

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (MSc)

Eingereicht von
Korbelius Melanie
Matrikelnummer: 1130701

DIE AUSWIRKUNGEN VON CGI-58 DEFIZIENZ UND ER-STRESS AUF DEN INTESTINALEN LIPIDMETABOLISMUS

Eingereicht an der
**Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Graz**

ausgeführt am
**Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Medizinischen Universität Graz**

unter der Anleitung von Betreuer/in
Univ.-Prof. Dr. Dagmar Kratky
Mag. Sascha Obrowsky, PhD

Graz, März 2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)

Statutory Declaration

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources/resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

Graz,

.....

(Signature)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Hiermit möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit sowohl moralisch als auch fachlich unterstützt haben.

In erster Linie danke ich meinen Betreuern Frau Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Dagmar Kratky und PhD Sascha Obrowsky, die bei Fragen jederzeit für mich da waren und mir ein selbstständiges Arbeiten an einem sehr interessanten Projekt mit einem tollen Team ermöglichten.

Daher gilt auch ein ganz besonderer Dank meinen Arbeitskollegen Silvia Povoden, Madeleine Göritzer, Nemanja Vujic, Branislav Radovic, Vinay Sachdev, Anton Ibrovnik, Stefanie Schlager, Sabrina Rexeis und Christina Leopold, nicht nur für ihre fachliche Unterstützung, sondern besonders auch für die großartige Zeit, die wir zusammen verbracht haben.

Ein sehr großer Dank gilt natürlich auch meiner Familie und meinem Freund, die mich die ganze Studienzeit über sehr motiviert, sowie auch finanziell unterstützt haben und die letzten Monate immer für mich da waren.

DANKE!

Acknowledgement

This Thesis was performed at the Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Medical University of Graz. Hereby I'd like to thank all of those who supported me morally and professionally during the preparation of this work.

Primarily I thank my supervisors Mrs. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Dagmar Kratky, as well as PhD Sascha Obrowsky, who have always been around for answering questions and who gave me the opportunity to work autonomously on a very interesting project with a great team. Therefore, very special thanks to my colleagues Silvia Povoden, Madeleine Göritzer, Nemanja Vujic, Branislav Radovic, Vinay Sachdev, Anton Ibrovnik, Stefanie Schlager, Sabrina Rexeis and Christina Leopold, not only for their scientific critics but also for the great time we spent together.

Moreover, I want to thank my family and my boyfriend for moral encouragement during the whole study as well as for their financial support especially during the last months.

THANK YOU ALL!

Zusammenfassung

Hauptverantwortlich für die steigende Inzidenz metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen ist die gesteigerte Zufuhr von Lipiden mit der Nahrung. Den Enterozyten des Duodenums und Jejunums, den proximalen Teilen des Dünndarms, wird eine essentielle Rolle in der Absorption alimentärer Lipide und der anschließenden Produktion Triglyzerid (TG)-reicher Lipoproteine beigemessen. Nach luminaler Spaltung der TGs in freie Fettsäuren (FS) und Monoacylglycerin (MG) werden diese Hydrolyseprodukte über die apikale Seite der Enterozyten aufgenommen, ehe sie im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu neuen TGs resynthetisiert und als zytosolische Lipid-Droplets (LDs) gespeichert oder als Chylomikronen (CMs) in die Blutbahn abgegeben werden. CMs stellen neben den very low density lipoproteins (VLDL) die wichtigste TG-Quelle für periphere Zellen und Gewebe dar und gelten als Charakteristika der postprandialen Hypertriglyzeridämie.

