbenicillin versetzt worden waren. Positive, plasmidtragende Klone wurden durch Kolonie-PCR (siehe 3.12.1.5) auf das Vorhandensein des entsprechenden Inserts (spezifisches PCR-Produkt) hin überprüft.

#### 3.12.1.5. Überprüfung Carbenicillin-resistenter Klone

Für die Kolonie-PCR wurde sich eine weitere Eigenschaft des pGEM-T-Vektors zunutze gemacht - die Lokalisation der MCS inmitten zweier vektorspezifischer Primerbindestellen. Mit Hilfe der pUC/M13-Primer (Promega) konnte so der Bereich zwischen diesen Bindestellen amplifiziert werden. Für die Kolonie-PCR wurde folgender Ansatz hergestellt und mit Zellen je einer Carbenicillin-resistenten Kolonie beimpft. Dies geschah mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze, mit der Zellen einer Kolonie aufgenommen und dann zunächst eine, mit einem Nummernraster versehene, Carbenicillin-Agarplatte und anschließend der PCR-Ansatz beimpft wurde.

<b>10x PCR- Puffer</b>	3 $\mu$ l
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b>	2,4 $\mu$ l
<b>10 mM dNTP's</b>	0,6 $\mu$ l
<b>Ampli-Taq-Gold DNA-Pol.</b>	0,15 $\mu$ l
<b>10 mM M13-forw. Primer</b>	0,6 $\mu$ l
<b>10 mM M13-rev. Primer</b>	0,6 $\mu$ l
<b>Aqua dest.</b>	ad 30 $\mu$ l

PCR-Reaktionsbedingungen:

95 °C	9 min	} 35 Zyklen
94 °C	1 min	
58 °C	20 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	3 min	
4 °C	$\infty$	

Die Größe der Kolonie-PCR-Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 3.12.1.3). Die Masterplatte mit den nummerierten, getesteten Klonen wurde nach 16 h Inkubation bei 37 °C als Grundlage für die Anzucht eines positiven, d.h. Insert-tragenden, Klons benutzt. Mit der entsprechenden Kolonie wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze 5 ml Carbenicillin-haltiges, flüssiges LB-Medium beimpft. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C und 200 Upm erfolgte die unter 3.6.4.1 beschriebene Plasmidisolierung.

Aliquots der isolierten Plasmide wurden zur Überprüfung zu den „Sequence Laboratories“ (Göttingen, [www.seqlab.de](http://www.seqlab.de)) versandt und dort sequenziert. Die Analyse gab Aufschluss über Orientierung und Vollständigkeit der inserierten Ziel-cDNA-Sequenzen in den Plasmiden, welche im Folgenden für die Erstellung der Standardverdünnungsreihen verwendet wurden.

### 3.12.1.6. Berechnung der Plasmidkonzentration

Für die Erstellung der Verdünnungsreihen musste zunächst aus der DNA-Konzentration die Kopienzahl der Plasmide in den einzelnen Proben ermittelt werden. Dies geschah nach folgender Formel:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{X [\text{g}/\mu\text{l}]}{Y [\text{Bp}] \times 660 \text{ g/mol}} \times 6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

X = photometrisch bestimmte Plasmid-DNA-Konzentration in g/ $\mu$ l

Y = Plasmidgröße plus Insert-Länge in Basenpaaren

660 g/mol = durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids

$6,023 \times 10^{23}$  = Avogadro-Zahl (Anzahl der Kopien/mol)

### 3.12.1.7. Erstellung der Standardkurven

Nach der Kalkulation der Kopienzahl, wurden von jedem Plasmid Verdünnungen mit einer Ausgangskonzentration von  $10^8$  Kopien/ $\mu$ l hergestellt. Diese wurden anschließend seriell um den Faktor 10 bis auf den theoretischen Wert von 1 Kopie/ $\mu$ l ( $10^0$ ) verdünnt. Cp-Werte jeder Verdünnungsstufe ( $10^8$ - $10^0$ ; Mittelwert aus je drei Parallelansätzen) wurden mit den zugehörigen Primern in einer real-time RT-PCR im Fluoreszenz-Temperatur-Cycler (LightCycler®, Roche) ermittelt (siehe 3.12.2). Diese Standardmessungen wurden dreimalig, nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen, durchgeführt, um aussagekräftige Werte zu erhalten. Im Anschluss an jede dieser real-time RT-PCRs wurde automatisch durch die integrierte LightCycler®-Software eine Schmelzkurve erstellt (65 °C für 15 sec, Anstieg um 0,1 °C/sec auf 95 °C, kontinuierliche Fluoreszenzmessung), anhand derer die Produkte und damit die Primerspezifität überprüft wurden. Gleichzeitig generierte das Programm aus den gemittelten Cp-Werten der drei Parallelansätze jeder Verdünnungsstufe ( $10^8$ - $10^0$ ) eine lineare Regressionsgerade inklusive der Geradengleichung. Nur wenn deren negative Steigung zwischen -3,3 und -3,9 lag, bedeutete dies eine annehmbare Effizienz von 1,8-2,0 und die gemessenen Cp-Werte wurden in ein Excel-Datenblatt übertragen. Aus den insgesamt neun Cp-Werten einer jeden Verdünnungsstufe ( $10^8$ - $10^0$ ) wurde in Excel der Mittelwert berechnet und für jede Zielsequenz eines Primerpaares eine individuelle Standardkurve (lineare Regressionsgerade) erstellt.

Mit Hilfe dieser Standardkurven konnten daraufhin die in den Proben gemessenen Cp-Werte bestimmten Kopienzahlen zugeordnet werden. Die ermittelte Kopienzahl verhält sich dabei proportional zur ursprünglich für die reverse Transkription eingesetzten RNA-Konzentration. Durch die quantitative real-time RT-PCR wird also mit Hilfe individueller Standardkurven die in den Proben enthaltene Transkriptmenge in 20 ng RNA bestimmt.

### 3.12.2. Real-time RT-PCR-Messungen

Die real-time RT-PCRs wurden im Fluoreszenz-Temperatur-Cycler durchgeführt. Die Komponenten eines Reaktionsansatz sind im Folgenden aufgeführt:

<b>20 ng cDNA</b>	1 µl
<b>10x DNA Master SYBR Green I</b>	1 µl
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1,2 µl
<b>10 µM forw. Primer</b>	0,5 µl
<b>10 µM rev. Primer</b>	0,5 µl
<b>Aqua dest.</b>	5,8 µl

Die PCRs liefen als „touch down“-PCRs (Messung der Fluoreszenz nach jedem Zyklus bei 72 °C oder bei einer zuvor aus der Schmelzkurve der PCR-Produkte ermittelten spezifischen Messtemperatur (MT)) unter den folgenden Bedingungen:

	95 °C	10 min	} 40 Zyklen
	95 °C	10 sec	
„touch down“ (siehe MT Tab. 4)	5 sec		
	72 °C	15 sec	
	4 °C	∞	

Die Anlagerung der Primer (Annealing) erfolgte für jedes Primerpaar bei einer spezifischen, den jeweiligen Schmelzpunkten angepassten, Temperatur. Dabei wurde die Annealing-Temperatur (AT) in den ersten 6 Zyklen um jeweils 1 °C abgesenkt, um besonders stringente Bedingungen für die Primeranlagerung während der ersten Zyklen sicherzustellen. Die AT und MT der in dieser Arbeit verwendeten Primer sind unter 3.12.1.1 zu finden.

Im Anschluss an jede real-time PCR wurde automatisch eine Schmelzkurve erstellt, anhand derer die Produkte und damit die Primerspezifität überprüft wurden.

### 3.13. Statistische Analysen

Die Analyse der Glukose- und Insulin-Daten aus der HFD-Studie erfolgte statistisch mittels einfaktorieller ANOVA („two-way analysis of variance“) und anschließendem Bonferroni-post hoc-Test für die zeitabhängigen Vergleiche der vier Gruppen. Für diese Berechnungen wurde das Programm SPSS 10.0 verwendet. Die Daten der sonstigen stoffwechselphysiologischen Messungen (Triglyzeride, freie Fettsäuren, Cholesterin) der vier Gruppen



dieser Fütterungsstudie wurden nach Berechnung der jeweiligen Mittelwerte mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests nach Student für unverbundene (unabhängige) Stichproben auf signifikante Unterschiede hin überprüft und graphisch in Säulendiagrammen dargestellt.

Die Ergebnisse der INS-1E-Experimente aus mindestens 10 unabhängig voneinander durchgeführten Testreihen sind ebenfalls nach Errechnung der Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) graphisch in Säulendiagrammen dargestellt. Die statistische Signifikanzprüfung erfolgte auch in diesem Fall durch zweiseitigen t-Test nach Student für unverbundene (unabhängige) Stichproben. Als signifikant gelten für alle Tests Werte  $p < 0,05$ . Für die Berechnungen der Mittelwerte ( $\pm$  SEM) und der t-Tests nach Student sowie für die Erstellung sämtlicher Diagramme wurde die Excel Software von Microsoft benutzt. Die Analyse der Glukose- und Insulindaten der HFD-Studie erfolgte mit SPSS 10.0.

### **3.14. Puffer und Lösungen**

<b><u>Puffer/ Lösung</u></b>	<b><u>Inhaltsstoffe</u></b>
<b>INS-1E-Medium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RPMI 1640 (mit 11,1 mM Glukose)</li> <li>▪ 10 % FCS</li> <li>▪ 100 µg/ml Streptomycin + 100 U/ml Penicillin</li> <li>▪ 10 mM Hepes</li> <li>▪ 2 mM L-Glutamin</li> <li>▪ 1 mM Natriumpyruvat</li> <li>▪ 50 µM β-Mercaptoethanol</li> </ul> (alternativ Zugabe von 100 bzw. 300 µg/ml Geneticin (G418) für die stabile Plasmid-Transfektion); Lagerung bei 4°C
<b>Magermedium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ siehe INS-1E-Medium (ohne FCS &amp; Antibiotika)</li> </ul>
<b>Einfriermedium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 9 ml FCS + 1 ml DMSO; sterilfiltriert</li> </ul>
<b>KRBH-Puffer (pH 7,4)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 129 mM NaCl</li> <li>▪ 10 mM Hepes</li> <li>▪ 4,8 mM KCl</li> <li>▪ 5 mM NaHCO<sub>3</sub></li> <li>▪ 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>▪ 1,2 mM MgSO<sub>4</sub></li> <li>▪ 1 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</li> <li>▪ 0,1 % BSA</li> </ul>
<b>Lysispuffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 25 mM Tris Base</li> <li>▪ 0,1 mM EDTA</li> <li>▪ 1 mM DTT</li> <li>▪ 1 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail</li> </ul> Lagerung bei 4 °C; vor Gebrauch mit DTT & Proteasehemmer versetzen

- Transferpuffer**
- 5,8 g Tris Base
  - 29,0 g Glycin
  - 3,0 g SDS (oder 10 ml 10%ige SDS-Lösung)
  - 200 ml Methanol
  - ad 1 l Aqua dest.
- Blocking Buffer**
- 2,5 g Magermilchpulver
  - 50 ml 1x PBS
  - 0,1 % Tween 20
- Primärantikörper-Lösung**
- 15 ml Blocking Buffer
  - 30 µl „goat ACBP S-20“ Antikörper + 30 µl „goat β-Actin I-19“ Antikörper (Santa Cruz)
- Sekundärantikörper-Lösung**
- 15 ml Blocking Buffer
  - 15 µl „anti-goat Ig“-Antikörper, HRP konjugiert (Santa Cruz)
- LB-Medium**
- 10 g LB Broth Base
  - (7,5 g Agar Agar)
  - ad 1 l Aqua dest.
- Autoklavieren, Zugabe von Carbenicillin (100 µg/ml); zur Herstellung von LB-Agar-Platten Medium mit Agar Agar ansetzen, gießen und aushärten lassen; Lagerung bei 4 °C
- 50x TAE**
- 242 g Tris-Base
  - 57,1 ml konz. Essigsäure
  - 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
  - ad 1 l Aqua dest.
- vor Gebrauch 1:50 verdünnen
- Agarose-Gel**
- 1,7 g Agarose bzw. Low Melting Agarose
  - 100 ml Aqua dest.
- Auftragspuffer**
- 5 ml Glycerol
  - 25 mg Bromphenolblau
  - 25 mg Xylencyanol FF
  - ad 10 ml Aqua dest.

### 3.15. Chemikalien und Reagenzien

- |   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| ▪ 100 bp DNA Ladder                                     | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| ▪ Antarctic Phosphatase & Buffer                        | New England Biolabs, MA, USA          |
| ▪ Agar Agar reinst                                      | Merck, Darmstadt                      |
| ▪ Agarose   | Gibco BRL Life Technologies, Scotland |
| ▪ Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents | GE Healthcare, Buckingham, UK         |
| ▪ Ampli Taq Gold  | Perkin Elmer, Weiterstadt             |
| ▪ AMPS  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen            |

- Aqua dest. Gibco (Invitrogen), CA, USA
- $\beta$ -Mercaptoethanol Gibco (Invitrogen), CA, USA
- *Bam*HI New England Biolabs, MA, USA
- *Bgl*III New England Biolabs, MA, USA
- BioRad Protein Assay BioRad Laboratories GmbH, München
- Bromphenolblau Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- BSA minimum 98 % Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Carbenicillin Sodium Salt Roth, Karlsruhe
- Cholesterin Ecoline S+ DiaSys GmbH, Holzheim
- D(+) Glukose Merck, Darmstadt
- DEPC Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- DMSO Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Dnase Set, RNase-free Qiagen, Hilden
- dNTPs Applied Biosystems (Invitrogen), CA, USA
- DTT Invitrogen, Karlsruhe
- Essigsäure (konzentriert) Merck, Darmstadt
- Ethanol reinst Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- FCS Biochrom, Berlin
- FuGENE transfection reagent Roche, Mannheim
- GeneRuler DNA Ladder (50 bp, 1 kbp, Ladder Mix) Fermentas, ON, Canada
- Geneticin (G418) Invitrogen, Karlsruhe
- Glycerol Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- HCl Merck, Darmstadt
- Hepes p.a. Merck, Darmstadt
- HPLC-Wasser (RNase- & DNase-frei) Invitrogen, Karlsruhe
- Konelab/DPC T Series sCal Thermo Electron Cooperation, Finnland
- LB Broth Base Gibco (Invitrogen), CA, USA
- L-Glutamin PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- Lipofectamine 2000 Invitrogen, Karlsruhe
- Low Melting Agarose Ultra Pure Invitrogen, Karlsruhe
- LightCycler® DNA Fast Start SYBR Green Roche, Mannheim
- Magnesiumchlorid Gibco (Invitrogen), CA, USA
- MES-Puffer Invitrogen, Karlsruhe
- Methanol Merck, Darmstadt
- Milchpulver (5%ig, fettfrei) Reformhaus
- Natriumpyruvat Invitrogen, Karlsruhe
- NEFA C 50t Kit Wako Chemicals GmbH, Neuss
- *NotI* New England Biolabs, MA, USA
- NucleoSpin Plasmid Quick Pure Macherey-Nagel, Düren
- Oligo-dT-Primer Promega, Madison, WI, USA
- PBS PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- pcDNA3.1 (+) Invitrogen, Karlsruhe
- PEI 50 (Polyethylenimin 50 kDa; 40.872-7) Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- PEI 750 (Polyethylenimin 750 kDa; P3143) Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Penicillin/Streptomycin-Lösung PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- pGEM-T Vector System II Promega, WI, USA

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| ▪ Phusion High-Fidelity PCR Kit             | Finnzymes, MA, USA                  |
| ▪ Plasmid Maxi Kit                          | Qiagen, Hilden                      |
| ▪ PMSF                                      | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| ▪ Polyacrylamid                             | Sigma, St.Louis, MO, USA            |
| ▪ polyklonale Primär- & Sekundär-antikörper | Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA |
| ▪ Poinceau S                                | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| ▪ 4x Probenpuffer                           | Invitrogen, Karlsruhe               |
| ▪ Protease Inhibitor Cocktail               | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| ▪ QIAEX II Gel Extraction Kit               | Qiagen, Hilden                      |
| ▪ Rapid Ligation Kit                        | Promega, WI, USA                    |
| ▪ Rat Insulin ELISA Kit                     | Crystal Chem, IL, USA               |
| ▪ RNAlater                                  | Qiagen, Hilden                      |
| ▪ RNeasy Mini Kit                           | Qiagen, Hilden                      |
| ▪ RPMI 1640-Medium                          | PAA Laboratories GmbH, Cölbe        |
| ▪ SeeBlue Plus2 Prestained Standard         | Invitrogen, Karlsruhe               |
| ▪ Seronorm                                  | Roche, Mannheim                     |
| ▪ SOC-Medium                                | Invitrogen, Karlsruhe               |
| ▪ SuperScript™II RNaseH                     | Invitrogen, Karlsruhe               |
| ▪ TEMED                                     | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| ▪ Triglyzeride Ecoline S+                   | DiaSys GmbH, Holzheim               |
| ▪ Tris-Base                                 | Merck, Darmstadt                    |
| ▪ Trypsin/EDTA-Lösung                       | PAA Laboratories GmbH, Cölbe        |
| ▪ Tween 20                                  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| ▪ XL10-Gold Ultracompetent Cells            | Stratagene, CA, USA                 |
| ▪ Xylencyanol FF                            | Sigma-Aldrich, Deisenhofen          |
| ▪ Zero Blunt Topo Cloning Kit               | Invitrogen, Karlsruhe               |

alle weiteren, für diese Arbeit verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt und besaßen den Reinheitsgrad *p.a.*

### 3.16. Verbrauchsmaterialien

- |  |   |
|--|---|
| ▪ 15- & 50-ml-Zentrifugenröhrchen                | Sarstedt, Nürnberg                        |
| ▪ 2- & 1,5-ml-Reagiergefäße                      | Sarstedt, Nürnberg                        |
| ▪ 0,5-ml-Reagiergefaß                            | Eppendorf, Hamburg                        |
| ▪ 6-well-Platten                                 | Becton Dickinson Labware, NJ, USA         |
| ▪ 12-well-Platten                                | Costar, Corning Incorporated, Corning, NY |
| ▪ 96-well-Platten                                | Nunc GmbH, Wiesbaden                      |
| ▪ BisTris-Fertiggele                             | Invitrogen, Karlsruhe                     |
| ▪ Einmalpipetten, steril, für Zellkultur         | Sarstedt, Nürnberg                        |
| ▪ Glaskapillaren (heparinisiert)                 | Roche, Mannheim                           |
| ▪ Kryoröhrchen                                   | NALGENE, Nalge Comp., N.Y., USA           |
| ▪ LightCycler® Kapillaren                        | Roche, Mannheim                           |
| ▪ Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl)              | Eppendorf, Hamburg                        |
| ▪ Polaroidfilme                                  | Kodak, Köln                               |
| ▪ PVDF membrane filter paper sandwiches (0,2 µm) | Invitrogen, Karlsruhe                     |

- |                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| ▪ T25-/T75-Zellkulturflaschen | Sarstedt, Nürnberg |
| ▪ UVette (Plastikküvetten)    | Eppendorf, Hamburg |
| ▪ Whatmann 3 mm Filterpapier  | Walter, Kiel       |

### 3.17. Geräte

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| ▪ Axiovert 135 (Zentrifuge)                  | Zeiss, Deutschland                 |
| ▪ Biofuge fresco                             | Heraeus Christ GmbH, Osterode      |
| ▪ BioPhotometer                              | Eppendorf, Hamburg                 |
| ▪ Chemidoc                                   | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| ▪ Dynatek Plattenphotometer                  | DYNEX Technologies GmbH, Berlin    |
| ▪ EI9001-XCell II Mini Cell                  | Novex, CA, USA                     |
| ▪ EPOS Analyzer 5060                         | Eppendorf, Hamburg                 |
| ▪ Fluoreszenz-Thermo-Cycler,<br>LightCycler® | Roche, Mannheim                    |
| ▪ Gelkammer horizontal, Horizon              | Invitrogen, Karlsruhe              |
| ▪ Gelkammer vertikal                         | Biometra, Göttingen                |
| ▪ Gene Amp PCR System 2400                   | Perkin Elmer, NJ, USA              |
| ▪ Laminar Flow Bench, Steril Gard Hood       | Baker Comp Inc, Sanford, ME, USA   |
| ▪ Nalgene Cryo 1°C Freezing Container        | NALGENE, Nalge Comp., N.Y., USA    |
| ▪ Neubauer-Zählkammer                        | Marienfeld, Königshofen            |
| ▪ pH-Meter                                   | EYDAM, WTW                         |
| ▪ Pipettus akku                              | Hirschmann                         |
| ▪ Polaroid GelCam                            | Polaroid, St.Albans, U.K.          |
| ▪ Power Pack P25                             | Biometra, Göttingen                |
| ▪ Rocker Platform                            | Bellco Glass Instruments, NJ, USA  |
| ▪ Steri-cult 200 Brutschrank                 | Labotect, Göttingen                |
| ▪ Thermocycler, Gene Amp PCR System<br>2400  | Perkin Elmer, Überlingen           |
| ▪ Thermomixer, 5436                          | Eppendorf, Hamburg                 |
| ▪ Ultraturrax, T25                           | Janke & Kunkel, Staufen            |
| ▪ Varifuge GL                                | Heraeus Christ GmbH, Osterode      |
| ▪ Wasserbad                                  | Köttermann Labortechnik            |
| ▪ XCell II Blot Module                       | Novex, CA, USA                     |

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Stoffwechselphysiologische Auswirkungen einer Hochfettdiät auf Wildtyp-Wistar-Ratten und ACBP-überexprimierende Tiere**

In einer „High Fat Diet“ (HFD)-Studie sollte analysiert werden, welche stoffwechselphysiologischen Auswirkungen eine Hochfettdiät (45 % der kcal aus Fett) auf ACBP-überexprimierende Ratten im Vergleich zu Wildtypen haben und ob signifikante Unterschiede zu Wildtyp- (wt) und transgenen (tg) „Low Fat Diet“-Kontrollgruppen (10 % der kcal aus Fett; LFD) auftreten. Für die Studie erhielten zwei Monate alte Tiere (wt und tg Wistar-Ratten, je n = 7) über einen Zeitraum von vier Wochen freien Zugang zu den Diäten. Anschließend wurden physiologische Parameter im Serum und Plasma, teils nach Glukosetoleranztest (GTT), bestimmt sowie Leberproben für Expressionsanalysen entnommen (siehe 3.1 und 3.1.3). Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen im Tierstall der Universität Kuopio, Finnland, gehalten.

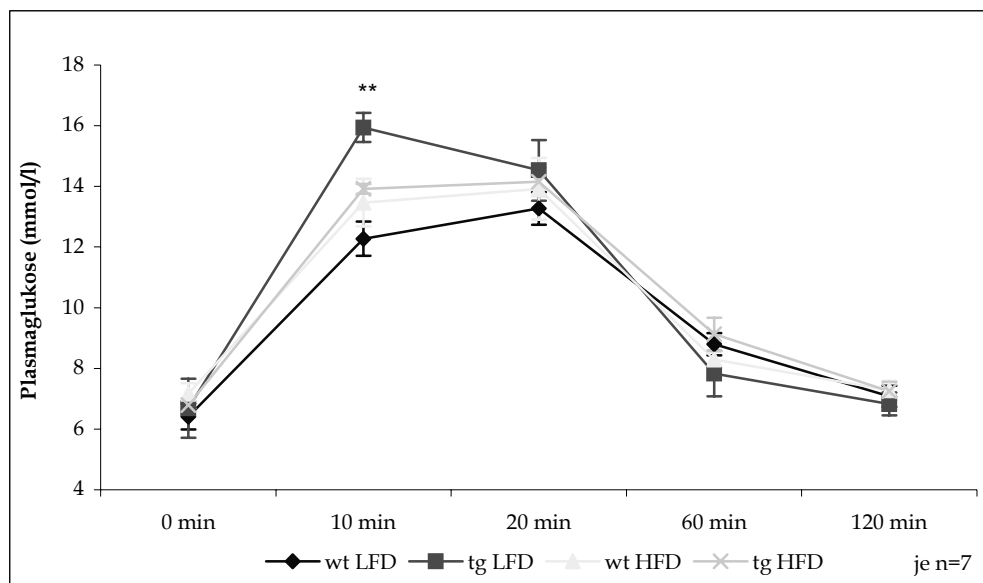
#### **4.1.1. Plasmaglukose und -insulin nach GTT**

Im Anschluss an die einmonatige LFD- bzw. HFD-Fütterung wurde nach 16 h Nahrungskarenz die basale („0 min“) Glukose- und Insulinkonzentrationen im Plasma der Tiere erfasst. Daraufhin folgte durch i.p.-Infusion von 1 g Glukose/kg Körpergewicht ein GTT, bei dem während des Experiments zu definierten Zeitpunkten Blutproben aus der Beinvene der Tiere entnommen wurden, die der Bestimmung der Glukose- und Insulinkonzentrationen im Verlauf des GTT dienen (siehe 3.1.2).

##### **4.1.1.1. Glukose**

Die Bestimmung der Glukose erfolgte im Plasma der Ratten (siehe 3.2.1) und gibt Aufschluss über die basale Blutzuckerkonzentration und über deren Verlauf während des GTT. Die Tiere aller vier Gruppen (wt LFD, tg LFD, wt HFD, tg HFD) weisen nach 16 h Nahrungskarenz zum Probenzeitpunkt „0 min“ und beim Gesamtverlauf des GTT (0-120 min) keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abb. 8 und Tab. 5), wobei sich die gemessenen Plasmaglukosewerte mit denen von (Oikari *et al.* 2008a) decken. Zwar liegen die Glukosekonzentrationen der wt und tg HFD-gefütterten Ratten basal und nach 120 min über denen der LFD-Gruppen, die Anstiege sind jedoch nicht signifikant. Eine Ausnahme bilden 10 min nach Glukoseadministration die ACBP-überexprimierenden Ratten, bei denen unter

LFD eine signifikant höhere Plasmaglukosekonzentration als bei den LFD-Wildtypen messbar ist (wt LFD *vs.* tg LFD,  $p = 0,006$ ).



**Abb. 8: Plasmaglukoseverlauf nach GTT in Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-post hoc-Test); \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$  für wt LFD *vs.* tg LFD; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

**Tab. 5: tabellarische Auflistung der mittleren Plasmaglukosekonzentrationen (mmol/l) der vier Gruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten im Verlauf des GTT**

Zeitpunkt	0 min	10 min	20 min	60 min	120 min
wt LFD	6,41	12,27	13,27	8,80	7,08
tg LFD	6,69	15,94	14,53	7,83	6,83
wt HFD	7,16	13,46	13,91	8,30	7,28
tg HFD	6,79	13,92	14,15	9,12	7,36

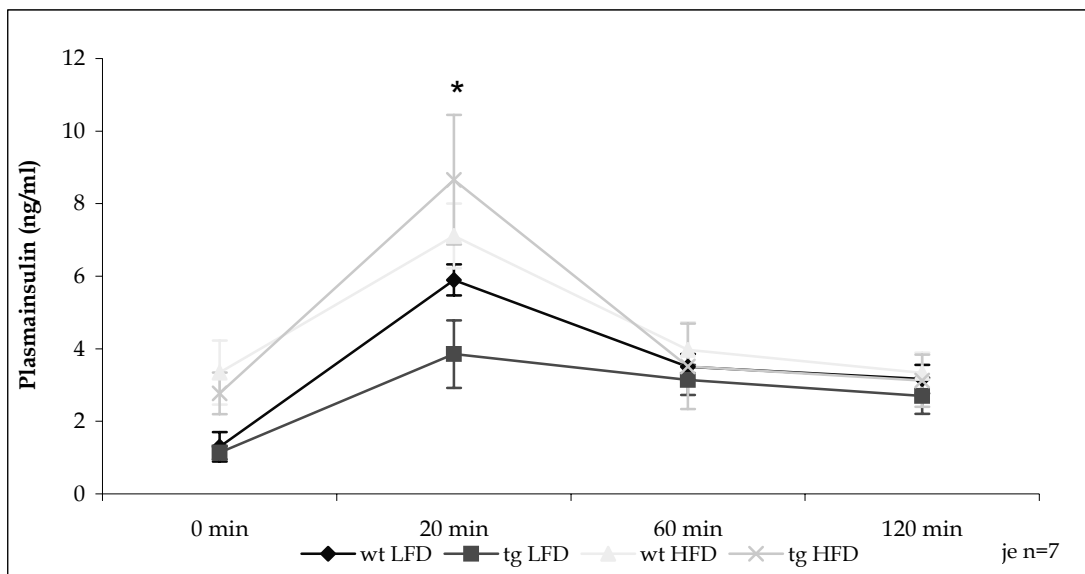
#### 4.1.1.2. Insulin

Plasmaproben für die Insulinbestimmung (siehe 3.2.2) wurden ebenfalls vor (0 min) sowie 20, 60 und 120 min nach i.p.-Administration von Glukose genommen.