Die Aktivität der Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), die sowohl im Fettgewebe, als auch in anderen Geweben durch Initiierung der neutralen Lipolyse essentiell für den TG-Katabolismus ist, wird durch das Protein Comparative Gene Identification 58 (CGI-58) um das 20-fache verstärkt. Eine Mutation des humanen CGI-58 führt zur Entstehung des Chanarin-Dorfman Syndroms (CDS), charakterisiert durch ektopischen Lipidakkumulationen besonders in Leber, Muskel, intestinaler Mukosa, Leukozyten und der Haut. Die Rolle von CGI-58 im Dünndarm, insbesondere in der intestinalen Lipidabsorption und im intestinalen Lipidmetabolismus ist weitestgehend unbekannt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Konsequenzen einer darmspezifischen CGI-58 Defizienz (CGI-58 iKO) hinsichtlich des intestinalen Lipidmetabolismus. Nach gezieltem Ausschalten dieses Gens spezifisch im Darm mithilfe des Cre/LoxP-Systems, wurden die Auswirkungen bezüglich ektopischer Lipidakkumulationen, Lipidabsorption und Lipidmetabolismus, sowie auf Plasmalipide und Plasmalipoproteine analysiert. Dazu wurden von WT- und CGI-58 iKO Mäusen Protein- sowie Lipidgehalte der drei Darmabschnitte (Duodenum, Jejunum, Ileum) bestimmt, diese Beobachtungen via histologischer Spezialfärbungen (Ölrot) verifiziert, ein Genexpressionsprofil den Lipidmetabolismus betreffend (Lipogenese, Lipolyse, β -Oxidation) via qRT-PCR erstellt und anhand einer radioaktiven Absorptionsstudie die Resorption alimentärer Lipide untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine intestinale CGI-58 Defizienz zu intestinalen Lipidakkumulationen führt, was eine essentielle Rolle des ATGL-Coaktivators in der Hydrolyse der TG-Speicher indiziert. Des Weiteren konnte auch eine gesteigerte intestinale Lipidabsorption bei intestinaler CGI-58 Defizienz beobachtet werden, während die Plasmaparameter unbeeinflusst blieben. Den Cholesterinmetabolismus betreffend zeigten sich keinerlei Effekte bei intestinaler CGI-58 Defizienz.

Da sich auch weitestgehend kein Einfluss von CGI-58 iKO auf die Gen- und Proteinexpression der ATGL zeigte, wird ein direkter Effekt von CGI-58 iKO auf die ATGL-Regulation im Darm ausgeschlossen. Die beobachteten Lipidakkumulationen werden daher eher auf eine gesteigerte Lipidabsorption als eine verminderte Lipolyse zurückgeführt. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte ein ATGL-Aktivitätsassay durchgeführt werden.

Da Lipidmetabolismus und die Entstehung bzw. Konsequenzen von ER-Stress in engem Zusammenhang stehen, liegt ein weiterer Fokus dieser Arbeit in der Untersuchung des Einflusses von ER-Stress auf den intestinalen Lipidstoffwechsel.

Während die Aktivierung ER-Stress-assoziiierter Pathways zu Veränderungen der Lipidhomöostase bzw. zu gesteigerter Lipogenese führen kann, so induzieren freie FS bzw. Anomalien im Fettstoffwechsel ER-Stress. So speichert das Fettgewebe freie FS in Form von TGs in LDs, während andere Zelltypen, wie beispielsweise Hepatozyten oder Enterozyten, einen limitierten Lipidspeicher aufweisen. Wenn die FS-Pufferkapazität einer Zelle überschritten wird, können die daraus resultierenden erhöhten FS-Konzentrationen cytotoxisch wirken. Dies nennt man Lipotoxizität, die wiederum mit endoplasmatischem Retikulum (ER) Stress assoziiert ist.

Hier konnten wir zeigen, dass eine künstliche Induktion von akutem ER-Stress via Tunicamycin (TM) zu gesteigerten hepatischen TG-Akkumulationen führt, während intestinal verminderte Cholesterinkonzentrationen beobachtet werden können. Insgesamt findet sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen TM-Behandlung und Cholesterinmetabolismus. So führt ein pharmakologisch induzierter ER-Stress auch zu verminderten Plasma-Cholesterinkonzentrationen und deutlich reduzierter intestinaler und hepatischer Cholesterinabsorption.

Abstract

The main reason for the increased incidence of metabolic disorders and cardiovascular diseases is the raise in dietary fat intake. Enterocytes of the duodenum and jejunum, the two proximal parts of the small intestine, play a major role in the absorption of dietary lipids and in further triglyceride (TG)-rich lipoprotein production. After luminal hydrolysis of TGs into free fatty acids (FFA) and monoacylglycerol (MG), these hydrolysis products are taken up by the apical side of the enterocytes, resynthesized to TGs in the endoplasmic reticulum (ER) and either used for chylomicron (CM)-synthesis or serve as a transient lipid storage in form of cytosolic lipid droplets (LDs). CMs and very low density lipoproteins (VLDL) represent the two main TG-sources for peripheral cells and tissues and are characteristics of the postprandial hypertriglyceridemia.

The activity of the adipose triglyceride lipase (ATGL), which mediates the initial step in neutral lipolysis in adipose and non-adipose tissues, is stimulated by its coactivator comparative gene identification 58 (CGI-58) up to 20-fold. Mutations in human CGI-58 gene lead to development of the Chanarin-Dorfman Syndrom (CDS), characterized by ectopic lipid accumulations in liver, muscle, intestinal mucosa, leukocytes and skin. As the role of CGI-58 in the small intestine has not been addressed so far, we created intestine-specific CGI-58 KO mice (CGI-58 iKO) to analyze the consequences of intestinal CGI-58 deficiency on intestinal lipid metabolism.

After knockout of CGI-58 exclusively in the small intestine we checked the influences on ectopic lipid accumulations, lipid absorption, as well as on plasmalipids and plasmalipoproteins. Therefore we analyzed protein- as well as lipidlevels in all three parts of the small intestine, verified these observations with special histological dyes, created an expression profile of genes involved in the lipid metabolism (lipogenesis, lipolysis, β -oxidation) using qRT-PCR, and finally investigated the resorption of dietary lipids by performing an radioactive absorption study.

Our results evidence a role of CGI-58 in hydrolysis of the TG storage pool because of huge accumulations of neutral LDs in the small intestine. Further we demonstrate that intestinal lipid absorption is increased when CGI-58 is missing, while plasmaparameters aren't affected. There's no influence of intestinal CGI-58 deficiency on cholesterol metabolism.

Since CGI-58 iKO reveals no alterations neither in the mRNA- nor in the proteinexpression of ATGL, we suggest that CGI-58 iKO has no direct effect on the regulation of ATGL in the small

intestine. Therefore, the observed accumulations of TGs in the small intestine maybe are due to the increased intestinal TG-absorption, rather than to a decreased lipolysis. To further confirm this hypothesis we should perform an ATGL-activity assay.

Because lipid metabolism and the induction as well as the consequences of ER-Stress are closely linked with each other, this work is also focusing on the impact of pharmacological induced ER-Stress on intestinal lipid metabolism.

Since activation of ER-stress associated pathways results in alterations of lipid homeostasis as well as increased lipogenesis, free fatty acids (FFAs) or anomalies in the lipid metabolism in turn can induce ER-stress. Cells of the white adipose tissue can store FFAs as TGs in cytosolic LDs, non-adipocytes like hepatocytes and enterocytes have a limited lipid-storage. If the FA-puffer capacity of a cell is exceeded, this subsequent increase in FA-concentrations can act cytotoxic, which is termed lipotoxicity – again associated with ER-stress.