Wie in Abb. 9 zu sehen und in Tab. 6 zusammengefasst, weisen die HFD-gefütterten wt und tg tendenziell höhere basale (0 min) Insulinkonzentrationen auf als die LFD-Gefütterten. Der Anstieg ist jedoch für keine der beiden Gruppen (wt HFD, tg HFD) im Vergleich zur

entsprechenden LFD-Kontrollgruppe signifikant. Diese Tendenz zeigt sich ebenfalls 60 und 120 min nach Glukoseinjektion, obgleich auch dort keine signifikanten Unterschiede durch die HFD auftreten. Daher führt der Vergleich des Gesamtverlaufs der Plasmainsulinkonzentration (0-120 min) der tg, LFD-gefütterten Ratten mit dem der wt, LFD-Kontrollgruppe nicht zu einer signifikanten Reduktion (wt LFD *vs.* tg LFD,  $p = 0,086$ ).

20 min nach Glukoseadministration sind für die ACBP-überexprimierenden, HFD-Tiere hingegen signifikant höhere Plasmainsulinkonzentrationen als für die LFD-gefütterten Ratten messbar ( $p = 0,037$ ; Abb. 9). Für den Gesamtverlauf ist der Anstieg jedoch nicht signifikant (tg LFD *vs.* tg HFD,  $p = 0,082$ ).



**Abb. 9: Plasmainsulinverlauf nach GTT in Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-post hoc-Test); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$  für tg LFD *vs.* tg HFD; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

**Tab. 6: tabellarische Auflistung der mittleren Plasmainsulinkonzentrationen (ng/ml) der vier Gruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten im Verlauf des GTT**

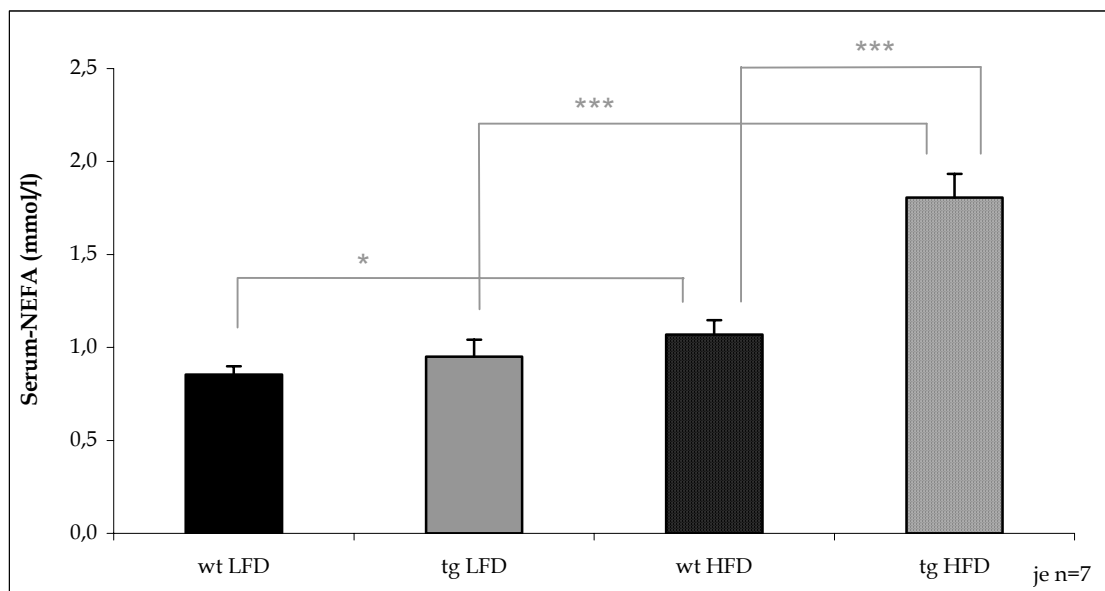
Zeitpunkt	0 min	20 min	60 min	120 min
<b>wt LFD</b>	1,295	5,898	3,501	3,164
<b>tg LFD</b>	1,136	3,854	3,141	2,703
<b>wt HFD</b>	3,343	7,113	3,968	3,335
<b>tg HFD</b>	2,773	8,660	3,513	3,120



#### 4.1.2. Serumgehalt an freien Fettsäuren (NEFA/FFA)

Die Bestimmung der freien Fettsäuren erfolgte nach 16 h Nahrungskarenz aus dem Serum der Tiere wie unter 3.2.3 beschrieben.

Unter LFD ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen und den ACBP-überexprimierenden Ratten (Abb. 10 und Tab. 7). Durch die Fütterung der HFD weisen die wt und auch die tg im Vergleich zu ihren LFD-Kontrollgruppen aber signifikant höhere Werte auf. So führt die HFD bei den wt zu einem 25%igen Anstieg der Serumkonzentration an FFA (wt LFD vs. wt HFD,  $p = 0,029$ ), bei den Transgenen sogar zu einer signifikanten Steigung um 114 % (tg LFD vs. tg HFD,  $p < 0,001$ ). Vergleicht man ACBP-überexprimierende Tiere und wt unter HFD-Bedingungen, so ist der Gehalt an FFA im Serum der tg signifikant um 90 % höher als bei den wt (wt HFD vs. tg HFD,  $p < 0,001$ ).



**Abb. 10: Serumgehalt an freien Fettsäuren in Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

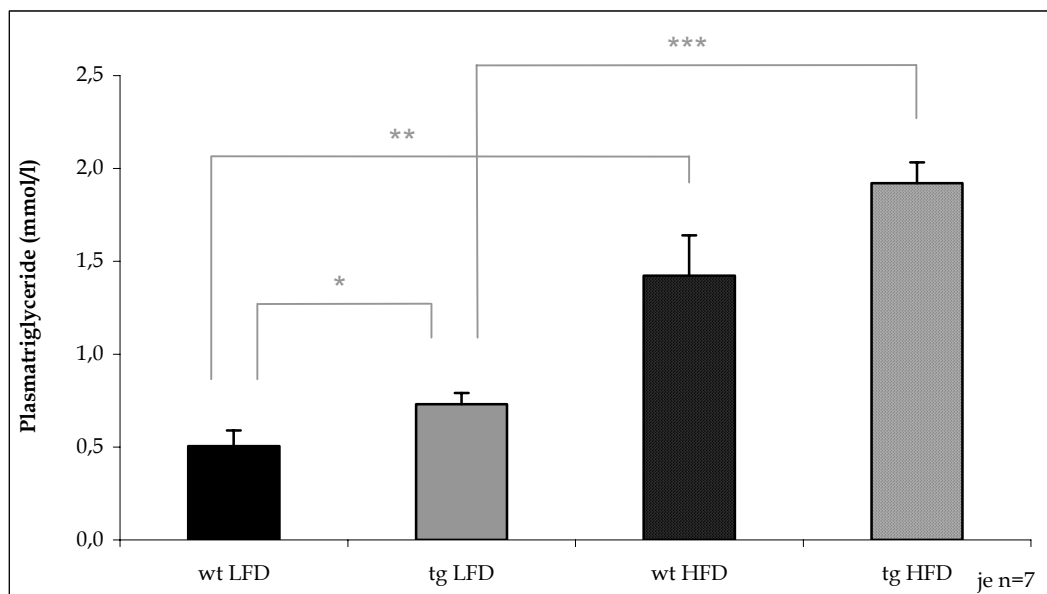
**Tab. 7: tabellarische Auflistung der Serum-NEFA der vier Gruppen (Mittelwerte  $\pm$  SEM)**

	wt LFD	tg LFD	wt HFD	tg HFD
Serum-NEFA (mmol/l)	0,853 $\pm$ 0,045	0,951 $\pm$ 0,091	1,069 $\pm$ 0,079	2,035 $\pm$ 0,255

### 4.1.3. Plasmatriglyzeride

Die Messung der Triglyzeride erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben und spiegelt die Konzentration im Plasma nach einmonatiger Diät wider. Zwischen den vier Gruppen zeigen sich teils deutliche Unterschiede (Abb. 11 und Tab. 8).

Die ACBP-überexprimierenden Tiere haben nach LFD signifikant höhere Plasmawerte als die wt (wt LFD *vs.* tg LFD,  $p = 0,044$ ). Vergleicht man die Plasmatriglyzeridkonzentrationen der tg unter Niedrig- und Hochfettdiät, so zeigen diese nach HFD signifikant um 232 % erhöhte Werte (tg LFD *vs.* tg HFD,  $p < 0,001$ ). Noch prominenter ist dieser Unterschied bei den Wildtypen – so steigt der Plasmatriglyzeridspiegel dieser Ratten nach HFD signifikant um 282 % (wt LFD *vs.* wt HFD,  $p = 0,003$ ). Unter HFD ist der Anstieg der Plasmatriglyzeride bei den tg im Vergleich zu den wt, wie er bereits unter LFD-Bedingungen auftrat, ebenfalls tendenziell vorhanden (wt HFD *vs.* tg HFD,  $p = 0,117$ ).



**Abb. 11: Plasmatriglyzeride in Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

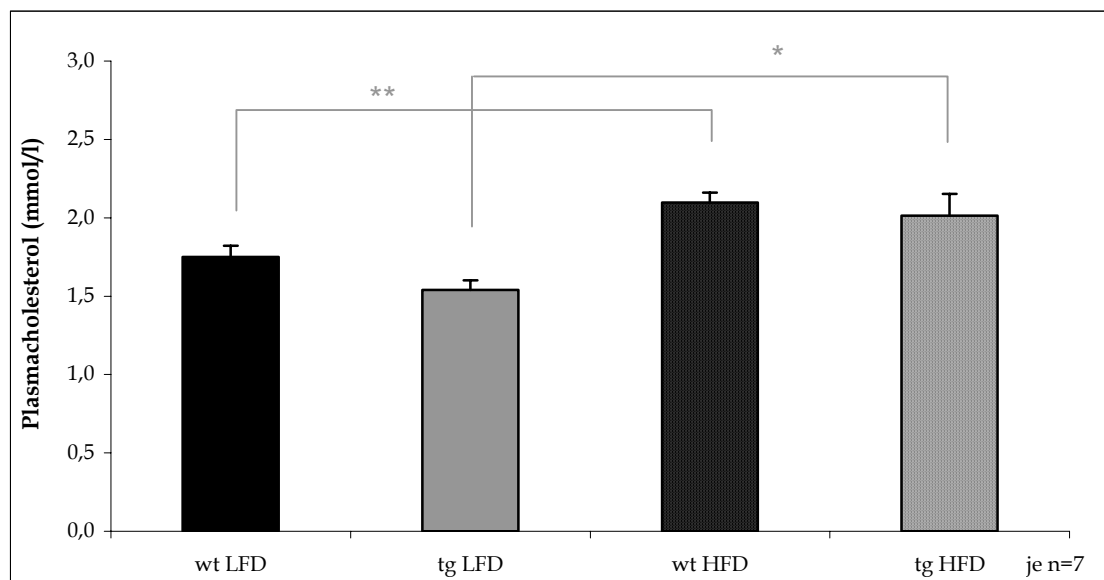
**Tab. 8: tabellarische Auflistung der Plasma-TG der vier Gruppen (Mittelwerte  $\pm$  SEM)**

	wt LFD	tg LFD	wt HFD	tg HFD
Plasma-TG (mmol/l)	0,505 $\pm$ 0,085	0,732 $\pm$ 0,059	1,422 $\pm$ 0,218	1,698 $\pm$ 0,241

#### 4.1.4. Cholesterin

Die Cholesterinbestimmung erfolgte, wie die der Triglyzeride, aus dem Plasma von gefütterten Tieren nach vierwöchiger Diät und ist unter 3.2.4 beschrieben.

Wie in Abb. 12 grafisch dargestellt und in Tab. 9 zusammengefasst, steigen die Plasma-cholesterinwerte sowohl bei den wt als auch bei den ACBP-überexprimierenden Ratten durch die HFD im Vergleich zu den entsprechenden Gruppen unter LFD signifikant an. So zeigen die wt um 20 % erhöhte Cholesterinspiegel nach HFD (wt LFD *vs.* wt HFD,  $p = 0,004$ ), bei den tg führt diese Diät sogar zu einem Anstieg um 31 % (tg LFD *vs.* tg HFD,  $p = 0,012$ ). Zwischen den LFD-Gruppen, wie auch zwischen den HFD-Wildtypen und -Transgenen finden sich hingegen keine signifikanten Veränderungen in der Cholesterinkonzentration der Tiere. Allerdings haben die tg LFD-Ratten im Vergleich zu den Wildtypen eine deutliche Tendenz zu verringertem Plasmacholesterin (wt LFD *vs.* tg LFD,  $p = 0,054$ ).



**Abb. 12: Plasmacholesterin in Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

**Tab. 9: tabellarische Auflistung des Plasmacholesterins der vier Gruppen (Mittelwerte  $\pm$  SEM)**

	wt LFD	tg LFD	wt HFD	tg HFD
Plasmacholesterin (mmol/l)	1,751 $\pm$ 0,071	1,540 $\pm$ 0,062	2,097 $\pm$ 0,064	2,013 $\pm$ 0,140

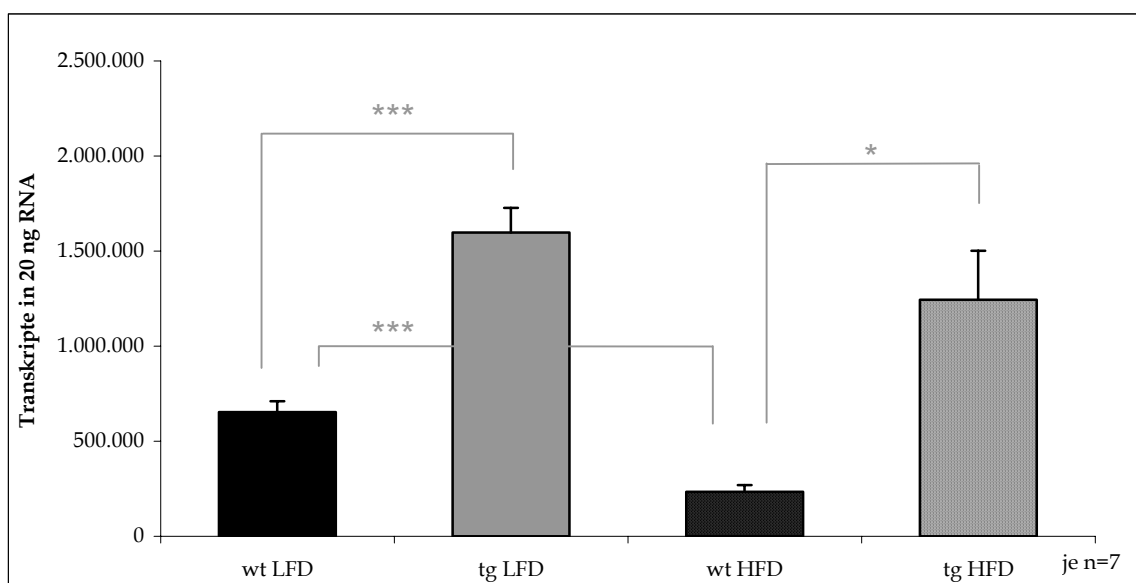
## 4.2. Transkriptionelle Veränderungen durch die Hochfettdiät in der Leber

### 4.2.1. ACBP

Zu den stoffwechselphysiologischen Daten der Tiere sollten Transkriptionsanalysen einen Einblick in die zellulären Vorgänge unter den gewählten Ernährungsbedingungen geben. Aufgrund der zentralen Rolle im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel wurden Leberproben der Ratten aller vier Gruppen (wt LFD, tg LFD, wt HFD, tg HFD) nach Abschluss der HFD-Studie, wie unter 3.1.3 beschrieben, genommen und aufgearbeitet.

Zunächst wurde die ACBP-Überexpression in den tg Tieren sowohl auf mRNA-Ebene durch quantitative real-time RT-PCR (siehe 3.12), als auch auf Proteinebene mittels Western Blot (siehe 3.9) überprüft.

Wie der Abb. 13 entnommen werden kann, haben die tg Ratten sowohl unter LFD-, als auch unter HFD-Bedingungen auf Transkriptionsebene signifikant höhere ACBP-Level als die wt (wt LFD *vs.* tg LFD,  $p < 0,001$ ; wt HFD *vs.* tg HFD,  $p = 0,011$ ). Interessanterweise ist die ACBP-Expression bei den tg durch die HFD tendenziell, bei den wt signifikant, um mehr als 50 %, verringert (wt LFD *vs.* wt HFD,  $p < 0,001$ ).

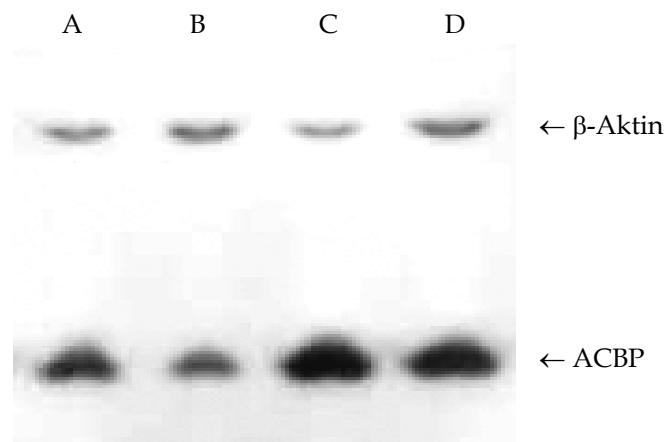


**Abb. 13: Durch quantitative real-time RT-PCR bestimmte ACBP-Expression in der Leber von Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät.** Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

Wie der Western Blot zeigt, sind neben den signifikant erhöhten ACBP-Transkriptmengen auch die ACBP-Proteinkonzentrationen in der Leber der tg Tieren im Vergleich zu den wt,

sowohl bei den LFD- als auch bei den HFD-gefütterten Ratten nachweisbar (Abb. 14; vergleiche Spur A & C sowie B & D). Die auf mRNA-Ebene signifikant reduzierte ACBP-Expression der wt unter HFD bestätigt sich auf Proteinebene (vergleiche Spur A & B). Zudem lässt sich auch die tendenziell reduzierte ACBP-Transkriptmenge der tg nach Fütterung mit der HFD im Western Blot dokumentieren (vergleiche Spur C & D).

Die durch Pfeile gekennzeichneten Signale befinden sich auf Höhe der erwarteten Proteingrößen von 42 kDa für  $\beta$ -Aktin und 10 kDa für ACBP. Durch die simultane Detektion von ACBP und  $\beta$ -Aktin konnte die eingesetzte Gesamtproteinmenge überprüft und gleichzeitig die Unterschiede in der detektierten ACBP-Proteinkonzentration belegt werden.



**Abb. 14: Western Blot zum Nachweis der ACBP- und  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge in der Leber von Wildtyp- und transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät.**

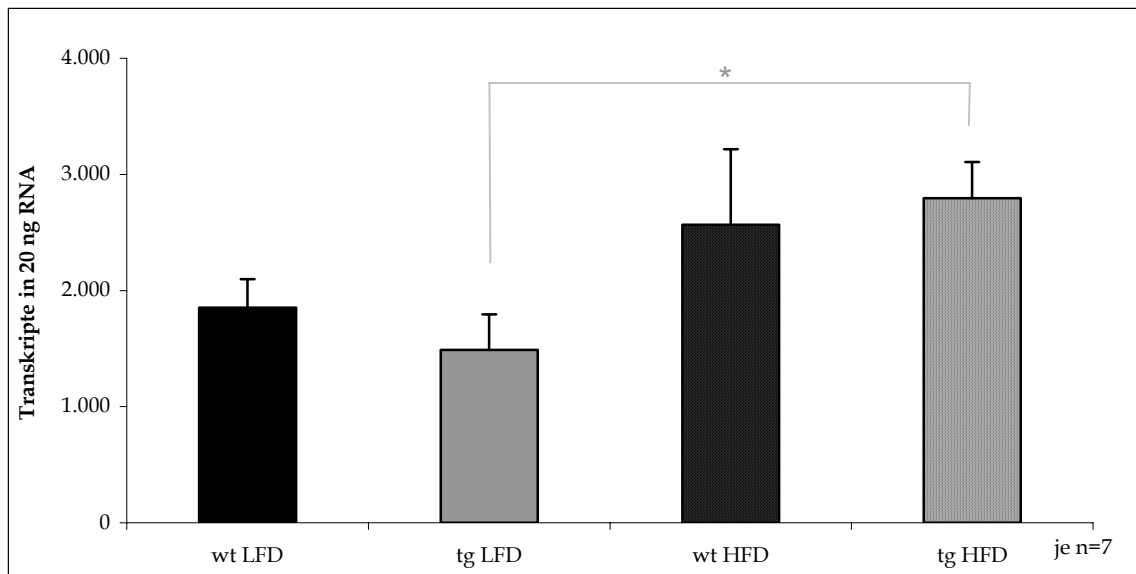
A: wt LFD; B: wt HFD; C: tg LFD; D: tg HFD (beachte: andere Reihenfolge als in Abb. 13)  
25  $\mu$ g Gesamtprotein/Spur wurden in einem 10%igen BisTris-Gel durch 30 min Elektrophorese bei 200 V der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Proteinnachweis erfolgte mit den spezifischen Antikörpern „goat ACBP S-20“ (1:500) und „goat  $\beta$ -Actin I-19“ (1:500) und dem HRP konjugierten „anti-goat Ig“-Antikörper (1:1000; alle Santa Cruz) über Chemilumineszenz. wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

#### 4.2.2. PPARs und SREBP-1c

Quantitative real-time RT-PCR-Messungen (siehe 3.12) ergaben zwischen wt und tg keine signifikanten Unterschiede in der Expression von PPAR- $\alpha$  und - $\delta$  unter den gewählten diätetischen Bedingungen sowie zwischen wt und tg (siehe Tab. 10; Kapitel 4.2.3).

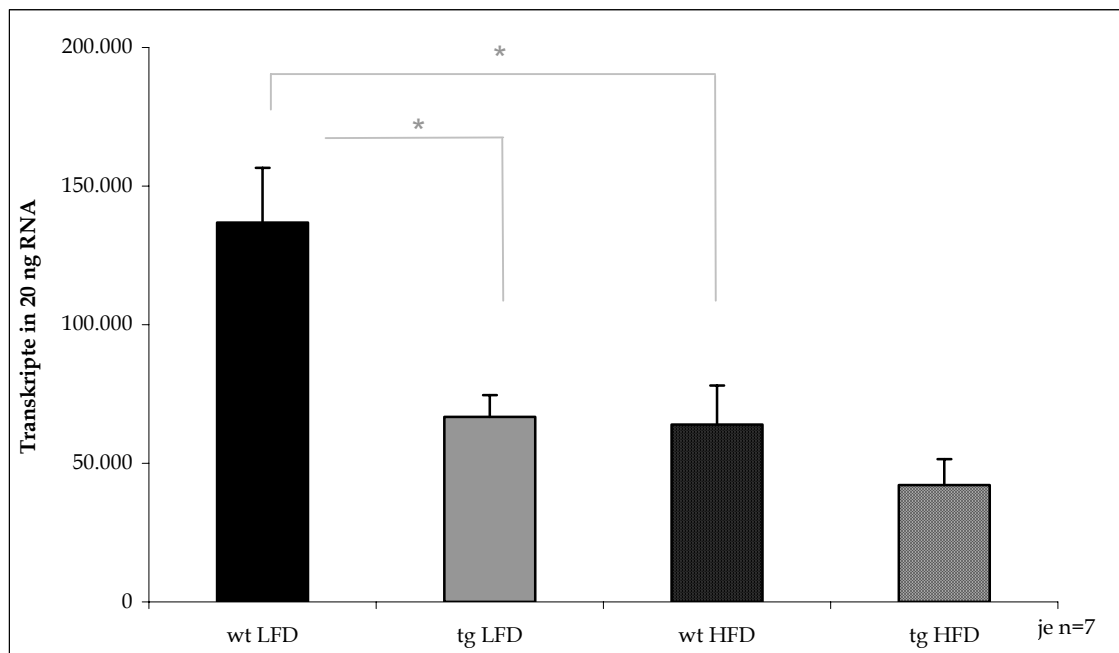
Hingegen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der PPAR- $\gamma$ -Expression in der Leber der ACBP-überexprimierenden Tiere durch die vierwöchige HFD im Vergleich zur LFD (siehe Abb. 15, tg LFD *vs.* tg HFD,  $p = 0,022$ ). Auch bei den wt ist diese Erhöhung auf mRNA-Ebene

messbar, jedoch nicht signifikant (wt LFD *vs.* wt HFD). Zwischen den LFD-gefütterten wt und den tg, die ebenfalls die LFD erhalten haben, gibt es zudem eine Tendenz zu verringerter PPAR- $\gamma$ -Expression unter dem Einfluss der ACBP-Überexpression (Abb. 15, wt LFD *vs.* tg LFD).



**Abb. 15: Durch quantitative real-time PCR bestimmte PPAR- $\gamma$ -Expression in der Leber von Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät.** Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

Die Ergebnisse der mRNA-Messungen für den Transkriptionsfaktor SREBP-1c in der Leber der Tiere, ergab dessen höchste Expression bei den LFD-gefütterten Wildtypen (Abb. 16). Durch die ACBP-Überexpression in den tg sinkt die Transkriptmenge unter LFD signifikant um ca. 51 % (wt LFD *vs.* tg LFD,  $p = 0,011$ ). Diese Tendenz ist auch zwischen den wt und den tg nach HFD erkennbar, jedoch nicht signifikant (wt HFD *vs.* tg HFD). Nach HFD-Fütterung sinkt die SREBP-1c-Expression bei den wt im Vergleich zu den LFD-Wildtypen signifikant (wt LFD *vs.* wt HFD,  $p = 0,011$ ). Die HFD senkt auch bei den tg die SREBP-1c-Transkriptmenge verglichen mit der Expression unter LFD. Der Unterschied ist mit  $p = 0,079$  aber nicht signifikant (tg LFD *vs.* tg HFD).



**Abb. 16: Durch quantitative real-time PCR bestimmte SREBP-1c-Expression in der Leber von Wildtyp- & transgenen Ratten nach ein-monatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät.** Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

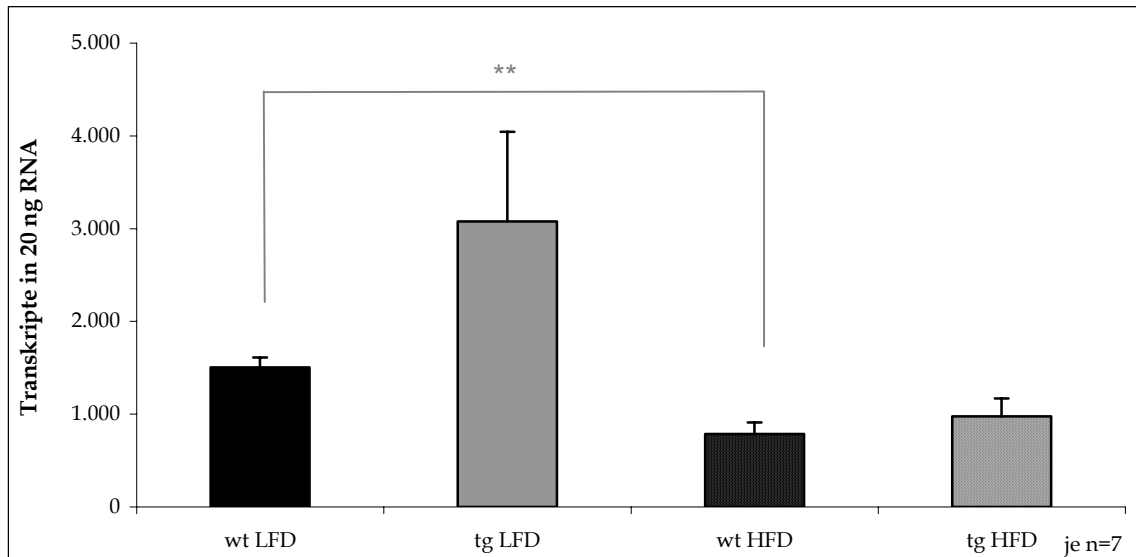
#### 4.2.3. Expression weiterer Transkriptionsfaktoren

Auch die Expression weiterer, mit dem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel assoziierter Transkriptionsfaktoren wurde durch real-time RT-PCR mit Hilfe spezifischer Primer in den Leberproben der Tiere bestimmt (siehe 3.12).

Dabei bleibt die mRNA-Expression von SIRT-1 unter den analysierten Diätbedingungen unverändert und ist unabhängig vom Genotyp (siehe Tab. 10). Auch im Falle von LXR- $\alpha$  treten keine signifikanten Unterschiede auf, allerdings gibt es zwischen den wt und den tg nach vierwöchiger LFD eine deutliche Tendenz zu verringerter LXR- $\alpha$ -Expression in den ACBP-überexprimierenden Ratten (ohne Abb., Tab. 10; wt LFD vs. tg LFD,  $p = 0,072$ ).

Wie die Abb. 17 zeigt kommt es hingegen bei den HFD-gefütterten Wildtypen im Vergleich zu den LFD-Wildtypen zu einer signifikanten Reduktion des mRNA-Level von PGC-1 $\alpha$  (wt LFD vs. wt HFD,  $p = 0,002$ ). Zudem ist die PGC-1 $\alpha$ -Expression in den tg, sowohl unter LFD-, als auch unter HFD-Bedingungen, gegenüber den wt erhöht, wobei diese Unterschiede nicht signifikant sind (Abb. 17, wt LFD vs. tg LFD & wt HFD vs. tg HFD).