Our data demonstrates, that pharmacological induction of acute ER-stress via Tunicamycin (TM) leads to increased hepatic TG-accumulations, as well as decreased intestinal cholesterol-accumulations. There's a clear link between TM-treatment and cholesterol metabolism, confirmed by decreased plasma cholesterol concentrations, decreased cholesterol absorption as well as significantly reduced intestinal and hepatic resorption of dietary cholesterol.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
<i>1.1 Lipidmetabolismus.....</i>	<i>1</i>
1.1.1 intestinale Lipidabsorption	1
1.1.1.1 Triglyzeridabsorption	1
1.1.1.2 Cholesterinabsorption.....	3
1.1.1.3 Phospholipidabsorption	3
1.1.2 Chylomikronen- und Lipoproteinsynthese	3
1.1.2.1 Intestinale Chylomikronsynthese.....	3
1.1.2.2 Hepatische Lipoproteinsynthese.....	4
1.1.2.3 TRL-Assemblierung: Unterschiede Darm/Leber.....	5
1.1.2.4 Lipoproteine: klinische Bedeutung	5
1.1.2.5 pharmakologische Intervention	8
1.1.3 Lipid-Tröpfchen (LDs).....	10
1.1.3.1 Aufbau	10
1.1.4 Lipolyse	11
1.1.4.1 Bedeutung von freien Fettsäuren	12
1.1.4.2 Regulation der LD-assoziierten Lipolyse	12
1.1.5 CGI-58/ABHD5.....	15
1.1.5.1 Chemische und strukturelle Eigenschaften.....	15
1.1.5.2 physiologische Funktion.....	15
1.1.5.3 Aktivierung der ATGL.....	16
1.1.5.4 Einfluss von CGI-58 auf den Lipidmetabolismus	16
1.1.5.5 Chanarin-Dorfman Syndrom	18
<i>1.2 ER-Stress</i>	<i>19</i>
1.2.1 Unfolded Protein Response (UPR)	19
1.2.2 ER-Stress Marker.....	19
1.2.2.1 BiP/Grp78	19
1.2.2.2 PERK/ATF4-Signalweg	20
1.2.2.3 IRE1/XBP1-Signalweg	21
1.2.2.4 ATF6/ATF6c-Signalweg.....	21
1.2.3 Pharmakologische Induktoren für ER-Stress	22

1.2.3.1 Tunicamycin	22
1.2.3.2 Thapsigargin	22
1.2.4 Physiologischer Induktor für ER-Stress: HF/HC-Diät.....	22
1.2.5 ER-Stress und Lipidmetabolismus.....	23
1.2.5.1 ER-Stress im intestinalen Lipidmetabolismus	24
1.2.5.2 ER-Stress im hepatischen Lipidmetabolismus.....	25
2 Hypothese und Ziele	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Reagenzien.....	27
3.1.1 Lysis-Puffer	27
3.1.2 SDS-Gel.....	27
3.1.3 Western-Blot.....	28
3.1.4 PCR	29
3.1.5 Oil Red O Farbstoff.....	29
3.1.6 Absorptionsstudie	30
3.1.7 weitere Chemikalien	30
3.2 Methoden	31
3.2.1 Mausexperimente	31
3.2.1.2 Blutabnahme	32
3.2.1.3 Gewebsentnahme	32
3.2.2 Plasmaparameter	33
3.2.2.1 Triglyzeride	33
3.2.2.2 Freies Glyzerin	33
3.2.2.3 Totales Cholesterin.....	34
3.2.2.4 Freies Cholesterin.....	34
3.2.2.5 Freie Fettsäuren	35
3.2.2.6 Auswertung	35
3.2.3 RNA Extraktion	36
3.2.4 RNA-Gel.....	37
3.2.5 Reverse Transkription	37
3.2.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	38
3.2.7 Histologie	40

3.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford	41
3.2.9 Folch-Extraktion der Lipide	41
3.2.10 Western Blotting.....	42
3.2.10.2 SDS-PAGE.....	43
3.2.10.3 Blotting & Inkubation mit Antikörpern	43
3.2.10.4 Stripping	44
3.2.10.5 Auswertung	45
3.2.11 TG- und Cholesterin-Absorptionsstudie	45
3.2.12 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	46
3.2.13 Diagramme und Statistik.....	46
4 Ergebnisse.....	48
4.1 <i>Intestinale CGI-58 Defizienz (RCD)</i>	48
4.1.1 Überprüfung des darmspezifischen CGI-58 KO	48
4.1.2 Lipidakkumulationen im Gewebe	49
4.1.3 Einfluss des CGI-58 iKO auf den Lipidmetabolismus (Genexpressionsprofil).....	52
4.1.4 Intestinale CGI-58 Defizienz und ATGL-Expression.....	56
4.1.5 Plasmaparameter und Plasmalipoproteine	56
4.1.6 Lipidabsorption bei intestinaler CGI-58 Defizienz	58
4.1.7 Einfluss intraperitonealer Tyloxapol-Injektion auf Lipidabsorption	61
4.2 <i>Intestinale CGI-58 Defizienz (HF/HCD)</i>	66
4.2.1 Überprüfung des intestinalen CGI-58 Knockouts	66
4.2.2 Lipidakkumulationen im Gewebe bei HF/HCD und intestinaler CGI-58 Defizienz	67
4.2.3 Einfluss auf Lipidmetabolismus (Genexpressionsprofil).....	69
4.2.4 Intestinale CGI-58 Defizienz und ATGL-Expression bei HF/HCD.....	72
4.2.5 Plasmaparameter und Plasmalipoproteine	73
4.3 <i>ER-Stress bei intestinaler CGI-58 Defizienz (RCD & HF/HCD)</i>	75
4.4 <i>ER-Stress im intestinalen Lipidstoffwechsel (WT)</i>	77
4.4.1 Tunicamycin als pharmakologischer Induktor für akuten ER-Stress	77
4.4.2 Auswirkungen von Tunicamycin auf Plasmalipide.....	79
4.4.3 Einfluss von Tunicamycin auf intestinalen und hepatischen Lipidmetabolismus	79
4.4.4 Effekt von Tunicamycin auf Lipidabsorption	81
4.4.5 HF/HCD als physiologischer Induktor für ER-Stress?	83

5 Diskussion	84
5.1 <i>Die Rolle von CGI-58 im intestinalen Lipidmetabolismus</i>	84
5.1.3 CGI-58 und ER-Stress.....	91
5.2 <i>Die Rolle von ER-Stress im intestinalen Lipidmetabolismus</i>	93
Abbildungsverzeichnis	96
Tabellenverzeichnis	98
Literaturverzeichnis	99
Abkürzungen	111

1 Einleitung

1.1 Lipidmetabolismus

Der Lipidmetabolismus besteht aus anabolen (Lipogenese) und katabolen (Lipolyse) Mechanismen, die für die Balancierung des Energiegleichgewichts im Organismus essentiell sind (Abb.1). Diese Arbeit fokussiert sich auf die Absorption über die Nahrung aufgenommener Lipide, sowie den darauffolgenden Katabolismus neutraler Lipide (neutrale Lipolyse), insbesondere von Triglyzeriden (TGs).

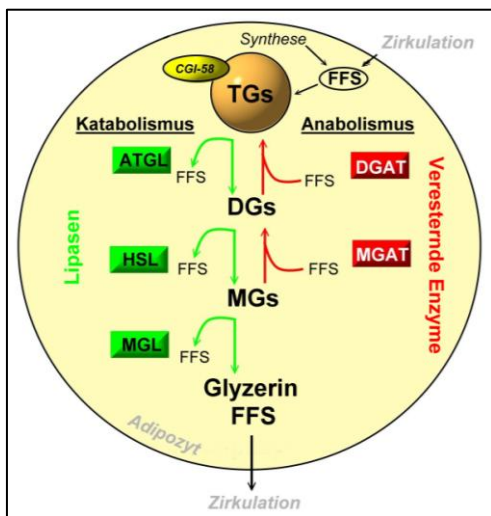


Abb. 1: Anabole und katabole Pathways des Lipidmetabolismus.