Die Expression von HNF-4 $\alpha$  folgt dem selben Muster wie die von PGC-1 $\alpha$ , d.h. die tg Tiere haben tendenziell erhöhte Transkriptzahlen und unter HFD sinkt die Expression, sowohl bei den Wildtypen als auch bei den ACBP-überexprimierenden Tieren. Die Unterschiede sind für HNF-4 $\alpha$  jedoch nicht signifikant (ohne Abb., Tab. 10).



**Abb. 17: Durch quantitative real-time PCR bestimmte PGC-1 $\alpha$ -Expression in der Leber von Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät.** Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

**Tab.10: Tabellarische Übersicht über die durch quantitative real-time RT-PCR bestimmten Transkriptmengen in 20 ng RNA von nicht signifikant veränderten Transkriptionsfaktoren in der Leber der vier Gruppen.** (Mittelwerte  $\pm$  SEM)

	wt LFD	tg LFD	wt HFD	tg HFD
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	903 $\pm$ 183	592 $\pm$ 89	665 $\pm$ 122	956 $\pm$ 287
<b>PPAR-<math>\delta</math></b>	1732 $\pm$ 236	1955 $\pm$ 202	1497 $\pm$ 309	1497 $\pm$ 246
<b>SIRT-1</b>	2878 $\pm$ 534	2869 $\pm$ 343	3564 $\pm$ 897	3567 $\pm$ 479
<b>LXR-<math>\alpha</math></b>	93117 $\pm$ 5934	75508 $\pm$ 2654	79161 $\pm$ 11139	81658 $\pm$ 12957
<b>HNF-4<math>\alpha</math></b>	22012 $\pm$ 3795	35100 $\pm$ 6423	14481 $\pm$ 3042	20407 $\pm$ 5355

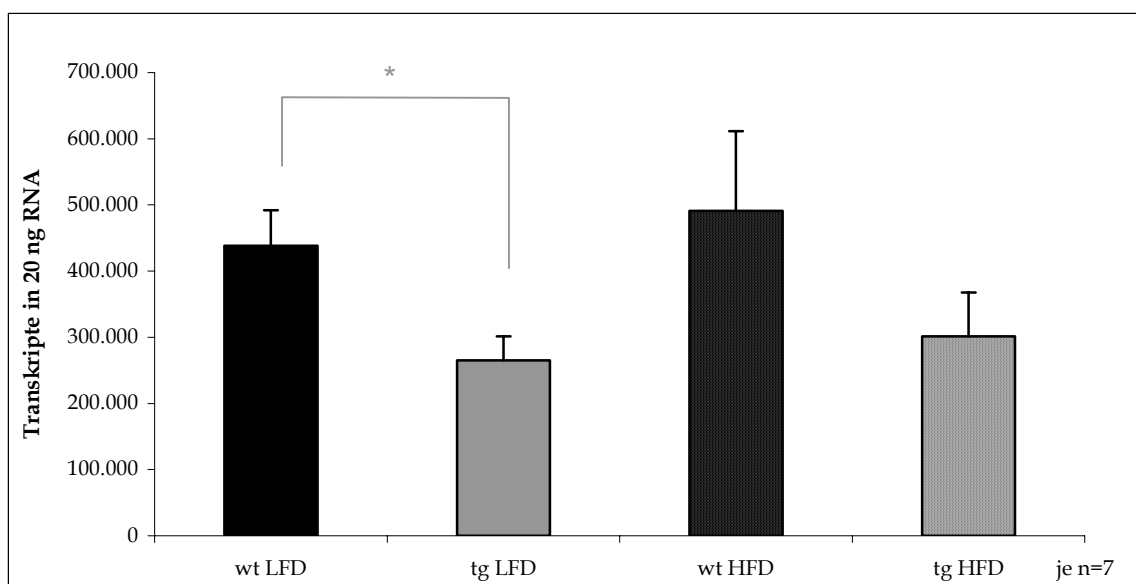


#### 4.2.4. L-FABP

Neben ACBP existiert in der Leber eine spezifische Isoform des FABPs – das L-FABP. Da es, wie ACBP, LCFA-CoA bindet und intrazellulär transportiert, sollte untersucht werden, ob die ACBP-Überexpression einen Einfluss auf die L-FABP-Expression hat und ob sich dessen Transkriptmenge in der Leber in Abhängigkeit von der gefütterten Diät verändert.

Wie in Abb. 18 zu sehen und durch den Vergleich mit Abb. 13 (ACBP-Expression) zu erkennen, liegt das Expressionsniveau von L-FABP in der Leber der wt unter LFD unter dem von ACBP. Durch die ACBP-Überexpression der tg Ratten kommt es im Vergleich zu den wt unter LFD zu einer signifikanten Reduktion der L-FABP-mRNA-Menge (Abb. 18, wt LFD vs. tg LFD,  $p = 0,029$ ). Dieselbe Tendenz zeigen auch die entsprechenden Gruppen unter HFD, allerdings ist der Unterschied dort nicht signifikant (wt HFD vs. tg HFD). Eine, in Abhängigkeit vom Fettanteil in der Diät, verursachte Expressionänderung lässt sich für L-FABP auf Transkriptionsebene nicht ermitteln (vergleiche wt LFD & wt HFD sowie tg LFD & tg HFD).

Die im Falle von ACBP bei den wt nach HFD-Fütterung (siehe Abb. 13) interessanterweise aufgetretene Reduktion in der Transkriptmenge, ist bei L-FABP nicht zu beobachten (vergleiche wt LFD & wt HFD, Abb. 18).



**Abb. 18:** Durch quantitative real-time PCR bestimmte L-FABP-Expression in der Leber von Wildtyp- & transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung mit Niedrig- bzw. Hochfettdiät. Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“

### **4.3. Generierung eines *in vitro*-Zellmodells für die Untersuchung des Einflusses der ACBP-Überexpression auf die Insulinsekretion**

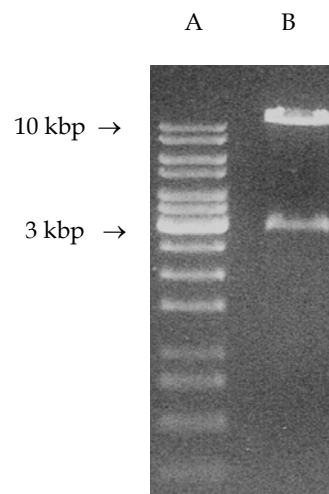
Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein *in vitro*-Modell zu generieren, mit dem die Auswirkungen der ACBP-Überexpression auf zellulärer Ebene in pankreatischen  $\beta$ -Zellen untersucht werden können. Zu diesem Zweck sollte die sekundäre Ratten-Insulinomzelllinie INS-1E (siehe 3.3.1) stabil mit einem ACBP-exprimierenden Vektor transfiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind im Folgenden zusammengefasst.

#### **4.3.1. Konstruktion eines eukaryotischen ACBP-Expressionsplasmids**

##### **4.3.1.1. Klonierung der ACBP-Gensequenz in pcDNA3.1 (+)**

Grundlage für die angestrebte stabile Transfektion sollte ursprünglich die ACBP-Gensequenz von *Mus musculus*, inklusive der endogenen Promotorregion, bilden. Diese stand, kloniert in dem prokaryotischen, 3 kbp Expressionsvektor pBluescript SK(+), in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Für die Klonierung des Gens in das eukaryotische Plasmid pcDNA3.1 (+) wurde der Vektor "pBluescript SK(+)/ACBP gene" zunächst durch *NotI*-Verdau auf das Vorhandensein des 11,4 kbp großen ACBP-DNA-Fragments hin überprüft (detaillierte Vorgehensweise siehe 3.10.2.2).

Wie der Abb. 19 zu entnehmen ist, zeigt die Agarose-Gelelektrophorese Banden in Höhe des Vektors (Spur B, 3 kbp) und auch des Gens (Spur B, > 10 kbp).

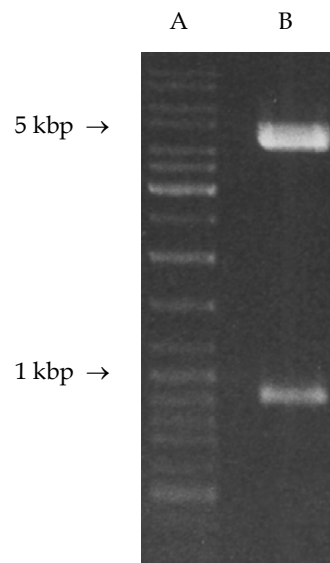


**Abb. 19: Überprüfung des prokaryotischen Vektors "pBluescript SK(+)/ACBP gene"**

Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe im 1,7%igen Agarosegel durch 1 h Elektrophorese bei 100 V

A: 1 kbp-Marker; B: *NotI*-Verdau des Plasmids "pBluescript SK(+)/ACBP gene", wodurch sich das 3 kbp Plasmid und das 11,4 kbp ACBP-Gen der Maus voneinander trennen

Da das ACBP-Gen in den INS-1E-Zellen durch seinen endogenen Promotor reguliert werden sollte, musste aus dem ~ 5,4 kbp großen pcDNA3.1 (+) der plasmideigene CMV-Promotor durch Doppelverdau mit *Bam*HI und *Bgl*II entfernt werden. Beide Restriktionsenzyme besitzen jeweils nur eine definierte Schnittstelle im Vektor, die upstream (*Bgl*II) bzw. downstream (*Bam*HI) des CMV-Promotors liegen. Durch die Restriktion entstehen ein ~ 900 bp-großes DNA-Fragment (CMV-Promotor) sowie das Plasmid „pcDNA3.1 (+) ohne CMV“ mit einer Größe von ~ 4,5 kbp, welche durch Agarose-Gelelektrophorese voneinander getrennt werden können. Die Abb. 20 zeigt das Ergebnis dieses Doppelverdaus.

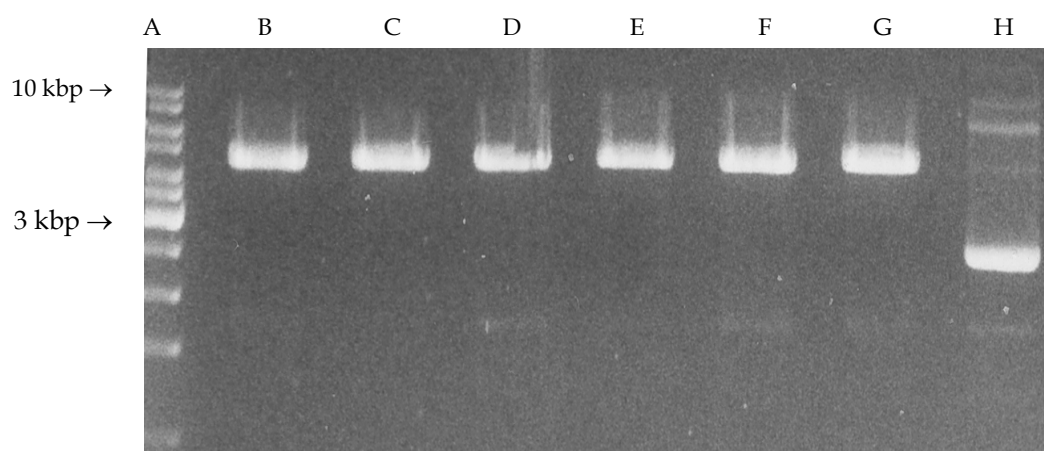


**Abb. 20: Entfernung des CMV-Promotors aus dem eukaryotischen Vektor pcDNA3.1 (+)**  
Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe im 1,7%igen Agarosegel durch 1 h Elektrophorese bei 100 V  
A: DNA Ladder Mix; B: *Bam*HI- & *Bgl*II-Doppelverdau des Plasmids pcDNA3.1 (+), wodurch sich der ~ 900 bp CMV-Promotor und das ~ 4,5 kbp Plasmid voneinander trennen

Anschließend konnte die Vektorbande aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA aufgereinigt und das Plasmid „pcDNA3.1 (+) ohne CMV“ autoligiert werden, denn ein weiterer Vorteil bei der Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Bgl*II besteht in der Kompatibilität der entstehenden überhängenden Enden. Der ligierte Vektor sowie die zuvor ebenfalls aus dem Gel aufgereinigte ACBP-Gensequenz, wurden einem Verdau mit *Not*I und alkalischer Phosphatase unterzogen, wodurch identische überhängende Enden entstanden. Die alkalische Phosphatase verhindert durch die Entfernung der 5'-Phosphate die Autoligation der DNA-Fragmente. Für die folgende Ligation wurden Insert (ACBP-Gen) und Vektor („pcDNA3.1 (+) ohne CMV“) in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander eingesetzt. Durch die Größe des ACBP-Gens führte die empfohlene Vektor-zu-Insert-Ratio von „1 zu 3“

zu keinem Ergebnis. Aus diesem Grund wurden Ligationsansätze mit Vektor-zu-Insert-Verhältnissen von „1 zu 1“ bis „1 zu 10“ und auch von „3 zu 1“ getestet. Letztlich gelang die Ligation und Transformation in ultrakompetente *E. coli*-Zellen durch den Einsatz von 90 ng Plasmid und 25 ng Insert-DNA.

Die erwartete Größe des Plasmids „pcDNA3.1 (+)/ACBP gene“ beträgt ~ 15,9 kbp. Durch die Restriktion mit *NotI* entstehen ein 11,4 kbp- (ACBP-Gensequenz) und ein 4,5 kbp-Fragment (pcDNA3.1 (+)-Vektor). Im ACBP-Gen existieren zusätzlich zwei Schnittstellen für *BglIII*, die Bruchstücke von ~ 2,6 und ~ 8,8 kbp erzeugen. Wie in Abb. 21 zu sehen, finden sich bei Klon 7 (Spur H) die entsprechenden Fragmente nach Doppelverdau mit *NotI* und *BglIII*.



**Abb. 21: Kontrolle isolierter Plasmide nach Ligation und Transformation in *E. coli* zur Generierung des ACBP-tragenden eukaryotischen Expressionsvektors „pcDNA3.1 (+)/ ACBP gene“**

Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe im 1,7%igen Agarosegel nach 1 h Elektrophorese bei 100 V

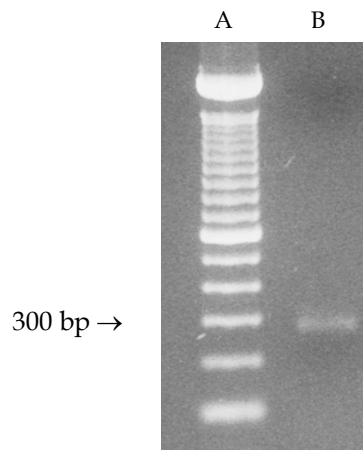
A: 1 kbp-Marker; B-G: *NotI*- und *BglIII*-verdaute, „leere“ pcDNA3.1 (+)-Vektoren; H: *NotI*- und *BglIII*-Verdau eines ACBP-Gen-tragenden Plasmids „pcDNA3.1 (+)/ACBP gene“ (~ 4,5 kbp Plasmid und Restriktionsfragmente des ACBP-Gens bei 2,6, 8,8 und 11,4 kbp)

Nach Anlegen eines Glycerol-Stocks mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP gene“-tragenden *E. coli* (siehe 3.6.5), erneuter Anzucht, Plasmidisolierung und dem Kontrollverdau mit *NotI* und *BglIII* konnte allerdings nur noch der Vektor, nicht aber das Insert (die ACBP-Gensequenz) nachgewiesen werden. Erneute Ligations- und Transformationsversuche scheiterten.

Da somit die Klonierung der vollständigen ACBP-Gensequenz, inklusive des endogenen Promotors, nicht erfolgreich zum Abschluss gebracht werden konnte, sollte die ACBP-cDNA-Sequenz der Ratte die Basis für die Generierung eines ACBP-überexprimierenden Plasmids bilden (siehe 4.3.1.2).

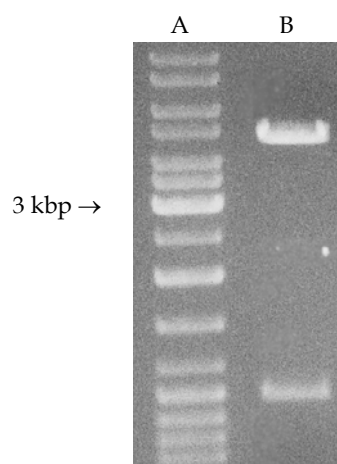
#### 4.3.1.2. Klonierung der ACBP-cDNA in pcDNA3.1 (+)

Die für diese Klonierung verwendete cDNA basiert auf der mRNA-Sequenz von *Rattus norvegicus* und lag im prokaryotischen Expressionsvektor „pBluescript SK(+)/rat ACBP“ vor. Im Anschluss an eine PCR, durch die am 5'- und 3'-Ende *NotI*-Erkennungssequenzen (5'-GCGGCCGC-3') und mit Hilfe des forw. Primers eine Kozak-Sequenz integriert worden waren, entstand durch *NotI*-Verdau ein 285 bp-Fragment (siehe 3.10.2.1; Abb. 22).



**Abb. 22: Überprüfung des ACBP-cDNA-PCR-Produktes nach *NotI*-Restriktionsverdau**  
 Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe im 1,7%igen Agarosegel nach 1 h Elektrophorese bei 100 V  
 A: 100-bp-Marker; B: ACBP-cDNA-PCR-Produkt (285 bp)

Das modifizierte ACBP-cDNA-Fragment wurde in den, ebenfalls *NotI* restrigierten, eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) ligiert. Dies wurde nach Transformation in *E. coli*, anschließender Plasmidisolierung mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 23) und lieferte die erwarteten Banden bei 285 bp und in Höhe des Vektors (5,4 kbp).



**Abb. 23: Überprüfung der Ligation des ACBP-cDNA-Fragmentes in pcDNA3.1 (+)**  
 Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe im 1,7%igen Agarosegel nach 1 h Elektrophorese bei 100 V  
 A: 1 kbp-Marker; B: *NotI*-verdautes 5,4 kbp Plasmid pcDNA3.1 (+) und ACBP-cDNA-Fragment (285 bp)

Durch Sequenzierung der integrierten ACBP-cDNA-Sequenz wurde abschließend sicher gestellt, dass die Orientierung korrekt in 5'-3'-Richtung erfolgt und es während der Klonierung zu keinen Mutationen gekommen ist. Das auf diese Weise konstruierte Expressionsplasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ enthielt somit die proteinkodierende ACBP-Sequenz der Ratte, exprimiert unter dem vektoreigenen, starken CMV-Promotor, und konnte nun für die stabile Transfektion von INS-1E-Zellen eingesetzt werden.

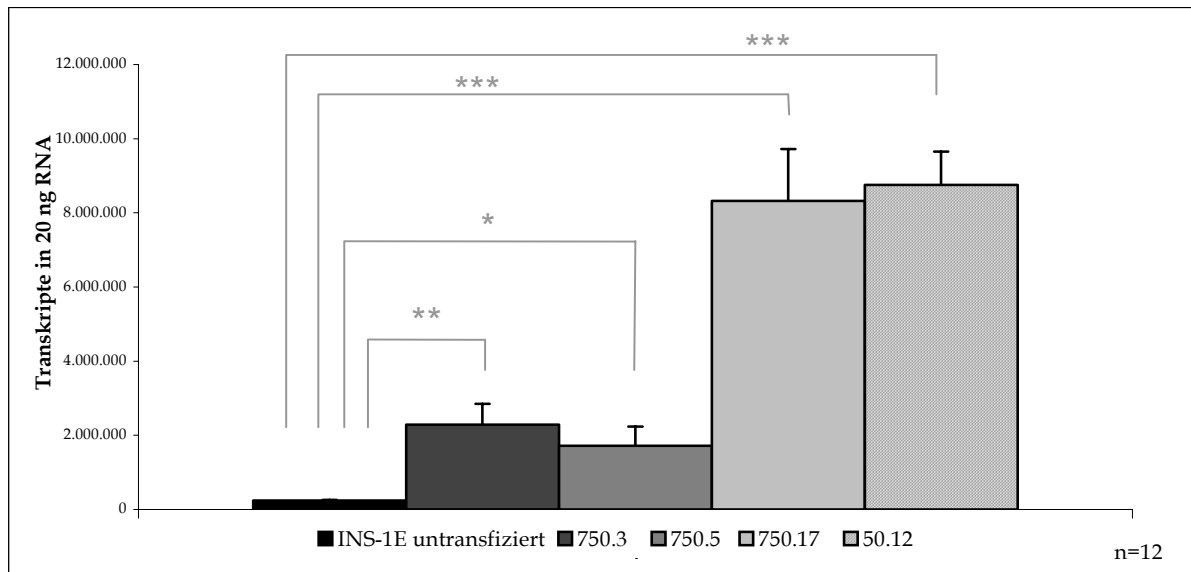
#### **4.3.2. Generierung einer stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinie**

Die Zelllinie INS-1E ist eine verbesserte Variante der INS-1-Zellen, die ursprünglich aus Ratten-Insulinom-Tumorzellen gewonnen worden waren und eine vergleichbare Insulinsekretion wie pankreatische  $\beta$ -Zellen nach Glukosestimulation zeigen (siehe 3.3.1).

Durch die stabile Transfektion dieser Zellen mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ sollte der Einfluss einer ACBP-Überexpression auf die Insulinsekretion und die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren analysiert werden.

Der ausgewählte Vektor pcDNA3.1 (+) besitzt für die stabile Transfektion eukaryotischer Zellen neben einem Ampicillin-, auch ein Neomycin-Resistenzgen. Die minimal lethale Konzentration des Neomycin-Analogons „Geneticin“ (G418) für untransfizierte INS-1E-Zellen liegt bei 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Medium, wie in Vorversuchen durch „dose-to-kill“-Experimente ermittelt werden konnte.

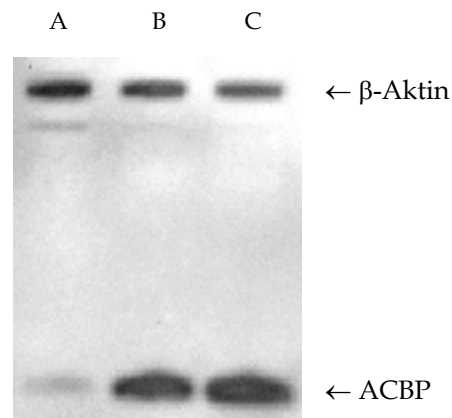
Mit Hilfe des unter 3.10.2.4 beschriebenen Protokolls gelang es vier neomycinresistente Klone anzuziehen (750.3, 750.5, 750.17 und 50.12; benannt nach den eingesetzten Transfektionsreagenzien PEI 750 und PEI 50 sowie der laufenden Nummer) und deren ACBP-Expression mittels quantitativer real-time RT-PCR nach RNA-Isolierung aus den Zellen zu bestimmen (siehe Abb. 24). Unter dem CMV-Promotor des Expressionsplasmids steigt die ACBP-mRNA-Menge in den Klonen 750.3 und 750.5 signifikant um das 9,5- bzw. 7,2-Fache im Vergleich zu untransfizierten Zellen an. Die Transkriptzahl in den Klonen 750.17 und 50.12 ist mit dem  $> 30$ -Fachen nicht nur zwischen den Klonen vergleichbar und ebenfalls signifikant, sondern noch deutlich höher. Da bei der Generierung von stabilen Zelllinien die Integration der Plasmid-DNA immer zufällig in das Wirtsgenom erfolgt und damit die Beeinträchtigung bzw. Stilllegung INS-1E-spezifischer Gene nicht ausgeschlossen werden kann, wurden, anstelle einer stabil, ein Kontrollplasmid exprimierenden Zelllinie, diese beiden Klone miteinander und mit untransfizierten INS-1E verglichen.



**Abb. 24: Überprüfung der ACBP-Expression durch quantitative real-time RT-PCR von untransfizierten & stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zellen.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$ ; \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; 750.3, 750.5, 750.17 & 50.12 = stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien

Der Anstieg der ACBP-mRNA führt auch auf Proteinebene (nachgewiesen mittels Western Blot; siehe 3.9) bei den stabil transfizierten Klonen 750.17 und 50.12 (Abb. 25; Spur B & C) im Vergleich zu den untransfizierten Zellen (Spur A) zu deutlich stärkeren Signalen in Höhe der erwarteten ACBP-Proteingröße von 10 kDa. Durch die simultane Detektion des  $\beta$ -Aktins bei  $\sim 42$  kDa konnte die eingesetzte Gesamtproteinmenge überprüft werden (Abb. 25).



**Abb. 25: Western Blot zum Nachweis der ACBP- und  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge**

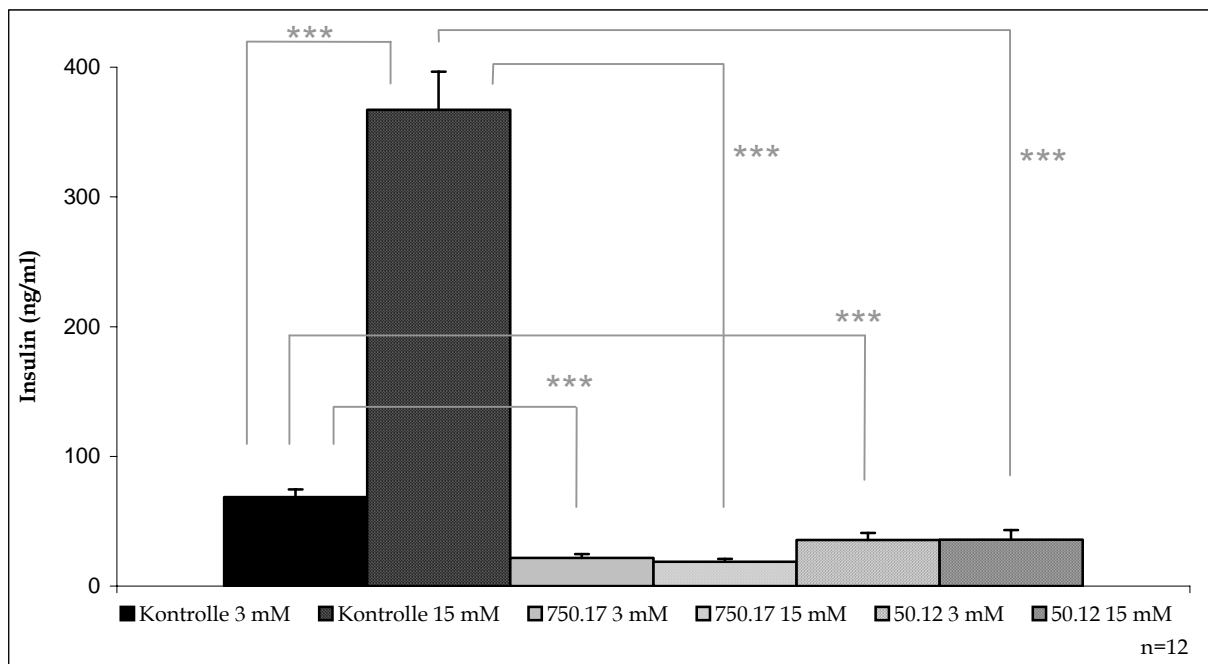
25  $\mu$ g Gesamtprotein/Spur wurden in einem 10%igen BisTris-Gel durch 30 min Elektrophorese bei 200 V der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Proteinnachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern („ACBP S-20“ & „ $\beta$ -Actin I-19“; 1:500) und einem HRP konjugierten Sekundär-Antikörper (alle Santa Cruz) über Chemilumineszenz. A: untransfizierte INS-1E; B: 750.17 ; C: 50.12 (B & C stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien)



### 4.3.3. Einfluss der ACBP-Überexpression auf die Insulinsekretion

Für die Messung der Insulinsekretion wurden sowohl mit untransfizierten wie mit stabil transfizierten INS-1E-Zellen über einen Zeitraum von 10 Passagen Insulinsekretionsexperimente durchgeführt (siehe 3.4.2). Dabei werden die Zellen nach 1 h Inkubation in glukosefreiem, BSA-haltigen KRBH-Puffer, anschließend 1 h lang entweder mit 3 mM oder mit 15 mM Glukose (gelöst in diesem Puffer) stimuliert. Die Insulinfreisetzung wird mittels ELISA bestimmt und erlaubt Rückschlüsse auf das basale Sekretionsverhalten der Zellen (3 mM) sowie auf deren glukosestimulierte Insulinantwort (15 mM).

Die Messung der Insulinsekretion der untransfizierten INS-1E-Zellen ergibt eine Insulinmenge von ~ 69 ng/ml bei der Stimulation mit 3 mM Glukose. Die Insulinfreisetzung dieser Zellen steigt durch den hohen Glukosestimulus (15 mM) signifikant um das 5,3-Fache auf ~ 370 ng/ml (Abb. 26). Die Insulinsekretion der stabil transfizierten, ACBP-überexprimierenden Zelllinien 750.17 und 50.12 liegt sowohl bei geringem, als auch bei hohem Glukosereiz signifikant unter der der Kontrollen ( $p < 0,001$ ). Sie unterscheidet sich leicht zwischen beiden Klonen (750.17: ~ 20 ng/ml; 50.12: ~ 35 ng/ml), bleibt aber unverändert bei 3 und 15 mM.