Lipolyse (katabolisch): Resorbierte Triglyzeride (TGs) aus der Nahrung werden durch die Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) initial zu Diacylglyceriden (DGs) hydrolysiert, die weiters durch die hormonsensitive Lipase (HSL) in Monoacylglyceride (MGs) gespalten werden. Im letzten Schritt erfolgt die Hydrolyse der MGs in Glycerin, katalysiert durch die Monoacylglycerol-Lipase (MGL). In jedem Schritt wird jeweils eine Fettsäure (FS) - Kette abgespalten. Lipogenese (anabolisch): über den MG-Pathway werden aus MG und freien FS (FFS) schlussendlich mithilfe verschiedener Enzyme (monoacylglycerol:acylCoA transferase, MGAT; diacylglycerol:acylCoA transferase, DGAT) wieder TGs synthetisiert. [1] **Verändert übernommen.**

1.1.1 intestinale Lipidabsorption

Lipide aus der Nahrung wie Cholesterinester (CE), TGs und Phospholipide (PL) werden bereits durch orale Enzyme, gefolgt von Enzymen im Magen verdaut. Anschließend werden die Lipide im Darm (Duodenum) mit Gallensaft emulgiert, hydrolysiert und als Mizellen verpackt. (reviewed in [2])

1.1.1.1 Triglyzeridabsorption

Die Enterozyten in Duodenum und proximalem Jejunum spielen die wichtigste Rolle in der Lipidabsorption. Nach der Spaltung der Nahrungslipide durch die gastrische Lipase werden TGs anschließend im intestinalen Lumen durch die pankreatische TG-Lipase gespalten. (reviewed in [3]) Durch die bevorzugte Hydrolyse der Fettsäure (FS)-Reste an den *sn*-1 und *sn*-3 Positionen des Glycerins werden vorwiegend 2-Monoacylglyceride (MGs) und freie FS (FFS) über die apikale Seite der Enterozyten mithilfe verschiedener Transportproteine aufgenommen. Eine

Isomerisierung des 2-MGs in 1-MGs in einem wässrigen Milieu kann vorkommen, braucht allerdings länger als die intestinale Resorption von 2-MG. [4] Sowohl 1-MG als auch 2-MG können in einer enzymatischen Reaktion, mediiert durch die pankreatische Lipase oder die Cholesterinesterase, zu FFS und Glycerin gespalten und diese Hydrolyseprodukte ebenfalls mithilfe verschiedener Transportproteine aufgenommen werden (Abb.2). (reviewed in [5]) Diese Transportproteine lassen sich in drei Hauptklassen einteilen: periphere Plasmamembran-FS-Bindeproteine (FABPpm), FS-Transportproteine (FATP) und FS-Translokasen/ Cluster Determinant 36 (FAT/CD36). (reviewed in [6]) Durch Nahrungslipide, sowie bei genetisch bedingter Fettleibigkeit und Diabetes mellitus wird die Expression von FAT/CD36 hinaufreguliert. [7]

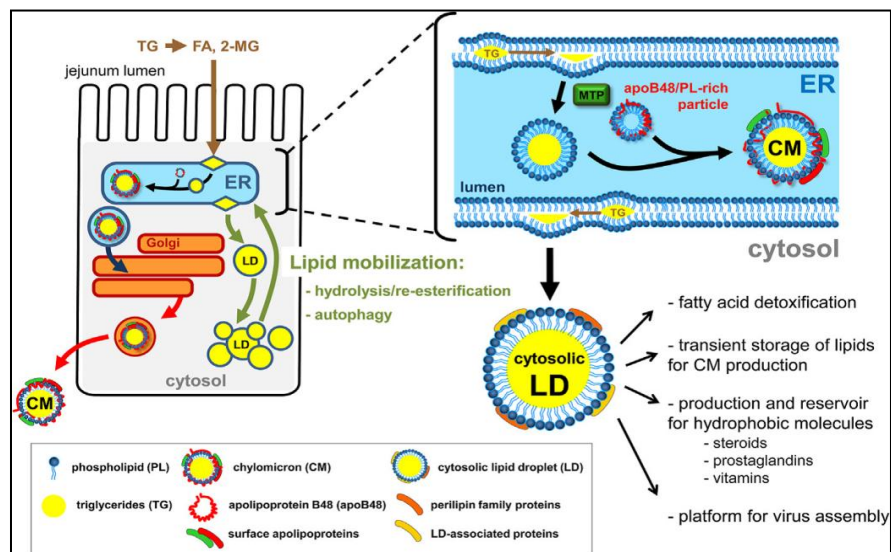


Abb. 2: Modell des Transports und der Verteilung von Neutrallipiden mit Fokus auf LD- und CM-Synthese.