**Abb. 26: Insulinsekretion von untransfizierten & stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zellen unter basalen (3 mM) und stimulierenden (15 mM) Glukosekonzentrationen**

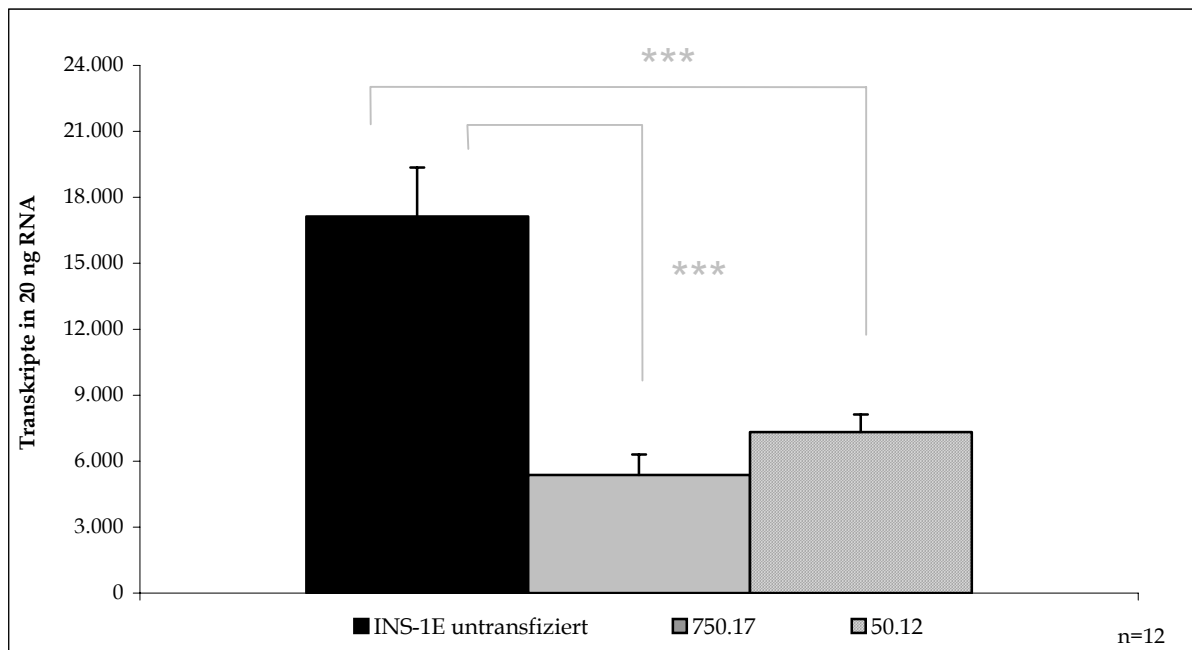
Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; Bestimmung der im Überstand enthaltenen Insulinkonzentration in ng/ml nach Insulinsekretionsexperiment mittels ELISA; **Kontrolle** = untransfizierte INS-1E; **750.17 & 50.12** = stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien



#### 4.3.4. Einfluss der ACBP-Überexpression auf die mRNA-Expression

Um die Frage zu klären, ob die stabile ACBP-Überexpression auch in den INS-1E-Zellen zu signifikanten Veränderungen auf mRNA-Ebene hinsichtlich der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren führt wurde aus den Zellen RNA isoliert (siehe 3.5.1), in cDNA umgeschrieben (siehe 3.11) und die Transkriptmenge durch quantitative real-time RT-PCR gemessen und verglichen (siehe 3.12).

Die Expression von SREBP-1c ist in den überexprimierenden Zelllinien INS-1E 750.17 und 50.12 um 65-70 % signifikant geringer als in untransfizierten Zellen ( $p < 0,001$ ; Abb. 27).

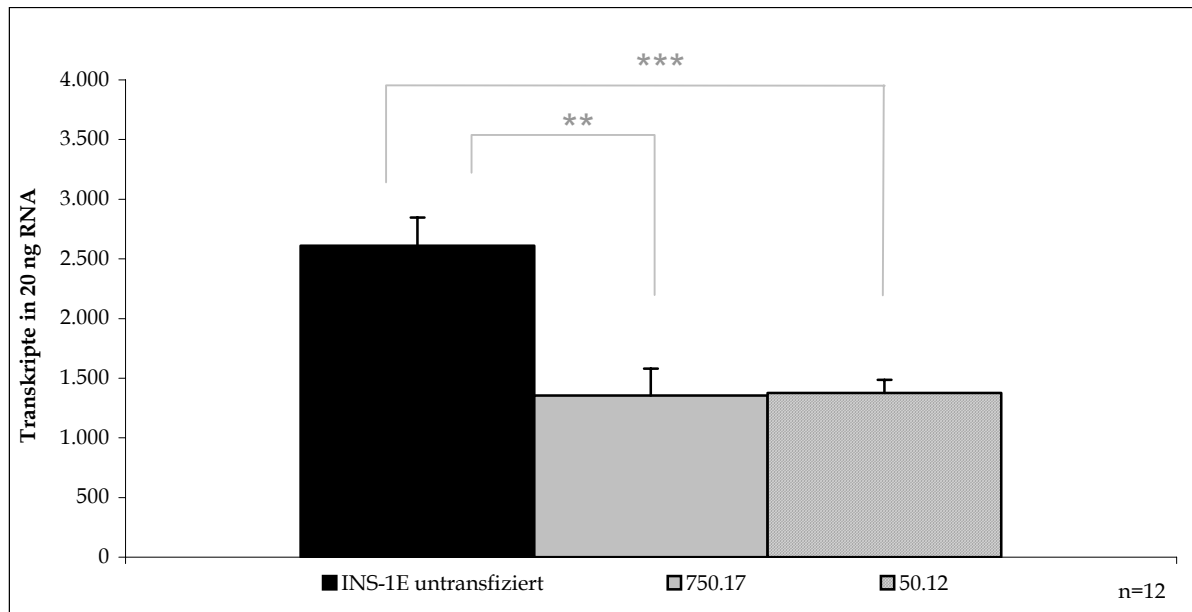


**Abb. 27:** Durch quantitative real-time RT-PCR bestimmte SREBP-1c-Expression in untransfizierten & den stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinien 750.17 und 50.12.

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; 750.17 & 50.12 = stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien

Bei dem Transkriptionsfaktor PPAR- $\delta$  kommt es durch die stabile ACBP-Überexpression in den beiden Zelllinien zu einer signifikant um jeweils ca. 50 % reduzierten Expression (siehe Abb. 28; für 750.17  $p = 0,002$ ; für 50.12  $p < 0,001$ ).

Hingegen ist die mRNA-Menge von PPAR- $\alpha$  und PPAR- $\gamma$  unter den gewählten Untersuchungsbedingungen in den INS-1E-Zellen zu gering ( $< 500$  Transkripte in 20 ng RNA), um verlässliche Aussagen treffen zu können.

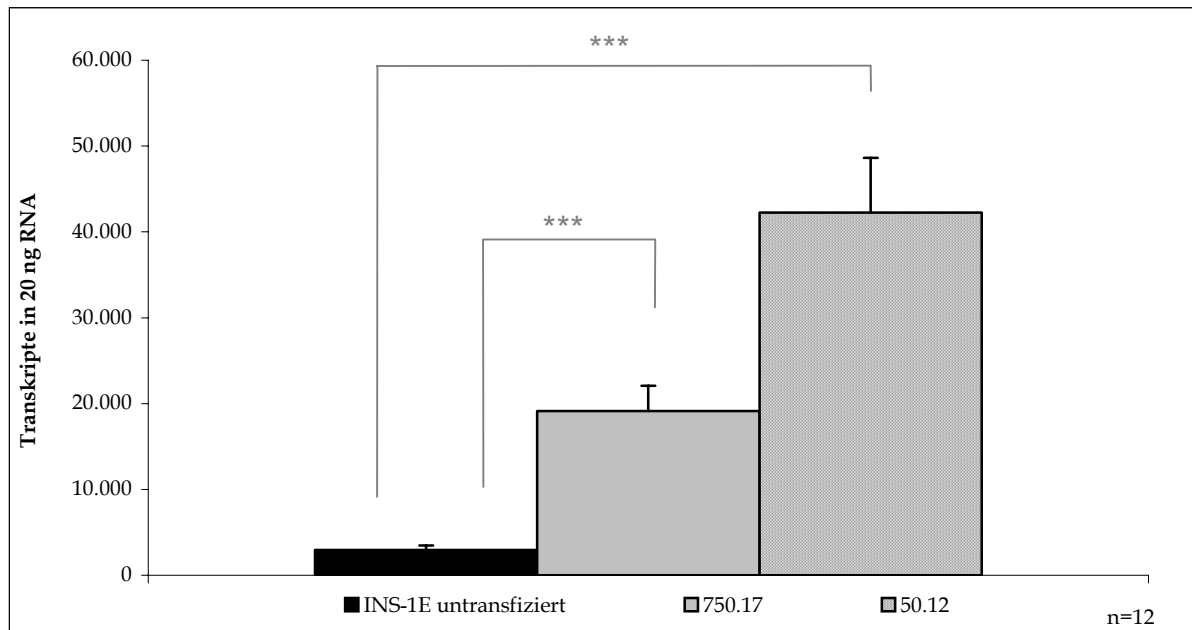


**Abb. 28: Durch quantitative real-time PCR bestimmte PPAR- $\delta$ -Expression in untransfizierten & den stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinien 750.17 und 50.12.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; 750.17 & 50.12 = stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien

Im Gegensatz zu SREBP-1c und PPAR- $\delta$  steigt die Expression der Transkriptionsfaktoren PGC-1 $\alpha$ , LXR- $\alpha$  und SIRT-1 in den ACBP-überexprimierenden INS-1E im Vergleich zu den untransfizierten Zellen an.

Wie in Abb. 29 graphisch dargestellt, erhöht sich die PGC-1 $\alpha$ -Transkriptmenge signifikant um das ca. 6,5-Fache in der Zelllinie 750.17 ( $p < 0,001$ ) und um das ca. 14-Fache in den Zellen des Klons 50.12 ( $p < 0,001$ ). Der Anstieg in der PGC-1 $\alpha$ -Expression, der zwischen beiden ACBP-überexprimierenden Zelllinien auftritt, ist für diesen Transkriptionsfaktor ebenfalls signifikant (50.12 *vs.* 750.17,  $p = 0,004$ ). Mit einer mRNA-Kopienzahl von ca. 3000 Transkripten in 20 ng RNA gehört PGC-1 $\alpha$  in untransfizierten INS-1E-Zellen zu den weniger stark exprimierten Transkriptionsfaktoren und ist in seiner Expression mit PPAR- $\delta$  vergleichbar (siehe Abb. 28).

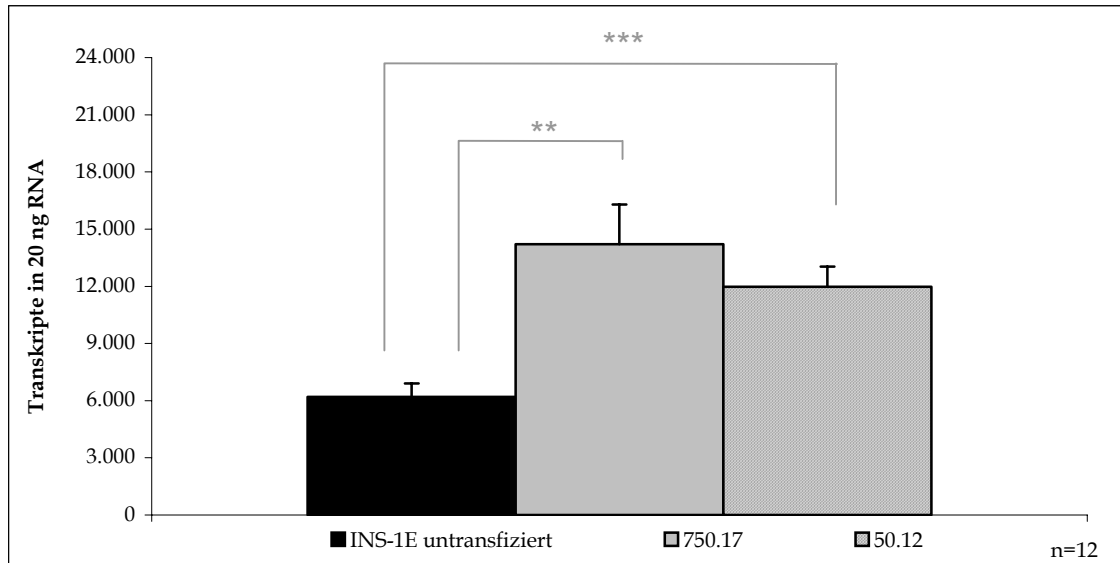


**Abb. 29: Durch quantitative real-time PCR bestimmte PGC-1 $\alpha$ -Expression in untransfizierten & den stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinien 750.17 und 50.12.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; 750.17 & 50.12 = stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien

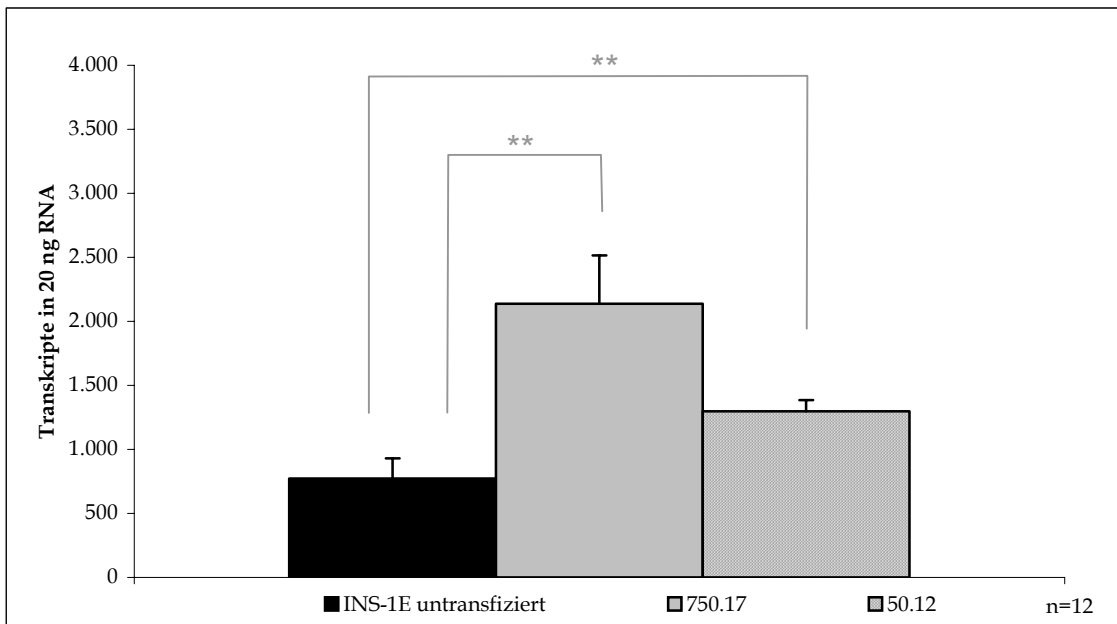
SIRT-1, ein weiterer in INS-1E-Zellen exprimierter Transkriptionsfaktor, ist durch die ACBP-Überexpression ebenfalls dahingehend beeinflusst, dass dessen mRNA-Menge in den stabil transfizierten Zelllinien signifikant ansteigt. Der Vergleich mit untransfizierten Zellen ergibt für „INS-1E 750.17“ eine 2,3-fach signifikant erhöhte SIRT-1-Expression ( $p = 0,003$ ) und für „INS-1E 50.12“ einen signifikanten Anstieg um das 1,9-Fache ( $p < 0,001$ ; siehe Abb. 30).

Auch die Expression des LXR- $\alpha$ , welcher mit  $\sim 700$  Transkripten in 20 ng RNA im Verhältnis zu den anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren in den untransfizierten INS-1E auf geringem, aber auswertbarem Niveau exprimiert ist (vergleiche Abb. 31 und Abb. 27-30), steigt signifikant durch die ACBP-Überexpression (für 750.17  $p = 0,008$ ; für 50.12  $p = 0,007$ ). Diese Erhöhung ist auf mRNA-Ebene bei der Zelllinie 750.17 mit einer Verdreifachung deutlicher als beim Klon 50.12, jedoch zeigen beide Signifikanzen  $p < 0,01$  (siehe Abb. 31).



**Abb. 30: Durch quantitative real-time PCR bestimmte SIRT-1-Expression in untransfizierten & den stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinien 750.17 und 50.12.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; 750.17 & 50.12 = stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien



**Abb. 31: Durch quantitative real-time PCR bestimmte LXR- $\alpha$ -Expression in untransfizierten & den stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinien 750.17 und 50.12.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben); \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; 750.17 & 50.12 = stabil mit „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ transfizierte Zelllinien

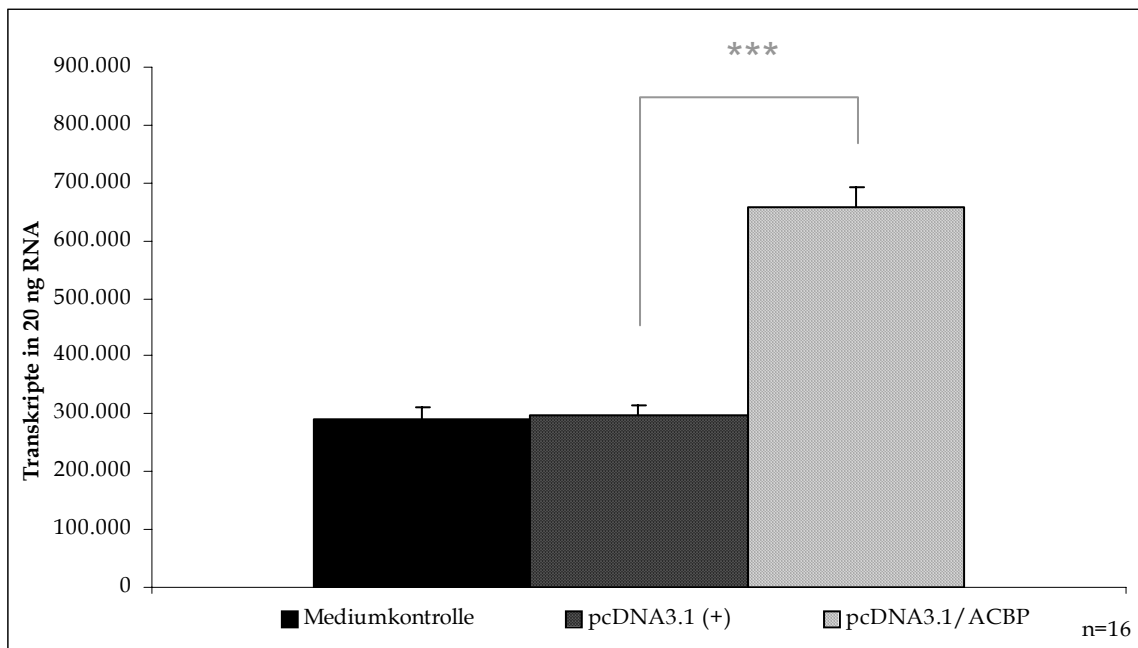
#### **4.4. Ergebnisse transienter Transfektionen von INS-1E-Zellen**

Die in den vorangegangenen zwei Kapiteln (siehe 4.3.3 und 4.3.4) beschriebenen Resultate gründen auf der Annahme, die Veränderungen in der Insulinsekretion und im Transkriptionsmuster der stabil transfizierten INS-1E-Zelllinien 750.17 und 50.12 beruhen auf der ACBP-Überexpression. Auf die Generierung einer stabilen, ein Kontrollplasmid-exprimierenden Zelllinie war verzichtet worden, da die Integration der Plasmid-DNA zufällig in das Wirtsgenom erfolgt und nicht reproduzierbar ist. Allerdings sollte mit Hilfe transienter (zeitweiliger) Transfektionen der INS-1E-Zellen mit dem verwendeten eukaryotischen Expressionsplasmid pcDNA3.1 (+) ein potentieller Einfluss des Vektors auf die Insulinsekretion und die mRNA-Expression der Zellen untersucht und ausgeschlossen werden. Zusätzlich sollte die Möglichkeit einer transienten Transfektion der INS-1E-Zellen mit einer spezifisch gegen ACBP-gerichteten siRNA getestet und ein entsprechendes Protokoll für nachfolgende „Rescue-Versuche“ ausgearbeitet werden.

##### **4.4.1. Plasmidtransfektion mit pcDNA3.1 (+)**

Für die transienten Plasmidtransfektionen mit dem Kontrollplasmid pcDNA3.1 (+) wurden INS-1E-Zellen wie unter 3.10.2.3 beschrieben mit dem leeren Vektor, aber auch, zur Überprüfung des Transfektionserfolges, mit dem generierten Expressionsplasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ für 48 h transfiziert, anschließend Insulinsekretionsexperimente durchgeführt und die Zellen entsprechend dem Protokoll für RNA-Isolierungen für nachfolgende real-time PCR-Messungen geerntet (siehe 3.4.2).

Wie in Abb. 32 dargestellt, hat die transiente Transfektion der INS-1E-Zellen mit dem leeren Vektor keinen Einfluss auf die ACBP-Expression der Zellen ( $p = 0,852$ ), wohingegen die Transfektion mit dem Plasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ zu einem signifikanten Anstieg der ACBP-mRNA-Menge um  $\sim 120\%$  führt ( $p < 0,001$ ). Durch die transiente Transfektion werden zwar nicht die Transkriptzahlen der stabil transfizierten Zellen erreicht (vergleiche Abb. 32 und Abb. 24), dennoch wurde die signifikante Erhöhung der ACBP-Expression als Indiz für die erfolgreiche Transfektion der Zellen gewertet und bei allen transient durchgeführten Plasmidtransfektionen als Kontrollmessung vor der Erhebung weiterer real-time PCR-Daten überprüft.

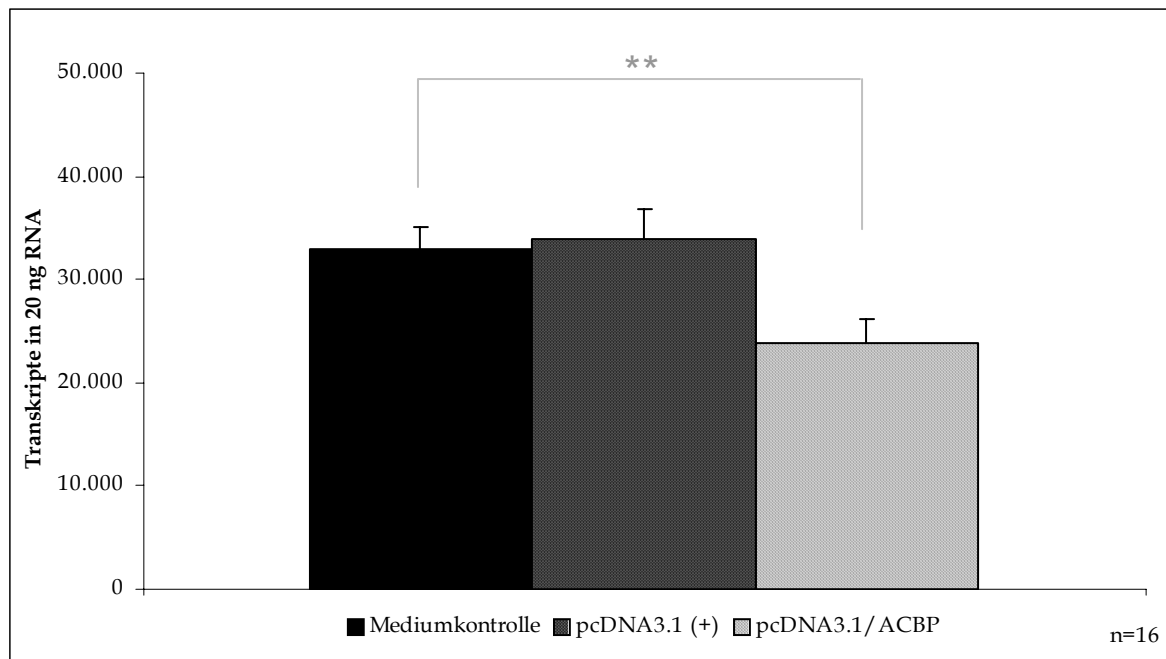


**Abb. 32: Durch quantitative real-time RT-PCR bestimmte ACBP-Expression in untransfizierten & transient transfizierten INS-1E-Zellen.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben) aus 16 unabhängigen Transfektionsexperimenten mit INS-1E p 60-85; \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; **pcDNA3.1 (+)** = transient mit dem Kontrollplasmid transfizierte INS-1E; „**pcDNA3.1/ACBP**“ = transient mit ACBP-exprimierenden Vektor transfizierte INS-1E

Entsprechend den im Kapitel 4.3.4 ermittelten signifikanten Expressionsunterschieden wurden in den transient transfizierten Zellen die mRNA-Mengen von SREBP-1c, SIRT-1, PGC-1 $\alpha$ , LXR- $\alpha$  und PPAR- $\delta$  quantifiziert und auf eine Beeinflussung durch den leeren Vektor hin analysiert. Es zeigte sich für keinen der Transkriptionsfaktoren eine, durch Transfektion mit dem Kontrollplasmid pcDNA3.1 (+) veränderte Expression (exemplarisch für SREBP-1c dargestellt,  $p = 0,817$ ; siehe Abb. 33).

Zudem konnten, mit Ausnahme von SREBP-1c, die durch die stabile ACBP-Überexpression in den INS-1E-Zellen bestimmten signifikanten Reduktionen bzw. Anstiege in der Expression der Transkriptionsfaktoren (siehe Kapitel 4.3.4), durch die zeitlich begrenzte Transfektion mit dem Plasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ nicht oder nur tendenziell erzielt werden (ohne Abb.). So ist auch die durch transiente Transfektion erreichte signifikante Reduktion der SREBP-1c-Expression mit ca. 30 % ( $p = 0,005$ ) nur halb so prominent wie unter stabil ACBP-überexprimierenden Bedingungen (vergleiche Abb. 33 und Abb. 27).



**Abb. 33: Durch quantitative real-time RT-PCR bestimmte SREBP-1c-Expression in untransfizierten & transient transfizierten INS-1E-Zellen.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben) aus unabhängigen Transfektionsexperimenten mit INS-1E p60-85; \*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,01$ ; **pcDNA3.1(+)** = transient mit dem Kontrollplasmid transfizierte INS-1E; „**pcDNA3.1/ACBP**“ = transient mit ACBP-exprimierenden Vektor transfizierte INS-1E

Neben den Expressionsanalysen sollte auch die Insulinsekretion von transient transfizierten INS-1E-Zellen mittels ELISA gemessen werden (siehe 3.2.2), um die durch die stabile ACBP-Überexpression erzielten Ergebnisse zu verifizieren. Allerdings konnten unter den für die erfolgreiche Transfektion nötigen Bedingungen (insbesondere in Bezug auf die Zelldichte) keine adäquaten Insulindaten gewonnen werden, weder für die untransfizierten (Kontrollen) noch für die transient transfizierten INS-1E (pcDNA3.1 (+) bzw. „pcDNA3.1/ACBP“). Die basalen (3 mM) und die durch 15 mM Glukosestimulation sezernierten Insulinmengen liegen bereits bei den Kontrollen ausserhalb der zu erwartenden Konzentrationen, wodurch Rückschlüsse auf den Einfluss der transienten Transfektion nicht möglich sind.

Modifikationen des Protokolls hinsichtlich der Zellzahlen, der Plasmid-DNA-Konzentration, dem Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz und der Transfektionsdauer (24-72 h) resultierten in deutlich reduzierten bis fehlenden Transfektionserfolgen, wenngleich auch teils adäquate Insulinantworten auf die Glukosestimulation erreicht werden konnten. Eine Kombination optimaler Bedingungen für die Transfektion der Zellen bei gleichzeitig aussagekräftiger Insulinsekretion gelang nicht. Daher liegen keine Ergebnisse zum Einfluss der transienten Transfektion auf die Insulinsekretion der INS-1E-Zellen vor.

#### 4.4.2. siRNA-Transfektion

Ein weiterer Ansatz zur Überprüfung der Resultate der stabil, ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinien 750.17 und 50.12, bestand darin, die ACBP-Überexpression in den Zellen mittels sequenzspezifischer siRNA auf mRNA-Ebene zu drosseln und im Zuge eines „Rescue-Versuchsansatzes“ die in den „normalen“ INS-1E-Zellen existierenden Verhältnisse (annähernd) wiederherzustellen. Gleichzeitig schien es interessant, die Auswirkung einer siRNA-vermittelten Reduktion der ACBP-Expression auf „normale“ INS-1E zu untersuchen.

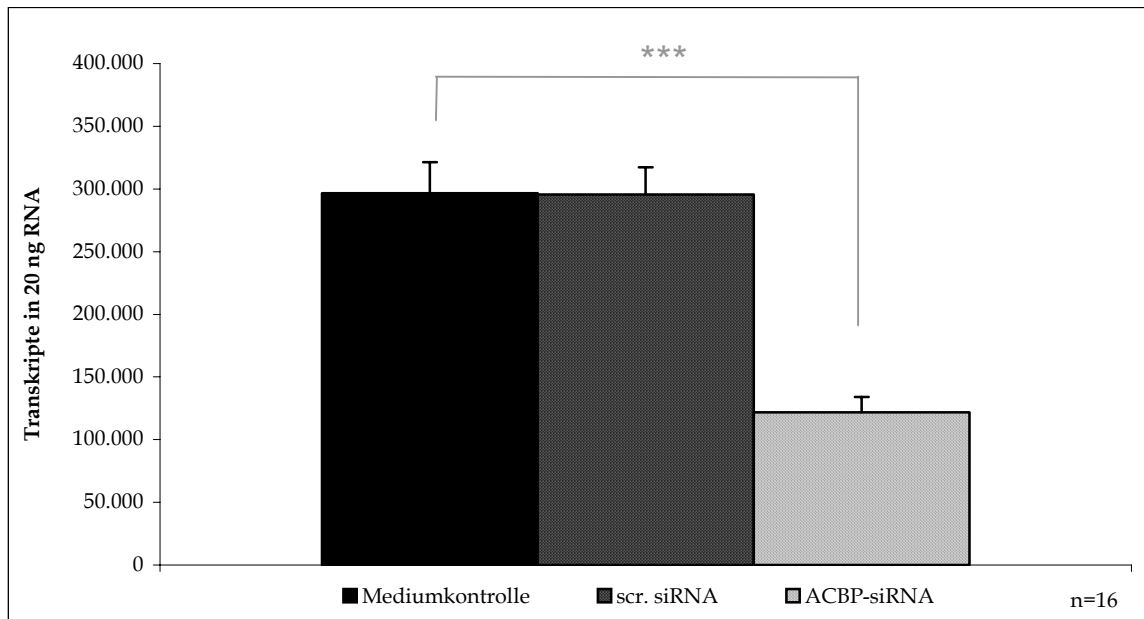
Grundlage der siRNA-vermittelten Reduktion der mRNA- und damit Proteinmenge sind kleine ds RNA-Moleküle (Duplexe), die mittels lipophiler Transfektionsreagenzien an die Zellmembran der Zielzellen transportiert und ins Cytoplasma geschleust werden. Da sich die Transfektionseffizienz unterschiedlicher Zelllinien stark voneinander unterscheidet, wurden zunächst Versuche mit „normalen“ INS-1E-Zellen durchgeführt, die Aufschluss über deren Transfizierbarkeit und die optimalen Rahmenbedingungen geben sollten.

Um auch eine Reduktion auf Proteinebene zu erreichen, wurde die siRNA in hoher Konzentration und über einen Zeitraum von 48 h eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendete siRNA ist über 19 Nukleotide identisch mit der ACBP-mRNA-Sequenz von *Rattus norvegicus*, da es sich bei den INS-1E um eine Ratteninsulinom-Zelllinie handelt. Als Kontrolle diente „scrambled siRNA“ (scr. siRNA), deren Sequenz keine Homologie zu bekannten mRNA-Sequenzen der Ratte aufweist. Die Transfektion der INS-1E erfolgte mit je 100 nM siRNA erfolgte nach dem unter 3.10.1 beschriebenen Protokoll.

Wie in Abb. 34 gezeigt, kommt es zu einer signifikanten, ~ 60%igen ( $p < 0,001$ ) Reduktion der ACBP-mRNA durch die sequenzspezifische ACBP-siRNA, wohingegen die Transfektion mit der Kontroll-siRNA keinen Einfluss auf die ACBP-Expression der INS-1E-Zellen hat ( $p = 0,976$ ).

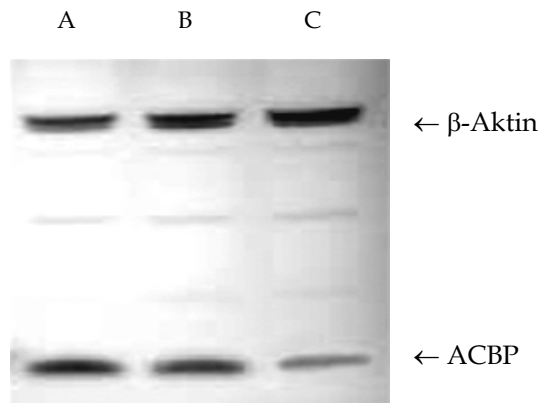
Diese siRNA-vermittelte Reduktion auf mRNA-Ebene setzt sich auch auf Proteinebene fort und führt zu einer deutlichen Verringerung der ACBP-Proteinkonzentration im Zellextrakt der ACBP-siRNA-transfizierten INS-1E-Zellen (Abb. 35). Durch das auf dem Western Blot simultan detektierte  $\beta$ -Aktin, welches als Kontrollprotein dient, ist der Nachweis über die Verwendung vergleichbarer Gesamtproteinkonzentrationen erbracht. Sowohl die ACBP-, als auch die  $\beta$ -Aktin-Bande befinden bei auf Höhe der erwarteten Proteingrößen von 10 und 42 kDa (Abb. 35; gekennzeichnet durch Pfeile).





**Abb. 34: Durch quantitative real-time PCR bestimmte ACBP-Expression in untransfizierten & mit siRNA transient transfizierten INS-1E-Zellen.**

Mittelwerte  $\pm$  SEM (t-Test nach Student für unabhängige Stichproben) aus unabhängigen Transfektionsexperimenten mit INS-1E p60-85; \*\*\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,001$ ; **scr. siRNA** = transient mit Kontroll-siRNA transfizierte INS-1E; **ACBP-siRNA** = transient mit sequenzspezifisch gegen ACBP-mRNA gerichtete siRNA transfizierte INS-1E



**Abb. 35: Western Blot zum Nachweis der ACBP- und  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge in transient mit 100 nM siRNA über einen Zeitraum von 48 h transfizierten INS-1E-Zellen**

A: untransfizierte INS-1E; B: transient mit scr. siRNA transfizierte INS-1E; C: transient mit sequenzspezifisch gegen ACBP-mRNA gerichtete siRNA transfizierte INS-1E

25  $\mu$ g Gesamtprotein/Spur wurden in einem 10%igen BisTris-Gel durch 30 min Elektrophorese bei 200 V der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Proteinnachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern („ACBP S-20“ & „ $\beta$ -Actin I-19“; 1:500) und einem HRP konjugierten Sekundär-Antikörper (alle Santa Cruz) über Chemilumineszenz.

Die siRNA-Transfektion von INS-1E-Zellen konnte unter den beschriebenen Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden, allerdings stellten sich diese erneut als ungeeignet für anschließende Insulinsekretionsexperimente heraus. Wie bereits für die transienten Plasmidtransfektionen beschrieben (siehe 4.4.1), lagen die basal (3 mM) und die durch Stimulation (15 mM) in den Überständen gemessenen Insulinkonzentrationen in Bereichen, die eindeutige Aussagen unmöglich machen. Ein Vergleich der Mediumkontrollen mit den siRNA-transfizierten Zellen ist daher im Hinblick auf deren Insulinsekretion nicht möglich. Modifizierungen des Transfektionsprotokolls und der Zellzahlen resultierten abermals in deutlich verringerten Transfektionseffizienzen bzw. siRNA-vermittelten Reduktionen der ACBP-mRNA-Transkriptmengen.

Die Kombination optimaler Bedingungen für die siRNA-Transfektion der Zellen bei gleichzeitig aussagekräftiger Insulinsekretion ist jedoch Grundlage für die Etablierung eines funktionsfähigen Assays mit den stabil, ACBP-überexprimierenden Zelllinien 750.17 und 50.12. Daher wurden bislang keine siRNA-Transfektionen mit diesen Zelllinien durchgeführt.

Auch weitergehende Analysen erfolgreich ACBP-siRNA-transfizierter, „normaler“ INS-1E im Hinblick auf Veränderungen hinsichtlich der Expression von Transkriptionsfaktoren und anderer Parameter standen beim Abschluss dieser Arbeit noch aus.

## 5. Diskussion

### 5.1. Vergleich stoffwechselfysiologischer Effekte verschiedener Diäten auf Wildtypen und ACBP-überexprimierende Ratten

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, durch eine Hochfett-diät (HFD)-Studie am AIVI in Kuopio, Finnland, die bislang bei transgenen, ACBP-überexprimierenden Ratten unter verschiedenen diätetischen Bedingungen aufgetretenen stoffwechselfysiologischen und transkriptionellen Veränderungen zu verifizieren.

Die transgenen Ratten haben u.a. in der Leber, dem weißen Unterhautfettgewebe, dem Gehirn und dem Hypothalamus eine stabile ACBP-Überexpression und deutlich erhöhte Proteinkonzentrationen (Siiskonen *et al.* 2007; Oikari *et al.* 2008a; Oikari *et al.* 2008b). Sie sind lebens- und fortpflanzungsfähig und zeigen unter Normaldiät (4 % Fett) keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtypen. Untersuchungen der Arbeitsgruppe identifizierten diesbezüglich bei den transgenen Ratten in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus (gefüttert bzw. nach Nahrungskarenz) und der Zusammensetzung der Diät gewebespezifische Regulationsmechanismen durch die Transkriptionsfaktoren PPAR- $\alpha$ , - $\gamma$ , - $\delta$  und SREBP-1c, die adaptativ auftreten und kompensatorisch der ACBP-Überexpression entgegen wirken (Oikari *et al.* 2008a; Oikari *et al.* 2008b). Da es unter Normaldiät (4 % Fett) zu keinen signifikanten, stoffwechselfysiologischen Unterschieden zwischen Wildtypen und Transgenen kommt (Oikari *et al.* 2008a), wurden die Ratten bereits in einer vorangegangenen Studie mit speziellen Diäten gefüttert. Um stoffwechselfysiologische Veränderungen zu induzieren, wurden, entsprechend der bekannten ACBP-Präferenz für LCFA-CoAs (Huang *et al.* 2005), die Auswirkungen von mittel- (MCFA-) und langkettigen (LCFA) Fettsäuren miteinander verglichen. Bei diesen, in der Studie von Oikari *et al.* (2008b) verwendeten Diäten, stammten 44 (MCFA-Diät) bzw. 49 % (LCFA-Diät) der Energie aus Fett bei einem relativ geringen Energiegehalt von  $\sim 13$  kJ/kg. Nach vierwöchiger Fütterung offenbarte sich ein Einfluss der ACBP-Überexpression auf den Glukosestoffwechsel und die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe der Tiere. So zeigten transgene Ratten, welche mit der MCFA-angereicherten Diät gefüttert worden waren, im Vergleich zu den LCFA-gefütterten Tieren signifikant geringere Plasmaglukose- und -insulinkonzentrationen im Verlauf eines GTTs. Als Ergebnis dieser Studie wurde u.a. ein, durch die ACBP-Überexpression vermittelter, protektiver Effekt der MCFA gegenüber den LCFA für die Glukosetoleranz dieser Tiere postuliert (Oikari *et al.* 2008b). In der Studie fehlte allerdings der Vergleich zwischen diesen

Hochfettdiäten und einer Normaldiät mit geringem Fettgehalt. Daher stellte insbesondere die gegenüberstellende Betrachtung des stoffwechselphysiologischen Verhaltens von Wildtypen und transgenen, ACBP-überexprimierenden Ratten nach Fütterung einer Niedrigfettdiät (LFD) bzw. HFD einen Gegenstand der vorliegenden Arbeit dar.

Für die Studie wurden Wildtypen und Transgene über einen Zeitraum von vier Wochen mit einer LFD, deren Energie zu 10 % aus Fett, zu 20 % aus Protein und zu 70 % aus Kohlenhydraten stammte (Energiegehalt: 16,1 kJ/kg), bzw. einer „Western Style“-HFD aus 45 % Fett, 20 % Protein und 35 % Kohlenhydraten (Energiegehalt: 19,8 kJ/kg) gefüttert. Bei beiden Diäten setzten sich die Fettanteile ausschließlich aus LCFA mit 14-20 C-Atomen zusammen, die von ACBP bevorzugt gebunden werden (Huang *et al.* 2005). Die Gesamtkalorien beider Diäten waren mit 4057 kcal identisch. Eine Zusammenfassung der stoffwechselphysiologischen Ergebnisse dieser Studie ist zur besseren Übersicht in Tabelle 11 dargestellt. Die Diskussion der Daten im Einzelnen erfolgt im Anschluss.

**Tab. 11: Überblick über stoffwechselphysiologische Parameter von Wildtyp- und ACBP-überexprimierenden, transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung einer Niedrig- bzw. Hochfettdiät**

<i>Parameter</i>	<i>Gruppenvergleiche</i>			
	<b>LFD</b> <b>tg vs. wt</b>	<b>wt</b> <b>HFD vs. LFD</b>	<b>tg</b> <b>HFD vs. LFD</b>	<b>HFD</b> <b>tg vs. wt</b>
<b>Glukose</b>	↑↑↑ (10')	=	=	=
<b>Insulin</b>	↓	↑	↑↑↑ (20')	=
<b>FFA</b>	=	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
<b>TG</b>	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑
<b>Cholesterin</b>	↓	↑↑↑	↑↑↑	=

↑↑↑ signifikanter Anstieg; = unverändert; ↑ tendenzieller Anstieg; ↓ tendenzielle Reduktion; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend; FFA = freie Fettsäuren; TG = Triglyzeride

Vergleicht man die stoffwechselphysiologischen Antworten von LFD-gefütterten Wildtypen und Transgenen nach GTT miteinander, so zeigen die ACBP-überexprimierenden Ratten 10 min nach Glukoseinjektion einen signifikant höheren Plasmaglukosewert als die Wildtypen sowie tendenziell nach Glukoseadministration geringere Insulinkonzentrationen. Das Verhalten der Tiere hinsichtlich ihren Plasmaglukose-, wie auch Insulinwerten stimmt mit denen von Oikari *et al.* (2008a) publizierten Daten unter Normaldiät (4 % Fett) überein. Die signifikant höhere Plasmaglukosemenge und das tendenziell geringere Insulin im

Anschluss an den Stimulus deuten bei den transgenen, LFD-gefütterten Ratten auf eine verminderte oder verzögerte Insulinantwort der pankreatischen  $\beta$ -Zellen hin, die damit eine verspätete Glukoseaufnahme durch die Zielzellen bedingt. Ein solcher Zusammenhang zwischen ACBP und der Insulinsekretion wurde bereits von Ostensen *et al.* (1994) beschrieben. Demnach führt eine i.v.-Infusion von ACBP in pankreatische Inselzellen von Ratten zu einer moderaten und transienten Reduktion der Plasmainsulinlevel v.a. durch die Inhibierung der akuten Phase der GSIS. Auch das natürlich vorkommende ACBP-Prozessierungsprodukt ODN wirkt inhibierend auf die GSIS isolierter Ratten-Inselzellen und *in vitro* auf die Insulinsekretion von Hamster-Insulinomzellen (De Stefanis *et al.* 1995). Daher könnte die ACBP-Überexpression in den transgenen Tieren unter LFD-Bedingungen durchaus supprimierend auf die GSIS wirken und die verzögerte Glukoseaufnahme durch die peripheren Organe erklären.

Einhergehend mit der Beobachtung, dass unter Normaldiät (4 % Fett) zwischen Wildtypen und Transgenen keine Unterschiede im Hinblick auf Parameter des Fettstoffwechsels auftreten (Oikari *et al.* 2008a), zeigen auch die LFD-gefütterten Wildtypen und Transgenen dieser Studie einen vergleichbaren Gehalt an freien Fettsäuren im Serum (NEFA/FFA) sowie an Plasmacholesterin. Hingegen weisen die ACBP-überexprimierenden Ratten unter LFD (10 % Fett) signifikant höhere Triglyzeridkonzentrationen als die Wildtypen auf. Eine entsprechende Tendenz ist bereits unter Normaldiät (4 % Fett) vorhanden, dort aber mit  $p = 0,06$  nicht signifikant (Oikari *et al.* 2008a). Diese Daten deuten auf einen spezifischen Einfluss der ACBP-Überexpression auf den Fettstoffwechsel der transgenen Tiere hin.

Die Fütterung der HFD verfolgte daher zwei Ziele, zum einen sollten in Wildtypen und Transgenen negative Auswirkungen von „Western Style“-Diäten auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel simuliert und zum anderen, die unter LFD bzw. Normaldiät aufgetretenen (tendenziellen) Unterschiede verifiziert werden.

Nach vierwöchiger HFD zeigten sowohl die Wildtypen als auch die ACBP-überexprimierenden Tiere im Vergleich zu den LFD-Kontrollgruppen, wie erwartet, signifikant erhöhte FFA im Serum und einen signifikanten Anstieg an Plasmatriglyzeriden und -cholesterin. Die Nüchterninsulinwerte (0 min; vor Beginn des GTT nach 16 h Nahrungskarenz) der HFD-gefütterten Ratten (Wildtypen und Transgene) sind tendenziell erhöht, obgleich kein signifikanter Unterschied zu den LFD-Tieren ermittelt werden konnte. Der Anstieg ist aber ein Indiz für eine beginnende Insulinresistenz der peripheren Organe dieser Ratten, wie sie

durch die „Western Style“-Diät ausgelöst werden sollte. Allerdings hat sich diese weder bei den Wildtypen noch bei den Transgenen unter HFD manifestiert, da es zu keinen signifikanten Unterschieden im Gesamtverlauf der Plasmaglukose- und -insulinkonzentrationen nach GTT im Vergleich zu den LFD-Kontrollgruppen kommt. Die transgenen, ACBP-überexprimierenden Ratten weisen zwar durch die HFD im Gesamtverlauf höhere Insulinwerte als die tg, LFD-gefütterten Tiere auf, der Anstieg ist jedoch nicht signifikant ( $p = 0,082$ ). Für den ersten Messzeitpunkt 20 min nach Glukoseadministration ist die Insulinkonzentration der HFD-gefütterten Transgenen aber signifikant höher als die der tg, LFD-gefütterten Ratten. Diese Daten implizieren einen negativen Einfluss der ACBP-Überexpression unter LCFA-angereicherter Hochfettdiät auf die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe der transgenen Tiere.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Hyperglykämie und Insulinresistenz der HFD-gefütterten Wildtypen und Transgenen liefert womöglich die Tatsache, dass die Kalorien in der Niedrigfettdiät zu 10 % aus Fett stammen, womit der Fettanteil deutlich über dem konventioneller Normaldiäten (4 % Fett) liegt. Dies könnte bereits die Plasmaglukose- und -insulinkonzentrationen der Kontrollgruppen dahingehend verändert haben, dass eine Erhöhung des Fettanteils auf 45 % keine signifikanten Auswirkungen mehr hatte. Möglicherweise reicht auch eine einmonatige Fütterungsperiode bei den verwendeten Diäten nicht aus, um entsprechende Veränderungen zu manifestieren. Dies bedarf weiterer Untersuchungen und einem Vergleich von Normaldiät und LFD im Hinblick auf GTT-Parameter.

Zwischen den HFD-Gruppen (Wildtypen vs. ACBP-überexprimierende Tiere) gibt es keine Unterschiede im Plasmacholesterin sowie bei der Plasmaglukose und dem -insulin nach GTT. Allerdings haben die Transgenen gegenüber den Wildtypen signifikant erhöhte FFA und tendenziell deutlich höhere Triglyzeridlevel, wobei insbesondere die Konzentration an FFA mit einer Verdoppelung im Vergleich zu allen anderen Gruppen auffallend hoch ist. Der unter LFD zu verzeichnende signifikante Anstieg der Plasmatriglyzeride zwischen den Wildtypen und den Transgenen ist unter HFD aufgrund der Streuung der Wildtyp-Werte nicht signifikant, sondern nur tendenziell vorhanden.

Diese Daten implizieren wiederum eine entscheidende Funktion des ACBPs nicht nur für den intrazellulären, sondern auch für den systemischen Fettstoffwechsel. So führt die ACBP-Überexpression bereits unter Normaldiät (4 % Fett) in den transgenen Ratten zu einem

veränderten Acyl-CoA-Profil in der Leber und dem viszeralen Fettgewebe. Die Konzentration an C16:0, C16:1 und C18:1 im Fettgewebe und die von C16:0, C16:1, C20:0 und C20:4 in der Leber steigt im Vergleich zu Wildtypen signifikant an (Oikari *et al.* 2008a), wobei keine signifikanten Veränderungen bei den zirkulierenden Fetten (FFA und Triglyzeride) auftreten. Dies ändert sich, wie durch diese Studie ermittelt, unter Hochfettdiät. So deutet der signifikant erhöhte Gehalt an FFA im Fastenzustand auf einen, durch die ACBP-Überexpression, forcierten lipolytischen Abbau von gespeicherten Triglyzeriden hin. Diese entstehen durch die Aktivität der fettgewebsspezifischen Lipase (HSL) aus Triglyzeriden, gelangen ins Blut und werden albumingebunden transportiert. Zudem scheint sich im gefütterten Zustand unter HFD durch die ACBP-Überexpression die intrazelluläre Synthese von Triglyzeriden zu erhöhen oder die Aufnahme der in VLDLs zirkulierenden Triglyzeride in die Zellen beeinträchtigt zu sein, da deren Konzentration im Plasma der transgenen Ratten ebenfalls ansteigt.

Einhergehend mit dieser Annahme führt die Überexpression von FABP, einem anderen Fettsäurebindeprotein, im Fettgewebe von Mäusen unter HFD zu einer erhöhten Expression der HSL, was eine gesteigerte Lipolyse zur Folge hat, den Gehalt an FFA im Serum erhöht und die Insulinresistenz des Fettgewebes potenziert. Gleichzeitig verringert sich die LPL-Expression im Fettgewebe, wodurch sich die *de novo*-Lipogenese und damit die Fettmasse in den FABP-überexprimierenden Tieren reduziert (Hertzel *et al.* 2006). ACBP-überexprimierende Ratten und Mäuse haben, ähnlich den FABP-Transgenen (Hertzel *et al.* 2006), tendenziell ebenfalls ein geringeres Gewicht als die entsprechenden Wildtypen (Beobachtungen der Arbeitsgruppe), was auf identische Mechanismen zurückzuführen sein könnte. Nach HFD könnte die ACBP-Überexpression in den transgenen Ratten daher einen ähnlichen Einfluss auf die HSL- und die LPL-Expression im Fettgewebe haben, die Lipolyse steigern und die Lipogenese reduzieren, was den signifikanten Anstieg an FFA im Serum der Tiere erklären würde. Diesbezüglich wären weitergehende Untersuchungen sinnvoll und höchst interessant.

Die FFA spiegeln den stoffwechselphysiologischen Phänotyp der Ratten nach Nahrungskarenz wider, wohingegen die Plasmatriglyzeride Aufschluss über diesen im gefütterten Zustand geben. Ein deutlicher Einfluss von ACBP auf die Triglyzeridsynthese wurde dabei u.a. von Huang *et al.* (2005) beschreiben. So führt die Überexpression von ACBP in der Leber von transgenen Mäusen zu einem Anstieg der LCFA-CoAs um ca. 70 %, wobei v.a. gesättigte und mehrfach ungesättigte LCFA-CoAs inkorporiert werden – ähnlich denen



von Oikari *et al.* (2008a) beschriebenen Veränderungen im hepatischen Acyl-CoA-Profil der auch für diese Studie eingesetzten, transgenen Ratten. Die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation der ACBP-überexprimierenden Mäuse bleibt dabei unverändert, da nur der LCFA-CoA-Gehalt in den Mikrosomen, nicht aber in den Mitochondrien, ansteigt. Die Phospholipid- und Triglyzeridkonzentrationen in der Leber dieser Tiere sind signifikant höher (Huang *et al.* 2005). Dies konnte, im Hinblick auf den intrazellulären Triglyzeridpool, ebenfalls von Yang *et al.* (2001) durch ACBP-Überexpression in Hepatozyten gezeigt werden. Zudem weisen die ACBP-überexprimierenden Ratten, die für diese Studie verwendet wurden, schon unter Normaldiät (4 % Fett) erhöhte Plasmatriglyzeride im Vergleich zu den Wildtypen auf, jedoch ist der Anstieg unter diesen Ernährungsbedingungen noch nicht signifikant (Oikari *et al.* 2008a).

All diese Beobachtungen gehen daher mit der Hypothese einher, dass die ACBP-Überexpression in den transgenen Ratten unter HF- und LF-Diät die intrazelluläre Triglyzeridsynthese forciert und damit auch die Konzentration an Triglyzeriden im Plasma der Tiere erhöht.

Um die zugrunde liegenden zellulären Auswirkungen der ACBP-Überexpression näher zu analysieren, sollte im Weiteren das Expressionsmuster einer Reihe von Transkriptionsfaktoren in der Leber der Ratten untersucht werden.

## **5.2. Transkriptionelle Unterschiede in der Leber der Tiere**

Bereits unter Normal- (4 % Fett) und beim Vergleich zweier Hochfettdiäten (44-49 % Fett) waren bei den ACBP-überexprimierenden Ratten signifikant veränderte PPAR- und SREBP-1c-mRNA-Level aufgetreten (Siiskonen *et al.* 2007; Oikari *et al.* 2008a; Oikari *et al.* 2008b). Da die Leber ein zentrales Organ im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel darstellt und nukleäre Transkriptionsfaktoren über Ligandenbindung die Transkription stoffwechselphysiologischer Gene steuern, wurde dieses Organ für die mRNA-Analysen von Wildtypen und Transgenen unter den gewählten diätetischen Bedingungen ausgewählt. Die Messung der Expressionsmuster in der Leber der Ratten (gefütterter Zustand) erfolgte mittels quantitativer real-time RT-PCR. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in Tabelle 12 zusammengefasst und werden anschließend diskutiert.



**Tab. 12: Ergebnis der Expressionsanalysen in der Leber von Wildtyp- und ACBP-überexprimierenden, transgenen Ratten nach einmonatiger Fütterung einer Niedrig- bzw. Hochfettdiät**

<i>Parameter</i>	<i>Gruppenvergleiche</i>			
	<b>LFD</b> tg vs. wt	<b>wt</b> HFD vs. LFD	<b>tg</b> HFD vs. LFD	<b>HFD</b> tg vs. wt
<i>Transkriptionsfaktoren</i>				
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	=	=	=	=
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	↓	=	↑↑↑	=
<b>PPAR-<math>\delta</math></b>	=	=	=	=
<b>SREBP-1c</b>	↓↓↓	↓↓↓	=	↓
<b>LXR-<math>\alpha</math></b>	↓	=	=	=
<b>SIRT-1</b>	=	=	=	=
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	↑	↓↓↓	↓	=
<b>HNF-4<math>\alpha</math></b>	↑	↓	↓	=
<i>Fettsäurebindeproteine</i>				
<b>FABP1</b>	↓↓↓	=	=	↓
<b>ACBP</b>	↑↑↑	↓↓↓	=	↑↑↑

↑↑↑ signifikanter Anstieg; ↓↓↓ signifikante Reduktion; = unverändert; ↑ tendenzieller Anstieg; ↓ tendenzielle Reduktion; LFD = „Low Fat Diet“; HFD = „High Fat Diet“; wt = Wildtyp; tg = transgen, ACBP-überexprimierend

Aufgrund der bereits durch Oikari *et al.* (2008a,b) dokumentierten Expressionsunterschiede hinsichtlich der PPARs und SREBP-1c werden zunächst diese im Folgenden betrachtet.

PPARs bilden eine Klasse nukleärer Transkriptionsfaktoren, die zu den adoptierten Orphanrezeptoren gehören, da LCFA und LCFA-CoA zu ihren Liganden zählen. PPAR- $\delta$  ist ubiquitär exprimiert und in eine Vielzahl stoffwechselphysiologischer Prozesse involviert. Bei PPAR- $\gamma$  handelt es sich um eine Isoform, die v.a. im Fettgewebe vorkommt und dort die Expression lipogener Gene steuert. Im Gegensatz dazu ist PPAR- $\alpha$  hauptsächlich im Fastenzustand in der Leber und einer Reihe weiterer Organe exprimiert und aktiviert lipolytische und  $\beta$ -oxidative Gene. SREBP-1c hingegen zählt zu einer Familie membran-gebundener Transkriptionsfaktoren, die Gene des Cholesterin- und Fettstoffwechsels regulieren, und auf die gesättigte Fettsäuren und deren Acyl-CoAs inhibierend wirken.

Der Vergleich aller vier Gruppen dieser HFD-Studie zeigt keine signifikanten Unterschiede in der hepatischen PPAR- $\alpha$ - und - $\delta$ -Expression. Allerdings weisen ACBP-überexprimierende Ratten unter LFD tendenziell geringere PPAR- $\gamma$ -Transkriptmengen auf als die Wildtypen. Diese Tendenz verstärkt sich offensichtlich unter Normaldiät (4 % Fett), denn in der Studie

von Oikari *et al.* (2008a) sind neben PPAR- $\gamma$ , auch die Expressionen von PPAR- $\delta$  und SREBP-1c signifikant reduziert. In der vorliegenden Studie ist SREBP-1c unter LFD bei den Transgenen ebenfalls in signifikant geringerer Transkriptzahl nachweisbar, die PPAR- $\delta$ -Expression bleibt hingegen unverändert. Die Diskrepanz zwischen diesen Resultaten lässt sich durch die verschiedenen Diäten (LFD mit 10 % Fett *vs.* Normaldiät mit 4 %), das Alter der Ratten (3 *vs.* 5 Monate) und die unterschiedliche real-time PCR-Methode (quantitativ *vs.* relativ zu 18S RNA) erklären.

Betrachtet man die Wildtypen nach 4-wöchiger LFD- bzw. HFD-Fütterung weisen diese interessanterweise eine durch die HFD verringerte hepatische ACBP-Expression auf. Dies steht im Widerspruch zu Bhuiyan *et al.* (1995), die einen Anstieg des ACBPs (pg Protein/ng DNA) in der Leber nach HFD zeigen. Allerdings liefert die bei den Wildtypen unter HFD signifikant verringerte SREBP-1c-Expression eine Erklärung für die Reduktion der ACBP-Expression. Da die Genexpression von ACBP u.a. über ein funktionales SRE in der Promotorregion reguliert wird (Nitz *et al.* 2005), lässt der Vergleich von Wildtypen und Transgenen vermuten, dass in den Hepatozyten SREBP-1c der hauptsächliche Regulator der ACBP-Expression ist und dass dessen verringerte Expression für die signifikant reduzierte ACBP-Expression verantwortlich ist. Die SREBP-1c-Expression selbst ist wahrscheinlich durch die erhöhten FFA, Triglyzerid- und Cholesterinlevel der Tiere reprimiert, die antagonistisch auf die SREBP-1c-Expression und -Aktivität wirken (Shimano 2002; Shimano 2009). Eine deutlich reduzierte hepatische SREBP-1c-Expression in Wistar-Ratten unter HFD wurde auch von Letexier *et al.* (2005) gezeigt und bestätigt damit diese Theorie.

Vergleicht man die Expressionsmuster der transgenen, ACBP-überexprimierenden Ratten nach LFD bzw. HFD in der Leber der Tiere, so zeigen diese eine signifikant erhöhte PPAR- $\gamma$ -Expression unter HFD. Raso *et al.* (2009) und Inoue *et al.* (2005) beschreiben nach HFD sowohl im Menschen, wie auch in Mäusen, einen signifikanten Anstieg der PPAR- $\gamma$ -Expression in Hepatozyten. Obwohl PPAR- $\gamma$  andere Gewebe vor Triglyzeridakkumulation und Insulinresistenz schützen kann, ist es in der Leber dazu nicht in der Lage, sondern geht einher mit hepatischer Steatose. PPAR- $\gamma$ -Knock-out-Mäuse sind hingegen vor dieser Entwicklung geschützt (Gavrilova *et al.* 2003), was die Bedeutung von PPAR- $\gamma$  als Aktivator lipogener Gene unterstreicht. Im Zusammenspiel mit dem signifikanten Anstieg FFA, der Triglyzeride und des Cholesterins, kann die in dieser Studie ebenfalls signifikant erhöhte PPAR- $\gamma$ -Expression in der Leber der ACBP-überexprimierenden Ratten nach HFD mit der beginnenden Insulinresistenz, die sich durch das erhöhte Plasmainsulin bei diesen Tieren

zeigt, in Verbindung gebracht werden. Zudem könnte die hohe intrazelluläre LCFA-CoA-, im Zusammenspiel mit der hohen ACBP-Konzentration, in den transgenen Tieren zu einem vermehrten Transport in den Nukleus führen. Da diese Stoffwechselelderivate als Liganden von PPAR- $\gamma$  fungieren würde die ACBP-Überexpression die Transaktivierung lipogener Gene und damit die Triglyzeridsynthese und -akkumulation in den Hepatozyten noch zusätzlich verstärken.

Vergleicht man Wildtypen und ACBP-überexprimierende Ratten unter HFD (Fettanteil von 45 %) so bleibt die Expression aller PPARs in der Leber unverändert und auch die SREBP-1c-Expression ist bei den Transgenen nur noch tendenziell, aber nicht mehr signifikant, verringert. Dieses Ergebnis impliziert, dass sich mit zunehmenden Fettanteil in der Nahrung die reprimierende Wirkung der ACBP-Überexpression auf die Expression der PPARs und die von SREBP-1c abschwächt und der durch Oikari *et al.* (2008a) postulierte Feedback-Mechanismus nicht mehr greift. Da es sich beim ACBP in der Leber in Abhängigkeit vom Ernährungszustand um ein Zielgen von PPAR- $\alpha$  (bei Nahrungskarenz) bzw. SREBP-1c handelt (Sandberg *et al.* 2005a), vermuteten Oikari *et al.* (2008a), dass die verringerte Expression dieser Transkriptionsfaktoren in den transgenen Tieren der Überexpression entgegen wirkt. Für den durch die HFD in den Tieren erhöhten Lipidumsatz scheint die ACBP-Überexpression hingegen keiner solch gravierenden Feedback-Regulation mehr zu bedürfen.

Die Auswertung der Transkriptionsanalysen zu den PPARs und SREBP-1c machen zum einen deutlich, dass die Expression von PPAR- $\alpha$  und - $\delta$  in Hepatozyten nicht vom Genotyp und der Diät beeinflusst wird, sondern im gefütterten Zustand unverändert bleibt. Zum anderen zeigte sich, dass die hepatische ACBP-Expression über die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c und PPAR- $\gamma$  reguliert wird und das wiederum deren Expression in der Leber von der ACBP-Expression sowie vom Fettgehalt der Nahrung abhängig ist.

Neben den PPARs und SREBP-1c wurde die Expression weiterer, fettstoffwechselassoziiierter nukleärer Transkriptionsfaktoren in der Leber der Tiere analysiert. Von besonderem Interesse erschien dabei HNF-4 $\alpha$ , da eine direkte Interaktion von ACBP mit HNF-4 $\alpha$  im Nukleus von Hepatozyten beschrieben ist (Petrescu *et al.* 2003). Durch die mit 10 kDa geringe Größe des ACBPs ist eine Passage der Kernporen und damit der Transport von LCFA-CoAs, welche als Liganden für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren fungieren, in den Nukleus

möglich. Ein solcher Mechanismus wurde von Lawrence *et al.* (2000) und Wolfrum *et al.* (2001) bereits für L-FABP und dessen Interaktion mit PPAR- $\alpha$  und - $\gamma$  beschrieben. Auf diese Weise sind Fettsäurebindeproteine wahrscheinlich an der Regulation der Genexpression von Zellen beteiligt. Von den in dieser Studie analysierten Transkriptionsfaktoren (HNF-4 $\alpha$ , LXR- $\alpha$ , SIRT-1 und PGC-1 $\alpha$ ) zeigte allerdings nur PGC-1 $\alpha$  eine signifikant reduzierte Expression in Abhängigkeit von der gefütterten Diät. Dieser signifikante Unterschied trat beim Vergleich der Wildtypen nach LFD und HFD auf und ist demnach nicht mit dem Genotyp assoziiert. Die ACBP-Überexpression hat damit keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der hier analysierten Transkriptionsfaktoren.

Abschließend sollte die mRNA-Expression von L-FABP, der Leberisofom eines weiteren Fettsäurebindeproteins, in den Tieren gemessen werden. Da Martin *et al.* (2003b) einen signifikanten Anstieg von hepatischem ACBP und SCP-2 in FABP-knock-out-Mäusen beschreiben, schien es interessant zu untersuchen, ob im Gegenzug eine ACBP-Überexpression eine Reduktion der L-FABP-Expression in der Leber der transgenen Tiere bewirkt. Tatsächlich ist die L-FABP-Expression in transgenen, ACBP-überexprimierenden Ratten im Vergleich zu den Wildtypen unter LFD signifikant verringert. Auch unter HFD ist diese Reduktion auf mRNA-Ebene zu beobachten, allerdings aufgrund der Streuung der Werte nicht signifikant.

Die Daten implizieren damit einen weiteren regulatorischen Mechanismus in den Zellen, Geweben und Organen der ACBP-überexprimierenden Ratten. So wird der ACBP-Überexpression nicht nur autoregulatorisch durch die verringerte Expression aktivierender Transkriptionsfaktoren entgegen gewirkt, sondern die Überexpression des einen Fettsäurebindeproteins durch die verminderte Expression eines gleichzeitig vorkommenden, zweiten Fettsäurebindeproteins kompensiert.

Da die ACBP-überexprimierenden Ratten in dieser HFD-Studie und auch in der vorangegangenen MCFA- bzw. LCFA-Fütterungsstudie (Oikari *et al.* 2008a) nach GTT veränderte Insulinantworten aufweisen, bestand das zweite Ziel dieser Arbeit in der Etablierung eines *in vitro*-Zellkulturmodells mit dem die Auswirkungen der ACBP-Überexpression auf pankreatische  $\beta$ -Zellen analysiert werden können.

### 5.3. Generierung einer ACBP-überexprimierenden $\beta$ -Zelllinie

Ein Zusammenhang zwischen ACBP und der Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen wurde bereits 1994 von Ostensen *et al.* beschrieben. Demnach bewirkt ACBP in Inselzellen von Ratten eine moderate Reduktion der Plasmainsulinlevel v.a. durch die Inhibierung der akuten Phase der GSIS. Auch das natürlich vorkommende ACBP-Prozessierungsprodukt ODN wirkt inhibierend auf die GSIS isolierter Ratten-Inselzellen und *in vitro* auf die Insulinsekretion von Hamster-Insulinomzellen (De Stefanis *et al.* 1995).

Die für diese Arbeit verwendete Ratten-Insulinomzelllinie INS-1E exprimiert eine Reihe von nukleären Transkriptionsfaktoren, die auch an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt sind. So ist z.B. die Expression von PPAR- $\alpha$ , - $\gamma$  und - $\delta$  in den  $\beta$ -Zellen von Ratten dokumentiert (Braissant *et al.* 1996), wobei bislang insbesondere die Bedeutung von PPAR- $\alpha$  und - $\gamma$  für die GSIS und die Funktionalität dieser Zellen untersucht worden ist (Santini *et al.* 2004; Ravnskjaer *et al.* 2005; Ravnskjaer *et al.* 2006). Zudem weisen die adhärent wachsenden INS-1E-Zellen über einen langen Zeitraum eine vergleichbare Insulinsekretion wie pankreatische  $\beta$ -Zellen nach Glukosestimulation auf (Merglen *et al.* 2004), stellen ein etabliertes Zellkulturmodell dar und eignen sich daher für die *in vitro*-Analyse der ACBP-Überexpression.

Die im Verlauf dieser Arbeit eingesetzten INS-1E-Zellen (p 60-85) wurden funktionell durch Insulinsekretionsexperimente überprüft. Dabei wird nach 1 h Inkubation in glukosefreiem Puffer, entweder mit einer geringen (3 mM) oder hohen (15 mM) Glukosekonzentration stimuliert und anschließend das sezernierte Insulin im ELISA gemessen. Im Mittel lag die basale Insulinfreisetzung (Insulinkonzentration im Zellkulturüberstand) bei 69 ng/ml und ließ sich durch den 15 mM-Glukosestimulus auf 370 ng/ml steigern. Dieser Anstieg um das 5,3-Fache liegt in dem von Merglen *et al.* (2004) dokumentierten Bereich zwischen 6,6- und 4,3-Fach für INS-1E-Zellen der Passagen 64-100. Für die Generierung der stabil, ACBP-überexprimierenden Zelllinie wurden INS-1E-Zellen der Passage 64 verwendet.

#### 5.3.1. **Konstruktion des Expressionsplasmids „pcDNA3.1 (+)/ACBP“**

Zunächst bestand das Ziel jedoch darin, einen Vektor zu erzeugen, der das ACBP-Gen, inklusive endogener Promotorregion, trägt. Dieses lag bereits kloniert in einem prokaryotischen Expressionsvektor vor. Für die angestrebte stabile Transfektion wurde das für Säugerzellen geeignete, konstitutiv auf hohem Level exprimierende Plasmid pcDNA3.1 (+)

ausgewählt. Es enthält Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgenkassetten, einen CMV-Promotor/-Enhancer, eine Terminations- und Polyadenylierungssequenz sowie eine MCS mit einer *NotI*-Schnittstelle. Um zu gewährleisten, dass die Expression des ACBP-Gens über den endogenen Promotor erfolgt, wurde der CMV-Promotor des Plasmids durch Restriktion mit zwei kompatiblen Endonukleasen entfernt. Nachdem die Gensequenz mit *NotI* aus dem prokaryotischen Vektor geschnitten und das Plasmid pcDNA3.1 (+) mit *NotI* linearisiert worden war, wurde versucht, beide Fragmente zu ligieren. Da linearisierte DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden zur Rezirkulation neigen, wurde ein alkalischer Phosphatase-Verdau durchgeführt, der durch das Abspalten der 5'-Phosphate die Autoligation verhindert. Die Tendenz zur intramolekularen Ringbildung sinkt zudem mit steigender Konzentration in Lösung, weshalb möglichst hohe DNA-Konzentrationen verwendet wurden.

Üblicherweise werden DNA-Fragmente mit einer Länge von nur einigen hundert bis tausend Basenpaaren kloniert. Die Länge der ACBP-Gensequenz übersteigt mit 11,4 kbp aber die Vektorgröße (~ 4,5 kbp) um mehr als das Doppelte, wodurch sich diese Klonierung schwierig gestaltete. Generell werden Vektor-zu-Insert-Verhältnisse von „1 zu 3“ bis „1 zu 1“ von den Herstellern empfohlen, wobei normalerweise die Konzentration des Inserts höher gewählt wird als die des Plasmids. Da die Größenverhältnisse in diesem Fall umgekehrt waren, wurden sie entsprechend angepasst und Ratios von „1 zu 1“ bis „1 zu 10“ getestet. Im Anschluss an die Ligation erfolgt die Transformation der Plasmide in *E. coli*-Zellen, wo diese dann vermehrt werden. Da bei erfolgreicher Ligation ein Plasmid von ~ 16 kbp-Größe entstanden wäre, wurden entsprechend ultrakompetente *E. coli*-Zellen verwendet. Dennoch gelang es letztlich trotz aller Bemühungen nicht, ein ACBP-Gen-tragendes, eukaryotisches Plasmid zu generieren. Daher wurde alternativ die mit ~ 300 bp deutlich kürzere ACBP-cDNA-Sequenz der Ratte für die weiteren Arbeiten verwendet. Diese war bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch reverse Transkription der ACBP-mRNA von *Rattus norvegicus* hergestellt worden und lag kloniert in einem prokaryotischen Expressionsvektor vor. Nach der Integration von *NotI*-Erkennungssequenzen am 5'- und 3'-Ende und einer, das Start-Codon umgebenden, Kozak-Sequenz konnte die ACBP-cDNA in das zuvor mit *NotI* linearisierte Plasmid pcDNA3.1 (+) kloniert werden. Die Größe des Inserts stellte bei dieser Klonierung kein Problem dar. Die korrekte Orientierung im Vektor (downstream des CMV-Promotors) sowie die Intaktheit der Sequenz wurden durch Sequenzierung überprüft und bestätigt. Letztlich gelang so die Generierung des eukaryotischen Expressionsplasmids „pcDNA3.1

(+)/ACBP“, welches die proteinkodierende ACBP-Sequenz der Ratte unter dem vektoreigenen CMV-Promotor exprimiert.

### 5.3.2. Transiente und stabile Plasmid-Transfektion der INS-1E-Zellen

Mit Hilfe von lipophilen, positiv geladenen Transfektionsreagenzien, die sich um die negativ geladene Plasmid-DNA legen und diese an die Membran eskortieren, können Nukleinsäuren effizient in eukaryotische Zellen geschleust werden. Diesen Vorgang nennt man transiente oder zeitweilige Transfektion, da die Zelle die gewünschte Eigenschaft durch Teilung wieder verliert. Hingegen wird bei einer stabilen Transfektion der Einbau der Plasmid-DNA in die chromosomale DNA der Zielzelle angestrebt. Stabil transfizierte Zellen werden über eine Antibiotikaresistenz selektioniert für die der Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) die Neomycinresistenzgenkassette besitzt.

Im Gegensatz zu anderen sekundären Zelllinien existieren für INS-1E-Zellen keine etablierten Transfektionsprotokolle und auch stabile Transfektionen sind in der Literatur kaum beschrieben (z.B. (Tomas *et al.* 2008). Daher mussten die optimalen Bedingungen (Zellzahl, Mediumkomponenten, Reagenz-zu-Plasmid-Verhältnisse, Transfektionsdauer) zunächst durch transiente Transfektion der Zellen ermittelt werden. Zudem wurde die für untransfizierte INS-1E-Zellen minimal lethale Neomycinkonzentration im Wachstumsmedium bestimmt. Nachdem diese Parameter festgelegt waren, wurden die Zellen mit dem Plasmid „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ und drei verschiedenen Transfektionsreagenzien transfiziert, was die Erfolgsaussichten erhöhen sollte. Die anschließende mehrtägige Behandlung mit einer hohen Neomycinkonzentration beschleunigte die Selektion stabil transfizierter Klone. Letztlich überlebten < 5 % der Zellen diese Prozedur. Diese wurden über einen Zeitraum von mehreren Monaten kultiviert, wobei der Selektionsdruck durch die zuvor ermittelte, minimal lethale Neomycinkonzentration von 100 µg G418/ml Medium aufrecht erhalten wurde.

Insgesamt vier Klone, die mit den Reagenzien PEI 50 bzw. 750 transfiziert worden waren, wurden hinsichtlich ihrer ACBP-Expression überprüft. Real-time RT-PCR-Messungen belegen auf mRNA-Ebene eine signifikant erhöhte ACBP-Expression bei allen vier Klonen, wobei die Linien 750.17 und 50.12 aufgrund ihrer analogen, um das ca. 30-fache gesteigerten Transkriptmenge für weitergehende Analysen ausgewählt wurden. Auf Proteinebene zeigen diese beiden Klone ebenfalls einen deutlichen Anstieg an intrazellulärem ACBP.



Bei transienten Transfektionen wird zusätzlich zum generierten Expressionsvektor das ursprüngliche Plasmid bzw. ein Kontrollplasmid transfiziert, um unspezifische Effekte möglichst auszuschließen. Da bei transienten Transfektionen Transfizierbarkeit und Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Zelllinien und auch zwischen den Zellen einer Linie in Abhängigkeit vom Zustand und der Entwicklungsphase stark variieren und nie bei 100 % liegen, sind diese weniger aussagekräftig.

Trotzdem wurde durch transiente Transfektion des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3.1 (+) überprüft, ob die Expression von ACBP und der weiteren, untersuchten Transkriptionsfaktoren beeinträchtigt ist. Es ließen sich keine negativen Auswirkungen durch das Plasmid erkennen. Zudem konnte die ACBP-Expression in den INS-1E-Zellen durch transiente Transfektion um durchschnittlich 120 % signifikant gesteigert werden. Die im Folgenden für die stabil transfizierten Zellen beschriebenen signifikanten Veränderungen auf mRNA-Ebene, konnten in geringerem Maße für SREBP-1c reproduziert werden. Die Auswirkungen auf die Genexpression der nukleären Transkriptionsfaktoren waren aufgrund der deutlich geringeren ACBP-Überexpression in den transient transfizierten Zellen nicht so prominent wie in den stabilen Klonen. Aussagen über einen Einfluss des Vektors pcDNA3.1 (+) bzw. des Expressionsplasmids „pcDNA3.1 (+)/ACBP“ auf die GSIS der INS-1E konnten aufgrund der Unvereinbarkeit der transienten Transfektions- und der Insulinsekretionsprotokolle bedauerlicherweise nicht erlangt werden und bedürfen weiterer Optimierung.

Da bei stabilen Transfektionen die Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Zellen ohnehin zufällig erfolgt und nicht vorhersehbar ist, wurde auf die Generierung einer Kontroll-Zelllinie verzichtet. Stattdessen wurden die beiden unabhängigen INS-1E-Klone 750.17 und 50.12 mit analoger ACBP-Expression parallel und im Vergleich zu untransfizierten INS-1E untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im folgenden Kapitel diskutiert.



### 5.3.3. Funktionelle & transkriptionelle Analysen zur stabilen ACBP-Überexpression in den INS-1E-Klonen 750.17 & 50.12

Auf mRNA-Ebene bewirkt die ACBP-Überexpression in den INS-1E-Zellen signifikante Veränderungen in der Expression nukleärer Transkriptionsfaktoren, welche in Tabelle 13 zusammengefasst sind.

**Tab. 13:** Ergebnis der Expressionsanalysen der stabil ACBP-überexprimierenden INS-1E-Klone 750.17 und 50.12 im Vergleich zu untransfizierten INS-1E-Zellen

	INS-1E untransfiziert vs. ACBP- überexprimierend	Signifikanzniveau für 750.17/ 50.12
<i>Fettsäurebindeprotein</i>		
<b>ACBP</b>	↑↑↑	***
<i>Transkriptionsfaktoren</i>		
<b>PPAR-<math>\delta</math></b>	↓↓↓	** / ***
<b>SREBP-1c</b>	↓↓↓	***
<b>LXR-<math>\alpha</math></b>	↑↑↑	**
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	↑↑↑	***
<b>SIRT-1</b>	↑↑↑	** / ***
keine Expressionsunterschiede bei PPAR- $\alpha$ , - $\gamma$ und HNF-4 $\alpha$		

↑↑↑ signifikanter Anstieg; ↓↓↓ signifikante Reduktion; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

Die Expression von HNF-4 $\alpha$ , dessen direkte nukleäre Interaktion mit ACBP in Hepatozyten beschrieben ist (Petrescu *et al.* 2003) bleibt durch die ACBP-Überexpression in den INS-1E unverändert. Rückschlüsse über das Verhalten der Transkriptionsfaktoren PPAR- $\alpha$  und - $\gamma$  sind unter den gewählten Bedingungen (11,1 mM Glukose im Medium) nicht möglich, da deren Transkriptzahlen zu gering sind, um durch quantitative real-time RT-PCR gesicherte Aussagen treffen zu können. Aus diesem Grund mussten auch in anderen Studien zur funktionellen Analyse von PPAR- $\alpha$  und - $\gamma$  in  $\beta$ -Zellmodellen Agonisten oder adenovirale Expressionsvektoren eingesetzt werden (Santini *et al.* 2004; Ravnskjaer *et al.* 2005). Hingegen ist PPAR- $\delta$ , die hauptsächlich exprimierte PPAR-Isoform in  $\beta$ -Zellen (Braissant *et al.* 1996), gut quantifizierbar und durch das hohe ACBP-Transkriptionsniveau in signifikant geringerer mRNA-Konzentration in den stabil transfizierten Zellen nachweisbar. Die Funktion und Regulation von PPAR- $\delta$  in Inselzellen ist weitgehend unklar. Bekannt ist, dass dessen Expression durch inflammatorische Zytokine induziert wird und dessen Aktivierung durch einen synthetischen Liganden keinen Einfluss auf die GSIS hat (Kharroubi *et al.* 2006). Zu den Zielgenen von PPAR- $\delta$  in  $\beta$ -Zellen zählen v.a. lipogene Gene, wie LPL. Eine

verringerte LPL-Expression wirkt sich negativ auf die GSIS aus, wie von Pappan *et al.* (2005) in  $\beta$ -zellspezifischen Knock-out-Mäusen gezeigt. Auch die Expression eines weiteren lipogenen Transkriptionsfaktors, SREBP-1c, ist in den beiden ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zelllinien signifikant reduziert. Die SREBP-1c-Expression und -Aktivität in pankreatischen  $\beta$ -Zellen ist normalerweise glukosevermittelt, aber insulinunabhängig induziert und verstärkt die *de novo*-Fettsäuresynthese (Sandberg *et al.* 2005b). Daher führen chronisch erhöhte Glukosekonzentrationen durch den potenzierenden Einfluss auf die Glukoseaufnahme (GLUT-2), den Glukosestoffwechsel (Glukokinase (GK)) und die Lipogenese zur Glukolipotoxizität (Noma *et al.* 1996; Roche *et al.* 1998; Schuit *et al.* 2002). Unter den hier verwendeten Kultivierungsbedingungen mit 11,1 mM Glukose im Medium kommt es, bedingt durch die stark erhöhte ACBP-Expression, dennoch zu einer reduzierten SREBP-1c-Expression in den INS-1E-Zellen. Da die ACBP-Expression normalerweise über funktionale SR- und PPR-Elemente in der Promotorregion reguliert wird (Sandberg *et al.* 2005a), und obgleich die ACBP-Überexpression in den INS-1E v.a. durch den CMV-Promotor gesteuert wird, könnte es sich bei der verringerten PPAR- $\delta$ - und SREBP-1c-Expression um einen kompensatorischen Mechanismus handeln, der der Überexpression entgegen wirken soll. Derartige Feedback-Mechanismen werden bei den transgenen, ACBP-überexprimierenden Ratten dieser und vorangegangener Studien angenommen (Oikari *et al.* 2008a; Oikari *et al.* 2008b).

Im Gegensatz zu SREBP-1c und PPAR- $\delta$  ist die Expression der Transkriptionsfaktoren LXR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  und SIRT-1 in den stabil, ACBP-überexprimierenden Klonen signifikant erhöht.

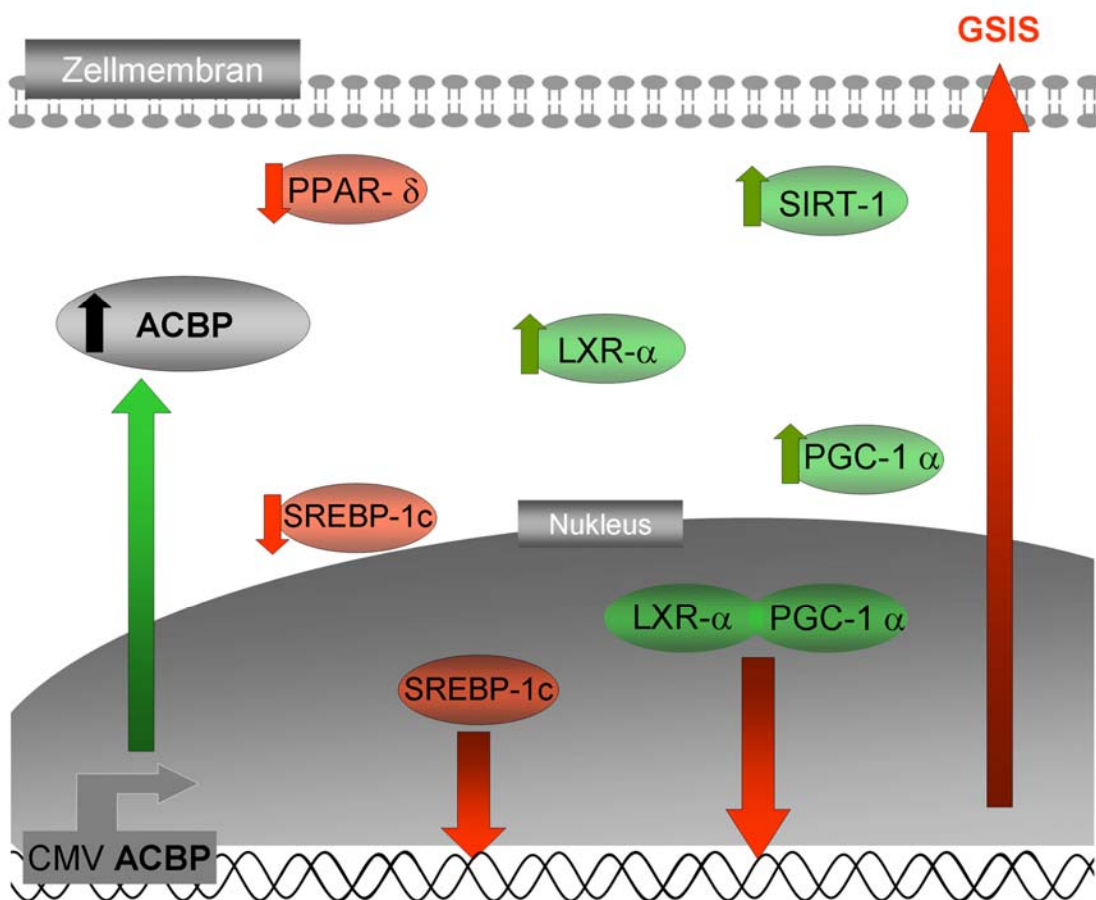
LXRs heterodimerisieren mit RXRs, sind in einer Vielzahl von Geweben und Organen exprimiert und aktivieren Gene des Cholesterin- und Fettstoffwechsels. LXR- $\alpha$  weist dabei eine höhere Gewebespezifität als LXR- $\beta$  auf, welches ubiquitär vorkommt (Wojcicka *et al.* 2007). Obwohl Zitzer *et al.* (2006) lediglich die Expression von LXR- $\beta$  in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und INS-1E beschreiben, konnten in dieser Arbeit mit Hilfe der quantitativen real-time RT-PCR und spezifischen Primern unter den gewählten Bedingungen auch LXR- $\alpha$ -Transkripte nachgewiesen werden. Das Vorkommen von LXR- $\alpha$  in pankreatischen  $\beta$ -Zellen wird auch von Helleboid-Chapman *et al.* (2006) bestätigt, die zudem eine glukoseabhängige Translokation von LXR- $\alpha$  in den Nukleus zeigen konnten. Nach Zitzer *et al.* (2006) erhöht LXR- $\beta$  in pankreatischen  $\beta$ -Zellen die GSIS und aktiviert, SREBP-1c-vermittelt, die

Expression des Insulin-, GK- und GLUT-2-Gens sowie autoregulatorisch die von SREBP-1c. Da der von Zitzer *et al.* (2006) verwendete Agonist sowohl auf LXR- $\alpha$  als auch auf LXR- $\beta$  wirkt, könnten die beschriebenen zellulären Auswirkungen zumindest auf eine synergistische Wirkung beider Isoformen zurückzuführen sein. Dies impliziert somit eine Beteiligung von LXR- $\alpha$  an der GSIS pankreatischer  $\beta$ -Zellen durch die Modulation der Genexpression, wie auch durch Helleboid-Chapman *et al.* (2006) bestätigt. Die in den ACBP-überexprimierenden INS-1E signifikant erhöhte LXR- $\alpha$ - bei gleichzeitig signifikant verringerter SREBP-1c- Expression deutet, im Gegensatz zur Regulation von LXR- $\beta$ , auf eine SREBP-1c-unabhängige Transkription von LXR- $\alpha$  in pankreatischen  $\beta$ -Zellen hin. SREBP-1c selbst ist entscheidend an der GSIS beteiligt und dessen Inhibierung durch siRNA führt zu einer verringerten GSIS in INS-1E-Zellen (Zitzer *et al.* 2006). Auch chronisch erhöhte LXR-Expression und -Aktivierung in  $\beta$ -Zellen und sekundären  $\beta$ -Zelllinien tragen zur Lipotoxizität durch die Akkumulierung von Fetten und damit zu deren Dysfunktion bei (Choe *et al.* 2007; Wente *et al.* 2007). So liefern die signifikant erhöhte LXR- $\alpha$ - und die signifikant verringerte SREBP-1c-Expression in den stabil, ACBP-überexprimierenden Zelllinien eine Erklärung für die stark beeinträchtigte Insulinsekretion der INS-1E-Klone unter basalen, wie stimulierenden Glukosekonzentrationen (Abb. 36).

Auch die signifikant erhöhte PGC-1 $\alpha$ -Expression in den stabil transfizierten INS-1E-Zelllinien könnte für den Verlust der Insulinantwort der Zellen verantwortlich sein. So beschreiben Yoon *et al.* (2003) eine Korrelation zwischen einer PGC-1 $\alpha$ -Überexpression und einer verringerten Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen. In INS-1E-Zellen stimuliert PGC-1 $\alpha$  zudem die Aktivierung der UCP2-Expression, eines potenten Inhibitors der GSIS (Oberkofler *et al.* 2006). PGC-1 $\alpha$  wird u.a. durch Deacetylierung von SIRT-1, einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacetylase, aktiviert (Rodgers *et al.* 2008). In den ACBP-überexprimierenden INS-1E-Zellen ist die SIRT-1-Expression signifikant erhöht - bei gleichzeitig stark verminderter Insulinsekretion. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung stellten Bordone *et al.* (2006) eine GSIS-fördernde Wirkung von SIRT-1 fest. Diese wird über eine direkte UCP2-Repression durch SIRT-1-Bindung an die Promotorregion vermittelt. Da SIRT-1 aber auch ein potenter Aktivator von PGC-1 $\alpha$  ist und dessen Expression in den stabil transfizierten Zellen signifikant erhöht ist, könnte PGC-1 $\alpha$  die reprimierende Bindung von SIRT-1 an den UCP2-Promotor verhindern. Dies würde die UCP2-Expression forcieren und die GSIS der Zellen inhibieren, wie von Oberkofler *et al.* (Oberkofler *et al.* 2006) beschrieben. PGC-1 $\alpha$

fungiert zudem als Coaktivator von LXR- $\alpha$  (Oberkofler *et al.* 2003), dessen Expression in den stabil, ACBP-über-exprimierenden INS-1E-Zellen ebenfalls signifikant erhöht ist. Da für die Überexpression beider Transkriptionsfaktoren negative Effekte auf die GSIS pankreatischer  $\beta$ -Zellen belegt sind (Yoon *et al.* 2003; Choe *et al.* 2007; Wentz *et al.* 2007), könnten diese der potentiell stimulierenden Wirkung von SIRT-1 entgegen wirken.

Die ACBP-Überexpression könnte in den INS-1E-Zellen zu einer verstärkten intrazellulären Lipidsynthese führen, die im Zusammenspiel mit der hohen Glukosekonzentration zur Glukolipotoxizität beiträgt und die GSIS der stabil transfizierten Zellen beeinträchtigt.



**Abb. 36: Schematische Darstellung des Einflusses der ACBP-Überexpression auf die mRNA-Level nukleärer Transkriptionsfaktoren & die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) in den stabil mit „pcDNA3.1(+)/ACBP“ transfizierten INS-1E-Zellen**

ACBP = Acyl-CoA Bindeprotein, SREBP-1c = “Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c“, PPAR- $\delta$  = “Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\delta$ “, LXR- $\alpha$  = “Liver X Receptor- $\alpha$ “, PGC-1 $\alpha$  = “PPAR- $\gamma$  Coactivator  $\alpha$ “, SIRT-1 = Sirtuin 1, CMV = Cytomegalievirus-Promotor; grün = Anstieg; rot = Inhibition/Reduktion

Um die ACBP-Überexpression in den stabil transfizierten INS-1E-Zellen zu verringern und damit den ursprünglichen Phänotyp mit entsprechender Insulinsekretion wieder zu erhalten, aber auch um in untransfizierten INS-1E, die ACBP-Expression zu blockieren, wurden abschließend siRNA-Versuche durchgeführt.

Transfektionen mit siRNA stellen eine Möglichkeit dar, die mRNA- und damit die Eiweißmenge eines Zielproteins in Zellen deutlich zu reduzieren. Grundlage dieses Prinzips sind kleine dsRNA-Moleküle (Duplexe), die mittels lipophiler Transfektionsreagenzien an die Zellmembran der Zielzellen transportiert und in die Zellen eingeschleust werden. Dort werden sie im Cytoplasma vom „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) gebunden, dessen Helikase die Doppelstränge entwindet und voneinander trennt. Nur einer der verbleibenden RNA-Stränge dient als Matrize über den die RNA-Polymerase des RISC komplementäre zelluläre mRNA bindet. Die so gebundene mRNA wird durch eine RNase abgebaut, was bei erfolgreicher siRNA-Transfektion zu einer Reduktion der Ziel-mRNA führt.

Mit dem für diese Arbeit verwendeten Protokoll gelang es spezifisch die ACBP-mRNA-Konzentration in INS-1E-Zellen signifikant um ~ 60 % zu reduzieren. Unglücklicherweise sank die Transfektionseffizienz und damit die siRNA-vermittelte ACBP-Reduktion mit steigender Zellzahl. Eine hohe Zelldichte (95%ige Konfluenz) ist aber für die Durchführung aussagefähiger Insulinsekretionsexperimente mit den INS-1E entscheidend. Verschiedenste Adaptationen des Protokolls brachten bislang keinen Erfolg. Aufgrund der Unvereinbarkeit des siRNA-Transfektions- und des Insulinsekretionsprotokolls sind daher Aussagen zum Einfluss der ACBP-Repression auf die GSIS der INS-1E-Zellen nicht möglich. Dieser Ansatz bedarf weiterer Optimierung.

Nichtsdestotrotz konnten durch die Konstruktion eines ACBP-exprimierenden Expressionsplasmids und dessen stabile Integration in das Genom der Ratten-Insulinomzelllinie INS-1E neue Erkenntnisse über die nukleären Auswirkungen einer ACBP-Überexpression im Hinblick auf die Expression fett- und glukosestoffwechselfassoziierter Transkriptionsfaktoren gewonnen werden. Gleichzeitig führen diese nukleären Veränderungen zu drastischen intrazellulären Modulationen, die die GSIS dieser Klone inhibieren. Die Analyse der Zielgene und -proteine der, in ihrer Expression potenzierten oder reprimierten, Transkriptionsfaktoren stellt ein nächstes, interessantes Ziel dar. So könnte die

Untersuchung von Enzymen, wie der HSL, und Proteinen, wie dem UCP2, weitere Einblicke in die komplizierten Regulationsmechanismen der GSIS pankreatischer  $\beta$ -Zellen liefern. Zudem könnten die stabil, ACBP-überexprimierenden Zelllinien für Stimulationsversuche, z.B. mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge und verschiedenen Sättigungsgraden sowie für Versuche mit spezifischen Agonisten oder Inhibitoren nukleärer Transkriptionsfaktoren verwendet werden. Auch wäre die Lokalisation des ACBPs in den stabil transfizierten Zellen sowie dessen potentielle Colokalisation mit HNF-4 $\alpha$  oder einem anderen Transkriptionsfaktor von besonderem Interesse. Das generierte *in vitro*-Modell könnte demnach der Verifizierung bislang gewonnener Daten zur Funktion des ACBPs dienen und neue Erkenntnisse ermöglichen.

## 6. Zusammenfassung

Das Fettsäurebindeprotein mit der höchsten Affinität und Spezifität für langkettige, Acyl-CoA (LCFA-CoA) ist das „Acyl-CoA Bindeprotein“ (ACBP). Es fungiert als intrazellulärer Poolbildner, transportiert LCFA-CoA zu den Organellen, ist dadurch an der Lipidsynthese sowie der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren beteiligt, wirkt der Acyl-CoA-bedingten Inhibierung bestimmter Fettstoffwechsellzyme entgegen und liefert die Liganden für nukleäre Transkriptionsfaktoren. Um die Funktion des ACBPs genauer zu analysieren, stellen transgene, ACBP-überexprimierende Ratten interessante Untersuchungsobjekte dar und wurden im Zuge dieser Arbeit für eine Fütterungsstudie eingesetzt.

Im Vergleich zur Niedrigfettdiät (LFD) kommt es bei Wildtypen und transgenen Tieren nach einmonatiger Fütterung einer Hochfettdiät (HFD) zu einem signifikanten Anstieg an zirkulierenden freien Fettsäuren, Plasmatriglyzeriden und -cholesterin. Im Gegensatz zu den Wildtypen fallen insbesondere die deutlich höhere Konzentration an freien Fettsäuren und Triglyzeriden bei den ACBP-überexprimierenden Ratten auf. Zudem treten signifikante Veränderungen bei den Glukose- und Insulinkonzentrationen im Verlauf eines Glukosetoleranztests (GTT) auf. Überdies führt die ACBP-Überexpression in der Leber der transgenen Ratten zu signifikanten Unterschieden in der Expression nukleärer Transkriptionsfaktoren, für die DNA-Bindesequenzen in der Promotorregion des ACBP-Gens beschrieben sind. So sind die transgenen Tiere unter LFD bestrebt, der ACBP-Überexpression in den Hepatocyten durch eine verringerte SREBP-1c-Expression entgegenzuwirken. Gleichzeitig kommt es zu einer signifikant reduzierten Expression von L-FABP, einem weiteren Fettsäurebindeprotein. Diese kompensatorischen Mechanismen fehlen unter HFD. Stattdessen steigt die Expression von PPAR- $\gamma$ , einem lipogenen Transkriptionsfaktor. Die mRNA-Level von LXR- $\alpha$ , HNF-4 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  und SIRT-1 bleiben hingegen unverändert.

Die in dieser Studie ermittelten stoffwechselphysiologischen Auswirkungen und Unterschiede in der hepatischen Expression nukleärer Transkriptionsfaktoren belegen unter den analysierten diätetischen Bedingungen einen deutlichen Einfluss der ACBP-Überexpression auf den Lipidstoffwechsel der transgenen Ratten, der sich negativ auf die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe auswirkt.

Um potentielle zellulären Zusammenhänge zwischen einer verstärkten ACBP-Expression und der glukosestimulierten Insulinsekretion (GSIS) pankreatischer  $\beta$ -Zellen zu untersuchen, bestand der zweite Teil dieser Arbeit darin, *in vitro* eine ACBP-überexprimierende Zelllinie



zu generieren. Dies gelang mit Hilfe eines stabil integrierten Plasmids ins Genom der sekundären Ratten-Insulinomzelllinie INS-1E. Dadurch wurde die ACBP-cDNA der Ratte konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert und führte auf mRNA- und Proteinebene zu einem signifikanten Anstieg an ACBP. Zwei unabhängige Klone wurden anschließend parallel analysiert. Beide zeigten unter basalen, wie stimulierenden Glukosekonzentrationen eine signifikant verringerte Insulinsekretion sowie deutliche Veränderungen hinsichtlich der Expression nukleärer Transkriptionsfaktoren. Die ACBP-Überexpression bewirkt dabei zum einen die signifikante Reduktion der mRNA-Level von PPAR- $\delta$  und SREBP-1c, zum anderen signifikante Anstiege von LXR- $\alpha$ , SIRT-1 und PGC-1 $\alpha$ . Da dauerhaft hohe Konzentrationen dieser lipogenen Transkriptionsfaktoren, wie auch eine anhaltend verminderte SREBP-1c-Expression, mit einer reduzierten GSIS pankreatischer  $\beta$ -Zellen assoziiert werden, liefern diese, durch die ACBP-Überexpression auftretenden Expressionsunterschiede eine Erklärung für die beeinträchtigte Insulinsekretion der stabil transfizierten INS-1E-Zelllinien.

Zusammengenommen belegen die in dieser Arbeit ermittelten Daten, dass chronisch erhöhte zirkulierende Lipide im Zusammenspiel mit der Überexpression des intrazellulären ACBPs sich nicht nur negativ auf den Lipidstoffwechsel und die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe auswirken, sondern zudem direkt die Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen durch spezifische Effekte auf die Expression nukleärer Transkriptionsfaktoren inhibieren.



## 7. Summary

The fatty acid binding protein with the highest affinity and specificity for long-chain acyl-CoA (LCFA-CoA) is the acyl-CoA binding protein (ACBP). It functions as intracellular acyl-CoA pool former, which mediates intermembrane transport of LCFA-CoA and is therefore involved in lipogenesis and fatty acid  $\beta$ -oxidation. Furthermore it relieves acyl-CoA inhibition of certain enzymes and donates ligands for nuclear transcription factors. To analyse the specific functions of ACBP *in vivo*, a transgenic ACBP-overexpressing rat line was created and subsequently used in a feeding study.

In wildtype and transgenic rats high fat diet feeding significantly increased the circulating levels of serum free fatty acids, plasma triglycerides and cholesterol. In comparison to the wildtypes the ACBP-overexpressing animals revealed a pronounced increase especially in free fatty acids and triglycerides. Additionally, the glucose and insulin concentrations during glucose tolerance test (GTT) were significantly altered in transgenic rats. Determination of the expression of liver nuclear transcription factors involved in the regulation of ACBP gene expression itself, showed a remarkable reduction in the expression of SREBP-1c in ACBP-overexpressing animals after low fat diet feeding. Likewise the expression of another lipid binding protein, L-FABP, was significantly impaired. Those results indicate compensatory mechanisms in the liver of transgenic rats under low fat diet conditions. In contrast to these findings, high fat diet feeding further stimulates lipogenesis through the significant upregulation of hepatic PPAR- $\gamma$ . The expression of the nuclear transcription factors LXR- $\alpha$ , HNF-4 $\alpha$ , SIRT-1 and PGC-1 $\alpha$  in the liver are independent of the genotype and diet.

Therefore the data obtained by this study show a specific, diet-dependent influence of ACBP on physiological parameters and hepatic expression of nuclear transcription factors in the transgenic, ACBP-overexpressing rats leading to an impaired fatty acid metabolism with a negative influence on the insulin sensitivity of peripheral tissues.

To address potential cellular correlations between the expression of ACBP and the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) of pancreatic  $\beta$ -cells, the second aim of the study was to generate an ACBP-overexpressing cell line. This was achieved through stable integration of a rat ACBP cDNA expressing plasmid in the genome of INS-1E cells, a well-established rat insulinoma cell line. The constitutive high-level expression causes a significant increase in ACBP mRNA and protein level. Two independent clones were subsequently analysed. Both showed significantly reduced insulin secretion under basal and stimulating glucose

---

concentrations and had marked alterations in the expression of nuclear transcription factors. In either of the ACBP-overexpressing clones the expression of PPAR- $\delta$  and SREBP-1c were significantly down-regulated, whereas LXR- $\alpha$ , SIRT-1 and PGC-1 $\alpha$  were increased. Chronically elevated expression of these lipogenic transcription factors, as well as long-term repression of SREBP-1c are associated with reduced GSIS of pancreatic  $\beta$ -cells. This provides an explanation for the impaired insulin secretion of the generated ACBP-overexpressing INS-1E cell lines.

The results of the present study show that *in vivo* overexpression of intracellular ACBP together with high fat diet feeding negatively influence circulating lipid levels and insulin sensitivity of peripheral tissues. This might be, at least in part, due to altered expression of nuclear transcription factors involved in glucose and fatty acid metabolism. Additionally, the generation of an ACBP-overexpressing  $\beta$ -cell line shed new light on the complex correlation between altered expression of nuclear transcription factors and impaired glucose-stimulated insulin secretion most likely caused by the high ACBP mRNA and protein level.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abo-Hashema, K. A., M. H. Cake, M. A. Lukas and J. Knudsen (2001). "The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I." Int J Biochem Cell Biol **33**(8): 807-15.
- Adeghate, E., P. Schattner and E. Dunn (2006). "An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus." Ann N Y Acad Sci **1084**: 1-29.
- Alaynick, W. A. (2008). "Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism." Mitochondrion **8**(4): 329-37.
- Atshaves, B. P., S. M. Storey, H. Huang and F. Schroeder (2004). "Liver fatty acid binding protein expression enhances branched-chain fatty acid metabolism." Mol Cell Biochem **259**(1-2): 115-29.
- Beaudry, J. B., C. E. Pierreux, G. P. Hayhurst, N. Plumb-Rudewiez, M. C. Weiss, G. G. Rousseau and F. P. Lemaigre (2006). "Threshold levels of hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) acting in synergy with HNF-4 and PGC-1alpha are required for time-specific gene expression during liver development." Mol Cell Biol **26**(16): 6037-46.
- Benton, C. R., D. C. Wright and A. Bonen (2008). "PGC-1alpha-mediated regulation of gene expression and metabolism: implications for nutrition and exercise prescriptions." Appl Physiol Nutr Metab **33**(5): 843-62.
- Bernal-Mizrachi, C., S. Weng, C. Feng, B. N. Finck, R. H. Knutsen, T. C. Leone, T. Coleman, R. P. Mecham, D. P. Kelly and C. F. Semenkovich (2003). "Dexamethasone induction of hypertension and diabetes is PPAR-alpha dependent in LDL receptor-null mice." Nat Med **9**(8): 1069-75.
- Bhuiyan, J., P. H. Pritchard, S. V. Pande and D. W. Secombe (1995). "Effects of high-fat diet and fasting on levels of acyl-coenzyme A binding protein in liver, kidney, and heart of rat." Metabolism **44**(9): 1185-9.
- Borboni, P., L. Condorelli, P. De Stefanis, G. Sesti and R. Lauro (1991). "Modulation of insulin secretion by diazepam binding inhibitor and its processing products." Neuropharmacology **30**(12B): 1399-403.
- Bordone, L., D. Cohen, A. Robinson, M. C. Motta, E. van Veen, A. Czopik, A. D. Steele, H. Crowe, S. Marmor, J. Luo, W. Gu and L. Guarente (2007). "SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction." Aging Cell **6**(6): 759-67.
- Bordone, L., M. C. Motta, F. Picard, A. Robinson, U. S. Jhala, J. Apfeld, T. McDonagh, M. Lemieux, M. McBurney, A. Szilvasi, E. J. Easlson, S. J. Lin and L. Guarente (2006). "Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells." PLoS Biol **4**(2): e31.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Braissant, O., F. Foufelle, C. Scotto, M. Dauca and W. Wahli (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." Endocrinology **137**(1): 354-66.
- Bruhn, H. D., Fölsch, U. R., Schäfer, H. (2008). LaborMedizin, 2. Aufl., Stuttgart, Schattauer GmbH, 515 Seiten
- Burkart, E. M., N. Sambandam, X. Han, R. W. Gross, M. Courtois, C. M. Gierasch, K. Shoghi, M. J. Welch and D. P. Kelly (2007). "Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart." J Clin Invest **117**(12): 3930-9.

- Burton, M., T. M. Rose, N. J. Faergeman and J. Knudsen (2005). "Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP)." *Biochem J* **392**(Pt 2): 299-307.
- Cagen, L. M., X. Deng, H. G. Wilcox, E. A. Park, R. Raghov and M. B. Elam (2005). "Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements." *Biochem J* **385**(Pt 1): 207-16.
- Chao, H., M. Zhou, A. McIntosh, F. Schroeder and A. B. Kier (2003). "ACBP and cholesterol differentially alter fatty acyl CoA utilization by microsomal ACAT." *J Lipid Res* **44**(1): 72-83.
- Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files." *Science* **294**(5548): 1866-70.
- Chen, G., G. Liang, J. Ou, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2004). "Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11245-50.
- Chen, Z. W., B. Agerberth, K. Gell, M. Andersson, V. Mutt, C. G. Ostenson, S. Efendic, J. Barros-Soderling, B. Persson and H. Jornvall (1988). "Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation of insulin release." *Eur J Biochem* **174**(2): 239-45.
- Choe, S. S., A. H. Choi, J. W. Lee, K. H. Kim, J. J. Chung, J. Park, K. M. Lee, K. G. Park, I. K. Lee and J. B. Kim (2007). "Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells." *Diabetes* **56**(6): 1534-43.
- Cohen Simonsen, A., U. Bernchou Jensen, N. J. Faergeman, J. Knudsen and O. G. Mouritsen (2003). "Acyl-coenzyme A organizes laterally in membranes and is recognized specifically by acyl-coenzyme A binding protein." *FEBS Lett* **552**(2-3): 253-8.
- Condon, J., J. E. Shaw, M. Luciano, K. O. Kyvik, N. G. Martin and D. L. Duffy (2008). "A study of diabetes mellitus within a large sample of Australian twins." *Twin Res Hum Genet* **11**(1): 28-40.
- Corkey, B. E., J. T. Deeney, G. C. Yaney, K. Tornheim and M. Prentki (2000). "The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction." *J Nutr* **130**(2S Suppl): 299S-304S.
- Corton, J. C. and H. M. Brown-Borg (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 in caloric restriction and other models of longevity." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **60**(12): 1494-509.
- Costa, E. and A. Guidotti (1991). "Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions." *Life Sci* **49**(5): 325-44.
- Crestani, M., E. De Fabiani, D. Caruso, N. Mitro, F. Gilardi, A. B. Vigil Chacon, R. Patelli, C. Godio and G. Galli (2004). "LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 1): 92-6.
- De Stefanis, P., F. Impagnatiello, A. Berkovich and A. Guidotti (1995). "Inhibitory effect of ODN, a naturally occurring processing product of diazepam binding inhibitor, on secretagogues-induced insulin secretion." *Regul Pept* **56**(2-3): 153-65.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." *Endocr Rev* **20**(5): 649-88.
- Elholm, M., A. Garras, S. Neve, D. Tornehave, T. B. Lund, J. Skorve, T. Flatmark, K. Kristiansen and R. K. Berge (2000). "Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells." *J Lipid Res* **41**(4): 538-45.

- Eto, K., Y. Tsubamoto, Y. Terauchi, T. Sugiyama, T. Kishimoto, N. Takahashi, N. Yamauchi, N. Kubota, S. Murayama, T. Aizawa, Y. Akanuma, S. Aizawa, H. Kasai, Y. Yazaki and T. Kadowaki (1999). "Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion." *Science* **283**(5404): 981-5.
- Faergeman, N. J. and J. Knudsen (2002). "Acyl-CoA binding protein is an essential protein in mammalian cell lines." *Biochem J* **368**(Pt 3): 679-82.
- Faergeman, N. J., B. W. Sigurskjold, B. B. Kragelund, K. V. Andersen and J. Knudsen (1996). "Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme A binding protein studied by titration calorimetry." *Biochemistry* **35**(45): 14118-26.
- Ferre, P. (2004). "The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity." *Diabetes* **53 Suppl 1**: S43-50.
- Fisher, E., I. Nitz, C. Gieger, H. Grallert, H. Gohlke, I. Lindner, S. Dahm, H. Boeing, B. Burwinkel, W. Rathmann, H. E. Wichmann, J. Schrezenmeir, T. Illig and F. Doring (2007a). "Association of acyl-CoA-binding protein (ACBP) single nucleotide polymorphisms and type 2 diabetes in two German study populations." *Mol Nutr Food Res* **51**(2): 178-84.
- Fisher, E., I. Nitz, I. Lindner, D. Rubin, H. Boeing, M. Mohlig, J. Hampe, S. Schreiber, J. Schrezenmeir and F. Doring (2007b). "Candidate gene association study of type 2 diabetes in a nested case-control study of the EPIC-Potsdam cohort - role of fat assimilation." *Mol Nutr Food Res* **51**(2): 185-91.
- Franch, J., J. L. Andersen, J. Jensen, P. K. Pedersen and J. Knudsen (2002). "Acyl-coenzyme A binding protein expression is fibre-type specific in rat skeletal muscle but not affected by moderate endurance training." *Pflugers Arch* **443**(3): 387-93.
- Frye, R. A. (1999). "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1): 273-9.
- Fu, X., J. G. Menke, Y. Chen, G. Zhou, K. L. MacNaul, S. D. Wright, C. P. Sparrow and E. G. Lund (2001). "27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells." *J Biol Chem* **276**(42): 38378-87.
- Gavish, M. and R. Weizman (1997). "Role of peripheral-type benzodiazepine receptors in steroidogenesis." *Clin Neuropharmacol* **20**(6): 473-81.
- Gavrilova, O., M. Haluzik, K. Matsusue, J. J. Cutson, L. Johnson, K. R. Dietz, C. J. Nicol, C. Vinson, F. J. Gonzalez and M. L. Reitman (2003). "Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass." *J Biol Chem* **278**(36): 34268-76.
- Gerhart-Hines, Z., J. T. Rodgers, O. Bare, C. Lerin, S. H. Kim, R. Mostoslavsky, F. W. Alt, Z. Wu and P. Puigserver (2007). "Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha." *Embo J* **26**(7): 1913-23.
- Gossett, R. E., R. D. Edmondson, C. A. Jolly, T. H. Cho, D. H. Russell, J. Knudsen, A. B. Kier and F. Schroeder (1998). "Structure and function of normal and transformed murine acyl-CoA binding proteins." *Arch Biochem Biophys* **350**(2): 201-13.
- Gossett, R. E., A. A. Frolov, J. B. Roths, W. D. Behnke, A. B. Kier and F. Schroeder (1996). "Acyl-CoA binding proteins: multiplicity and function." *Lipids* **31**(9): 895-918.
- Gossett, R. E., F. Schroeder, J. M. Gunn and A. B. Kier (1997). "Expression of fatty acyl-CoA binding proteins in colon cells: response to butyrate and transformation." *Lipids* **32**(6): 577-85.
- Hallows, W. C., S. Lee and J. M. Denu (2006). "Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10230-5.



- Helleboid-Chapman, A., S. Helleboid, H. Jakel, C. Timmerman, C. Sergheraert, F. Pattou, J. Fruchart-Najib and J. C. Fruchart (2006). "Glucose regulates LXRalpha subcellular localization and function in rat pancreatic beta-cells." *Cell Res* **16**(7): 661-70.
- Helledie, T., L. Grontved, S. S. Jensen, P. Kiilerich, L. Rietveld, T. Albrektsen, M. S. Boysen, J. Nohr, L. K. Larsen, J. Fleckner, H. G. Stunnenberg, K. Kristiansen and S. Mandrup (2002). "The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents." *J Biol Chem* **277**(30): 26821-30.
- Hertz, R., B. Kalderon, T. Byk, I. Berman, G. Za'tara, R. Mayer and J. Bar-Tana (2005). "Thioesterase activity and acyl-CoA/fatty acid cross-talk of hepatocyte nuclear factor-4{alpha}." *J Biol Chem* **280**(26): 24451-61.
- Hertz, R., J. Magenheim, I. Berman and J. Bar-Tana (1998). "Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha." *Nature* **392**(6675): 512-6.
- Hertz, A. V., L. A. Smith, A. H. Berg, G. W. Cline, G. I. Shulman, P. E. Scherer and D. A. Bernlohr (2006). "Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**(5): E814-23.
- Herzig, K. H., C. Wilgus, I. Schon, K. Tatemoto and U. R. Folsch (1998). "Regulation of the action of the novel cholecystokinin-releasing peptide diazepam binding inhibitor by inhibitory hormones and taurocholate." *Regul Pept* **74**(2-3): 193-8.
- Hoffmann, B., B. P. Robra and E. Swart (2003). "[Social inequality and noise pollution by traffic in the living environment--an analysis by the German Federal Health Survey (Bundesgesundheitsurvey)]." *Gesundheitswesen* **65**(6): 393-401.
- Hondares, E., I. Pineda-Torra, R. Iglesias, B. Staels, F. Villarroya and M. Giralt (2007). "PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(4): 1021-7.
- Hostetler, H. A., H. Huang, A. B. Kier and F. Schroeder (2008). "Glucose directly links to lipid metabolism through high affinity interaction with peroxisome proliferator-activated receptor alpha." *J Biol Chem* **283**(4): 2246-54.
- Hozoji, M., Y. Munehira, Y. Ikeda, M. Makishima, M. Matsuo, N. Kioka and K. Ueda (2008). "Direct interaction of nuclear liver X receptor-beta with ABCA1 modulates cholesterol efflux." *J Biol Chem* **283**(44): 30057-63.
- Huang, H., B. P. Atshaves, A. Frolov, A. B. Kier and F. Schroeder (2005). "Acyl-coenzyme A binding protein expression alters liver fatty acyl-coenzyme A metabolism." *Biochemistry* **44**(30): 10282-97.
- IDF, Diabetes Atlas, 3rd Edition, 2006; <http://www.eatlas.idf.org>
- Inoue, M., T. Ohtake, W. Motomura, N. Takahashi, Y. Hosoki, S. Miyoshi, Y. Suzuki, H. Saito, Y. Kohgo and T. Okumura (2005). "Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice." *Biochem Biophys Res Commun* **336**(1): 215-22.
- Iseki, S., M. Hitomi, T. Ono and H. Kondo (1989). "Immunocytochemical localization of hepatic fatty acid binding protein in the rat intestine: effect of fasting." *Anat Rec* **223**(3): 283-91.
- Iseki, S., H. Kondo, M. Hitomi and T. Ono (1990). "Localization of liver fatty acid-binding protein and its mRNA in the liver and jejunum of rats: an immunohistochemical and in situ hybridization study." *Mol Cell Biochem* **98**(1-2): 27-33.
- Itoh, Y., Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa and M.

- Fujino (2003). "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40." *Nature* **422**(6928): 173-6.
- Ivarsson, R., R. Quintens, S. Dejonghe, K. Tsukamoto, P. in 't Veld, E. Renstrom and F. C. Schuit (2005). "Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin." *Diabetes* **54**(7): 2132-42.
- Jay, M. A. and J. Ren (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus." *Curr Diabetes Rev* **3**(1): 33-9.
- Jolly, C. A., T. Hubbell, W. D. Behnke and F. Schroeder (1997). "Fatty acid binding protein: stimulation of microsomal phosphatidic acid formation." *Arch Biochem Biophys* **341**(1): 112-21.
- Jolly, C. A., D. C. Wilton and F. Schroeder (2000). "Microsomal fatty acyl-CoA transacylation and hydrolysis: fatty acyl-CoA species dependent modulation by liver fatty acyl-CoA binding proteins." *Biochim Biophys Acta* **1483**(1): 185-97.
- Jucker, B. M., C. P. Doe, C. G. Schnackenberg, A. R. Olzinski, K. Maniscalco, C. Williams, T. C. Hu, S. C. Lenhard, M. Costell, R. Bernard, L. Sarov-Blat, K. Steplewski and R. N. Willette (2007). "PPARdelta activation normalizes cardiac substrate metabolism and reduces right ventricular hypertrophy in congestive heart failure." *J Cardiovasc Pharmacol* **50**(1): 25-34.
- Jump, D. B., D. Botolin, Y. Wang, J. Xu, B. Christian and O. Demeure (2005). "Fatty acid regulation of hepatic gene transcription." *J Nutr* **135**(11): 2503-6.
- Kannan, L., J. Knudsen and C. A. Jolly (2003). "Aging and acyl-CoA binding protein alter mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase activity." *Biochim Biophys Acta* **1631**(1): 12-6.
- Kennedy, B. K., E. D. Smith and M. Kaeberlein (2005). "The enigmatic role of Sir2 in aging." *Cell* **123**(4): 548-50.
- Kerkhoff, C., M. Beuck, J. Threige-Rasmussen, F. Spener, J. Knudsen and G. Schmitz (1997). "Acyl-CoA binding protein (ACBP) regulates acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) in human mononuclear phagocytes." *Biochim Biophys Acta* **1346**(2): 163-72.
- Kerner, W., Brückel, J. Böhm, B. O. (2004). Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, basierend auf den evidenzbasierten Leitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft
- Kharroubi, I., C. H. Lee, P. Hekerman, M. I. Darville, R. M. Evans, D. L. Eizirik and M. Cnop (2006). "BCL-6: a possible missing link for anti-inflammatory PPAR-delta signalling in pancreatic beta cells." *Diabetologia* **49**(10): 2350-8.
- Kiehne, K., G. Brunke, D. Meyer, J. Harder and K. H. Herzig (2005). "Oesophageal defensin expression during Candida infection and reflux disease." *Scand J Gastroenterol* **40**(5): 501-7.
- Klinke, R., Pape, H., Silbernagl, S. (2005). Physiologie, 5. überarb. Aufl., Stuttgart, G. Thieme, 930 Seiten
- Knudsen, J. (1991). "Acyl-CoA-binding and transport, an alternative function for diazepam binding inhibitor (DBI), which is identical with acyl-CoA-binding protein." *Neuropharmacology* **30**(12B): 1405-10.
- Knudsen, J., S. Mandrup, J. T. Rasmussen, P. H. Andreasen, F. Poulsen and K. Kristiansen (1993). "The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI)." *Mol Cell Biochem* **123**(1-2): 129-38.
- Knudsen, J., T. B. Neergaard, B. Gaigg, M. V. Jensen and J. K. Hansen (2000). "Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling." *J Nutr* **130**(2S Suppl): 294S-298S.

- Kolmer, M., A. Rovio and H. Alho (1995). "The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans." *Biochem J* **306 ( Pt 2)**: 327-30.
- Kyrmizi, I., P. Hatzis, N. Katrakili, F. Tronche, F. J. Gonzalez and I. Talianidis (2006). "Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development." *Genes Dev* **20**(16): 2293-305.
- Lawrence, J. W., D. J. Kroll and P. I. Eacho (2000). "Ligand-dependent interaction of hepatic fatty acid-binding protein with the nucleus." *J Lipid Res* **41**(9): 1390-401.
- Letexier, D., O. Peroni, C. Pinteur and M. Beylot (2005). "In vivo expression of carbohydrate responsive element binding protein in lean and obese rats." *Diabetes Metab* **31**(6): 558-66.
- Li, J., G. Ning and S. A. Duncan (2000). "Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha." *Genes Dev* **14**(4): 464-74.
- Li, Y., C. Bolten, B. G. Bhat, J. Woodring-Dietz, S. Li, S. K. Prayaga, C. Xia and D. S. Lala (2002). "Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism." *Mol Endocrinol* **16**(3): 506-14.
- Lin, M. C., C. Arbeeny, K. Bergquist, B. Kienzle, D. A. Gordon and J. R. Wetterau (1994). "Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides." *J Biol Chem* **269**(46): 29138-45.
- Lu, D., H. Mulder, P. Zhao, S. C. Burgess, M. V. Jensen, S. Kamzolova, C. B. Newgard and A. D. Sherry (2002). "<sup>13</sup>C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2708-13.
- MacDonald, M. J., L. A. Fahien, L. J. Brown, N. M. Hasan, J. D. Buss and M. A. Kendrick (2005). "Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**(1): E1-15.
- Maechler, P. and C. B. Wollheim (1999). "Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis." *Nature* **402**(6762): 685-9.
- Mandrup, S., R. Hummel, S. Ravn, G. Jensen, P. H. Andreasen, N. Gregersen, J. Knudsen and K. Kristiansen (1992). "Acyl-CoA-binding protein/diazepam-binding inhibitor gene and pseudogenes. A typical housekeeping gene family." *J Mol Biol* **228**(3): 1011-22.
- Mandrup, S., R. V. Sorensen, T. Helledie, J. Nohr, T. Baldursson, C. Gram, J. Knudsen and K. Kristiansen (1998). "Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by expression of acyl-CoA-binding protein antisense RNA." *J Biol Chem* **273**(37): 23897-903.
- Martin, G. G., H. Danneberg, L. S. Kumar, B. P. Atshaves, E. Erol, M. Bader, F. Schroeder and B. Binas (2003a). "Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene." *J Biol Chem* **278**(24): 21429-38.
- Martin, G. G., H. Huang, B. P. Atshaves, B. Binas and F. Schroeder (2003b). "Ablation of the liver fatty acid binding protein gene decreases fatty acyl CoA binding capacity and alters fatty acyl CoA pool distribution in mouse liver." *Biochemistry* **42**(39): 11520-32.
- Massotti, M., E. Slobodyansky, D. Konkell, E. Costa and A. Guidotti (1991). "Regulation of diazepam binding inhibitor in rat adrenal gland by adrenocorticotropin." *Endocrinology* **129**(2): 591-6.
- Merglen, A., S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C. B. Wollheim and P. Maechler (2004). "Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells." *Endocrinology* **145**(2): 667-78.



- Miura, A., K. Yamagata, M. Kakei, H. Hatakeyama, N. Takahashi, K. Fukui, T. Nammo, K. Yoneda, Y. Inoue, F. M. Sladek, M. A. Magnuson, H. Kasai, J. Miyagawa, F. J. Gonzalez and I. Shimomura (2006). "Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* **281**(8): 5246-57.
- Moreno, S., S. Farioli-Vecchioli and M. P. Ceru (2004). "Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS." *Neuroscience* **123**(1): 131-45.
- Naiki, T., M. Nagaki, Y. Shidoji, H. Kojima, M. Imose, T. Kato, N. Ohishi, K. Yagi and H. Moriwaki (2002). "Analysis of gene expression profile induced by hepatocyte nuclear factor 4alpha in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray." *J Biol Chem* **277**(16): 14011-9.
- Neess, D., P. Kiilerich, M. B. Sandberg, T. Helledie, R. Nielsen and S. Mandrup (2006). "ACBP--a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene." *Mol Cell Biochem* **284**(1-2): 149-57.
- Nitz, I., F. Doring, J. Schrezenmeir and B. Burwinkel (2005). "Identification of new acyl-CoA binding protein transcripts in human and mouse." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(11): 2395-405.
- Noma, Y., S. Bonner-Weir, J. B. Latimer, A. M. Davalli and G. C. Weir (1996). "Translocation of glucokinase in pancreatic beta-cells during acute and chronic hyperglycemia." *Endocrinology* **137**(4): 1485-91.
- Oberkofler, H., K. Klein, T. K. Felder, F. Krempler and W. Patsch (2006). "Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the transcriptional regulation of the human uncoupling protein 2 gene in INS-1E cells." *Endocrinology* **147**(2): 966-76.
- Oberkofler, H., E. Schraml, F. Krempler and W. Patsch (2003). "Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha." *Biochem J* **371**(Pt 1): 89-96.
- Oikari, S., T. Ahtialansaari, M. V. Heinonen, T. Mauriala, S. Auriola, K. Kiehne, U. R. Folsch, J. Janne, L. Alhonen and K. H. Herzig (2008a). "Downregulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein overexpression in transgenic rats." *Pflugers Arch* **456**(2): 369-77.
- Oikari, S., T. Ahtialansaari, A. Huotari, K. Kiehne, U. R. Folsch, S. Wolffram, J. Janne, L. Alhonen and K. H. Herzig (2008b). "Effect of medium- and long-chain fatty acid diets on PPAR and SREBP-1 expression and glucose homeostasis in ACBP-overexpressing transgenic rats." *Acta Physiol (Oxf)* **194**(1): 57-65.
- Ostenson, C. G., B. Ahren, S. Karlsson, J. Knudsen and S. Efendic (1994). "Inhibition by rat diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein of glucose-induced insulin secretion in the rat." *Eur J Endocrinol* **131**(2): 201-4.
- Ou, J., H. Tu, B. Shan, A. Luk, R. A. DeBose-Boyd, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2001). "Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6027-32.
- Oyadomari, S., F. Matsuno, S. Chowdhury, T. Kimura, K. Iwase, E. Araki, M. Shichiri, M. Mori and M. Takiguchi (2000). "The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver." *FEBS Lett* **478**(1-2): 141-6.
- Pappan, K. L., Z. Pan, G. Kwon, C. A. Marshall, T. Coleman, I. J. Goldberg, M. L. McDaniel and C. F. Semenkovich (2005). "Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently

- regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion." *J Biol Chem* **280**(10): 9023-9.
- Parizzas, M. (2002). "Molecular mechanisms leading to the development of diabetes." *Drug News Perspect* **15**(6): 338
- Petrescu, A. D., H. R. Payne, A. Boedecker, H. Chao, R. Hertz, J. Bar-Tana, F. Schroeder and A. B. Kier (2003). "Physical and functional interaction of Acyl-CoA-binding protein with hepatocyte nuclear factor-4 alpha." *J Biol Chem* **278**(51): 51813-24.
- Ponugoti, B., S. Fang and J. K. Kemper (2007). "Functional interaction of hepatic nuclear factor-4 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in CYP7A1 regulation is inhibited by a key lipogenic activator, sterol regulatory element-binding protein-1c." *Mol Endocrinol* **21**(11): 2698-712.
- Prentki, M., S. Vischer, M. C. Glennon, R. Regazzi, J. T. Deeney and B. E. Corkey (1992). "Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion." *J Biol Chem* **267**(9): 5802-10.
- Prieur, X., F. G. Schaap, H. Coste and J. C. Rodriguez (2005). "Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway." *Mol Endocrinol* **19**(12): 3107-25.
- Puigserver, P. (2005). "Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha." *Int J Obes (Lond)* **29** **Suppl 1**: S5-9.
- Ramsey, K. M., K. F. Mills, A. Satoh and S. Imai (2008). "Age-associated loss of Sirt1-mediated enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in beta cell-specific Sirt1-overexpressing (BESTO) mice." *Aging Cell* **7**(1): 78-88.
- Rasmussen, J. T., N. J. Faergeman, K. Kristiansen and J. Knudsen (1994). "Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis." *Biochem J* **299** ( Pt 1): 165-70.
- Rasmussen, J. T., J. Rosendal and J. Knudsen (1993). "Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor." *Biochem J* **292** ( Pt 3): 907-13.
- Raso, G. M., E. Esposito, A. Iacono, M. Pacilio, S. Cuzzocrea, R. B. Canani, A. Calignano and R. Meli (2009). "Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat." *Eur J Pharmacol* **604**(1-3): 125-31.
- Ravnskjaer, K., M. Boergesen, L. T. Dalgaard and S. Mandrup (2006). "Glucose-induced repression of PPARalpha gene expression in pancreatic beta-cells involves PP2A activation and AMPK inactivation." *J Mol Endocrinol* **36**(2): 289-99.
- Ravnskjaer, K., M. Boergesen, B. Rubi, J. K. Larsen, T. Nielsen, J. Fridriksson, P. Maechler and S. Mandrup (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) potentiates, whereas PPARgamma attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells." *Endocrinology* **146**(8): 3266-76.
- Roche, E., S. Farfari, L. A. Witters, F. Assimacopoulos-Jeannet, S. Thumelin, T. Brun, B. E. Corkey, A. K. Saha and M. Prentki (1998). "Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression." *Diabetes* **47**(7): 1086-94.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, Z. Gerhart-Hines and P. Puigserver (2008). "Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways." *FEBS Lett* **582**(1): 46-53.

- Rodgers, J. T., C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman and P. Puigserver (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." *Nature* **434**(7029): 113-8.
- Ronnebaum, S. M., O. Ilkayeva, S. C. Burgess, J. W. Joseph, D. Lu, R. D. Stevens, T. C. Becker, A. D. Sherry, C. B. Newgard and M. V. Jensen (2006). "A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion." *J Biol Chem* **281**(41): 30593-602.
- Sandberg, M. B., M. Bloksgaard, D. Duran-Sandoval, C. Duval, B. Staels and S. Mandrup (2005a). "The gene encoding acyl-CoA-binding protein is subject to metabolic regulation by both sterol regulatory element-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in hepatocytes." *J Biol Chem* **280**(7): 5258-66.
- Sandberg, M. B., J. Fridriksson, L. Madsen, V. Rishi, C. Vinson, H. Holmsen, R. K. Berge and S. Mandrup (2005b). "Glucose-induced lipogenesis in pancreatic beta-cells is dependent on SREBP-1." *Mol Cell Endocrinol* **240**(1-2): 94-106.
- Santini, E., P. Fallahi, S. M. Ferrari, A. Masoni, A. Antonelli and E. Ferrannini (2004). "Effect of PPAR-gamma activation and inhibition on glucose-stimulated insulin release in INS-1e cells." *Diabetes* **53 Suppl 3**: S79-83.
- Schachtrup, C., T. Emmler, B. Bleck, A. Sandqvist and F. Spener (2004). "Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins." *Biochem J* **382**(Pt 1): 239-45.
- Schroeder, F., A. D. Petrescu, H. Huang, B. P. Atshaves, A. L. McIntosh, G. G. Martin, H. A. Hostetler, A. Vespa, D. Landrock, K. K. Landrock, H. R. Payne and A. B. Kier (2008). "Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription." *Lipids* **43**(1): 1-17.
- Schuit, F., D. Flamez, A. De Vos and D. Pipeleers (2002). "Glucose-regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of beta-cells." *Diabetes* **51 Suppl 3**: S326-32.
- Shimano, H. (2002). "Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism." *Vitam Horm* **65**: 167-94.
- Shimano, H. (2009). "SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family." *Febs J* **276**(3): 616-21.
- Siiskonen, H., S. Oikari, V. P. Korhonen, A. Pitkanen, V. Voikar, M. Kettunen, J. Hakumaki, T. Wahlfors, R. Pussinen, M. Penttonen, K. Kiehne, S. K. Kaasinen, L. Alhonen, J. Janne and K. H. Herzig (2007). "Diazepam binding inhibitor overexpression in mice causes hydrocephalus, decreases plasticity in excitatory synapses and impairs hippocampus-dependent learning." *Mol Cell Neurosci* **34**(2): 199-208.
- Smyth, S. and A. Heron (2006). "Diabetes and obesity: the twin epidemics." *Nat Med* **12**(1): 75-80.
- Stienstra, R., C. Duval, M. Muller and S. Kersten (2007a). "PPARs, Obesity, and Inflammation." *PPAR Res* **2007**: 95974.
- Stienstra, R., S. Mandrup, D. Patsouris, C. Maass, S. Kersten and M. Muller (2007b). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation." *Endocrinology* **148**(6): 2753-63.
- Swinnen, J. V., M. Esquenet, J. Rosseels, F. Claessens, W. Rombauts, W. Heyns and G. Verhoeven (1996). "A human gene encoding diazepam-binding inhibitor/acy1-CoA-binding protein: transcription and hormonal regulation in the androgen-sensitive human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP." *DNA Cell Biol* **15**(3): 197-208.
- Tang, Q. Q., M. Gronborg, H. Huang, J. W. Kim, T. C. Otto, A. Pandey and M. D. Lane (2005). "Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and

- glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(28): 9766-71.
- Tobin, K. A., S. M. Ulven, G. U. Schuster, H. H. Steineger, S. M. Andresen, J. A. Gustafsson and H. I. Nebb (2002). "Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis." J Biol Chem **277**(12): 10691-7.
- Todd, M. K., M. J. Watt, J. Le, A. L. Hevener and L. P. Turcotte (2007). "Thiazolidinediones enhance skeletal muscle triacylglycerol synthesis while protecting against fatty acid-induced inflammation and insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(2): E485-93.
- Tomas, A., P. Meda, R. Regazzi, J. E. Pessin and P. A. Halban (2008). "Munc 18-1 and granophilin collaborate during insulin granule exocytosis." Traffic **9**(5): 813-32.
- Vakhrusheva, O., C. Smolka, P. Gajawada, S. Kostin, T. Boettger, T. Kubin, T. Braun and E. Bober (2008). "Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice." Circ Res **102**(6): 703-10.
- Vecchini, A., V. Ceccarelli, G. Nocentini, C. Riccardi, P. Di Nardo and L. Binaglia (2005). "Dietary PUFA modulate the expression of proliferation and differentiation markers in Morris 3924A hepatoma cells." Biochim Biophys Acta **1737**(2-3): 138-44.
- Wang, H., K. Hagenfeldt-Johansson, L. A. Otten, B. R. Gauthier, P. L. Herrera and C. B. Wollheim (2002). "Experimental models of transcription factor-associated maturity-onset diabetes of the young." Diabetes **51 Suppl 3**: S333-42.
- Warburg, O. (1930). *The Metabolism of Tumours*, London, Constable
- Weiss, R. and S. Caprio (2004). "A tale of twins and insulin resistance." J Pediatr **144**(5): 567-8.
- Wente, W., M. B. Brenner, H. Zitzer, J. Gromada and A. M. Efanov (2007). "Activation of liver X receptors and retinoid X receptors induces growth arrest and apoptosis in insulin-secreting cells." Endocrinology **148**(4): 1843-9.
- WHO/NCD/NCS/99.2, Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications (1998); <http://www.who.int/en/>
- Winzell, M. S., K. Strom, C. Holm and B. Ahren (2006). "Glucose-stimulated insulin secretion correlates with beta-cell lipolysis." Nutr Metab Cardiovasc Dis **16 Suppl 1**: S11-6.
- Wojcicka, G., A. Jamroz-Wisniewska, K. Horoszewicz and J. Beltowski (2007). "Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism." Postepy Hig Med Dosw (Online) **61**: 736-59.
- Wolfrum, C., C. M. Borrmann, T. Borchers and F. Spener (2001). "Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2323-8.
- Yanase, H., H. Shimizu, T. Kanda, H. Fujii and T. Iwanaga (2001). "Cellular localization of the diazepam binding inhibitor (DBI) in the gastrointestinal tract of mice and its coexistence with the fatty acid binding protein (FABP)." Arch Histol Cytol **64**(4): 449-60.
- Yaney, G. C. and B. E. Corkey (2003). "Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells." Diabetologia **46**(10): 1297-312.
- Yaney, G. C., H. M. Korchak and B. E. Corkey (2000). "Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells." Endocrinology **141**(6): 1989-98.
- Yang, T., M. Fu, R. Pestell and A. A. Sauve (2006). "SIRT1 and endocrine signaling." Trends Endocrinol Metab **17**(5): 186-91.

- Yang, Y., P. H. Pritchard, J. Bhuiyan, D. W. Secombe and M. H. Moghadasian (2001). "Overexpression of acyl-coA binding protein and its effects on the flux of free fatty acids in McA-RH 7777 cells." *Lipids* **36**(6): 595-600.
- Yellaturu, C. R., X. Deng, L. M. Cagen, H. G. Wilcox, C. M. Mansbach, 2nd, S. A. Siddiqi, E. A. Park, R. Raghov and M. B. Elam (2009). "Insulin enhances posttranslational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles." *J Biol Chem*.
- Yoon, J. C., G. Xu, J. T. Deeney, S. N. Yang, J. Rhee, P. Puigserver, A. R. Levens, R. Yang, C. Y. Zhang, B. B. Lowell, P. O. Berggren, C. B. Newgard, S. Bonner-Weir, G. Weir and B. M. Spiegelman (2003). "Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha." *Dev Cell* **5**(1): 73-83.
- Yoshikawa, T., T. Ide, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, S. Yatoh, T. Kitamine, H. Okazaki, Y. Tamura, M. Sekiya, A. Takahashi, A. H. Hasty, R. Sato, H. Sone, J. Osuga, S. Ishibashi and N. Yamada (2003). "Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling." *Mol Endocrinol* **17**(7): 1240-54.
- Zhou, Y. P. and V. E. Grill (1994). "Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle." *J Clin Invest* **93**(2): 870-6.
- Zieleniak, A., M. Wojcik and L. A. Wozniak (2008). "Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **56**(5): 331-45.
- Zitzer, H., W. Wente, M. B. Brenner, S. Sewing, K. Buschard, J. Gromada and A. M. Efanov (2006). "Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels." *Endocrinology* **147**(8): 3898-905.



## 9. Anhang

### 9.1. Diäten

#### 9.1.1. Low Fat Diet (D12450B; Research Diets Inc., USA)

<u>Bestandteil</u>	<u>kcal</u>
Casein, 80 Mesh	800
L-Cystein	12
Maisstärke	1260
Maltodextrin 10	140
Saccharose	1400
Sojabohnenöl	225
Schweinefett (Cholesterin 0,95 mg/g)	180
Vitamin Mix V10001	40
<b>Energie (kcal)</b>	<b>4057</b>
	<u>% kcal</u>
Protein	20
Kohlenhydrate	70
Fett	10

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

#### 9.1.2. High Fat Diet (D12451; Research Diets Inc., USA)

<u>Bestandteil</u>	<u>kcal</u>
Casein, 80 Mesh	800
L-Cystein	12
Maisstärke	291
Maltodextrin 10	400
Saccharose	691
Sojabohnenöl	225
Schweinefett (Cholesterin 0,95 mg/g)	1598
Vitamin Mix V10001	40
<b>Energie (kcal)</b>	<b>4057</b>
	<u>% kcal</u>
Protein	20
Kohlenhydrate	35
Fett	45

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

## Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Herzig für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Coreferates sowie für die Ermöglichung der Reisen nach Kuopio und Budapest. Frau Prof. Dr. Manuela Dittmar danke ich sehr herzlich für ihre Arbeit als Referentin, für die engagierte Durchsicht meiner Dissertation, die moralische Unterstützung und die freundliche Betreuung.

Bei Dr. Nadine Steubesand, Dipl.-Biol. Gabriele Brunke & Dr. Alexander Arlt bedanke ich mich für das Korrekturlesen des Manuskripts, die Zusammenarbeit im Hormon- und Rezeptorlabor der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, anregende Diskussionen, nette Abende und die „notfallmedizinische Versorgung“ – sowie bei Cornelia Wilgus, Gunda Dechow-Seligmann & Christiane Sandberg für ihre Unterstützung im Labor und ihre Gesellschaft.

Allen Kollegen am „A.I. Virtanen Institute“ in Kuopio möchte ich für die herzerwärmende Freundlichkeit und die fachliche, wie soziale Integration und Hilfestellung während meiner Aufenthalte in Finnland danken, durch die ich dieses Land, seine Menschen und meine Zeit dort in unvergesslicher Erinnerung behalten werde.

Stephan Buch, der zeitweilig mit mir das Büro teilen „musste“, danke ich für seine Gesellschaft, Dr. Oliver v. Kampen und den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Dr. Jochen Hampe für die freundliche Integration, die Hilfe und die stetige Bereitschaft mit mir Mittagessen zu gehen.

Bei meiner Familie bedanke ich mich von Herzen für die Hilfe in allen Lebenslagen und die fortwährende telefonische „Seelsorge“ während der schwierigen Phasen meiner Arbeit. Meinen Eltern und Großeltern insbesondere auch für die finanzielle Unterstützung, meiner Schwester Susanne sowie meinen Freunden (allen voran Sylvi Schröder), für die offenen Ohren, den liebevollen Zuspruch und auch für die z.T. notwendige Nachsicht mit mir.

Abschließend danke ich dem BMBF für die finanzielle Förderung im Rahmen des Kieler Netzwerkes „Nahrungsfett und Stoffwechsel – Genvariabilität, -regulation, -funktion und funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe“.

## **Lebenslauf**

Name Katja Klausz  
Anschrift Eckernförder Str. 19, 24116 Kiel  
Geburtsdatum 6. November 1980  
Geburtsort Neubrandenburg  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand ledig

## **Schulausbildung**

1987-1993 Hauptschule mit Real- und Grundschulteil Teterow Ost in Teterow  
1993-1999 Gymnasium Teterow  
Abschluss: Abitur mit 2,0

## **Studium**

Okt.1999 – Okt. 2005 Studium der Biologie an der Universität Rostock  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Immunologie, Genetik  
nicht-biologisches Nebenfach: med. Mikrobiologie  
Abschluss: Diplom mit „gut bestanden“ (1,6)  
Thema der Diplomarbeit: „Die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 - eine mögliche RNase?“  
Nov. 2005 – Mai 2009 eingeschriebene Promotionsstudentin der Math.-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und wissenschaftliche Angestellte am Uniklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, im Forschungsbereich der Klinik für Allgemeine Innere Medizin für die Anfertigung einer naturwissenschaftlichen Doktorarbeit mit dem Titel: „Funktionelle Analysen zum Acyl-CoA Bindeprotein (ACBP)“

Kiel, den 29.04.2009



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Dipl.-Biol. Katja Klausz, dass diese Dissertation nach Inhalt und Form meine eigenen Arbeit ist und dass sie weder vollständig, noch zum Teil, an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden, bis auf die unten aufgeführten Ausnahmen, noch nicht veröffentlicht.

Kiel, den 29.04.2009

-----  
Dipl.-Biol. Katja Klausz

---

### **Publikation**

Oikari S, Klausz K, Huotari, A, Mauriala T, Auriola S, Purhonen AK, Heinonen MV, Kiehne K, Fölsch UR, Herzig KH „Role of ACBP overexpression on candidate genes (PPAR, SREBP-1, Sirt-1, AMPK, FAS and CPT-1c) involved in fatty acid metabolism in rat hypothalamus“ (Submitted)

### **Kongresse**

Vortrag beim „European Congress on Obesity“ (ECO), Budapest (2007), „Interaction of ACBP with transcription factors in transgenic rats“

Teilnahme am Kongress „Neuroendocrinological Regulation of Food Intake“, Kuopio (2006)