TGs werden im Jejunum luminal in FS und 2-MG hydrolysiert, die anschließend von den Enterozyten aufgenommen und an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) wieder in neue TGs umgewandelt werden. Neusynthetisierte TGs akkumulieren anschließend in der Phospholipid (PL)-Membran des ERs. Das ApolipoproteinB-48 (apoB-48)/PL-reiche Partikel fusioniert mit einem Lipid-Tröpfchen (lipid droplet, LD) des ER-Lumens, um – unter Beteiligung des mikrosomalen TG-Transportproteins (MTP) – ein Chylomikron (CM) zu bilden. So entstandene CMs werden über den Golgi-Apparat zur basalen Seite der Enterozyten transportiert und in die Zirkulation abgegeben, um den Organismus mit Lipiden zu versorgen. Nach einer akuten Lipidzufuhr durch die Nahrung bilden sich auch zytosolische LDs aus dem ER, die als vorübergehende Lipidspeicher agieren. Diese zytosolischen LDs werden für die CM-Synthese via Hydrolyse/Re-Esterifizierung und/oder Autophagie mobilisiert. [3] Unverändert übernommen.

1.1.1.2 Cholesterinabsorption

Die Cholesterin-Absorption wird durch verschiedene Proteine, wie Niemann-Pick C-1-like 1 (NPC1L1), ATP-binding cassette proteins (Abca) oder CD36 vermittelt. Freies Cholesterin wird in den Enterozyten entweder sekretiert oder via acyl-CoA:cholesterol-acyltransferase 2 (Acat2) zu Cholesterinester konvertiert. (reviewed in [8]) Prinzipiell werden aus der Nahrung etwa 50% des Cholesterins intestinal resorbiert, während der Rest ausgeschieden wird. (reviewed in [9, 10])

1.1.1.3 Phospholipidabsorption

Das dominanteste PL im intestinalen Lumen ist Phosphatidylcholin (PC), das in Form von gemischten Mizellen zusammen mit Cholesterin und Gallensalzen transportiert wird. (reviewed in [5]) PL aus der Nahrung und der Galle, werden primär durch die pankreatische Phospholipase A2 (PLA2) in Lysophosphatidylcholin und FFS gespalten, die anschließend durch passive Diffusion und/oder spezifische Transporter von den Enterozyten aufgenommen werden. An der ER-Membran werden dann neben TGs auch wieder Phospholipide synthetisiert. [11, 12]

1.1.2 Chylomikronen- und Lipoproteinsynthese

1.1.2.1 Intestinale Chylomikronsynthese

Die Hydrolyseprodukte werden intrazellulär via zytosolischer FS-Bindeproteine (FABPc) zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert und daraus über zwei verschiedene Wege (Glycerinphosphat- und Monoacylglycerin-Weg) wieder TGs synthetisiert. (reviewed in [13]) Die TG-Synthese über den Monoacylglycerin-Weg erfolgt durch initiale Konvertierung von MG und FS über die monoacylglycerol:acylCoA transferase (MGAT) in DGs, die anschließend über die diacylglycerol:acylCoA transferase (DGAT) in TGs umgewandelt werden. [11, 12] Bei exzessiver Fettzufuhr können die neusynthetisierten TGs auch in der PL-Doppelschicht der ER-Membran akkumulieren, und translozieren anschließend als Lipid Tröpfchen (lipid droplet, LD) in das Zytosol. [14] Der Aufbau und die Funktion dieser transienten Lipidspeicher werden in Kapitel 1.1.4 genauer erläutert.

Die Synthese von Chylomikronen (CMs) erfolgt über zwei Schritte: Zuerst werden neusynthetisierte TGs/PLs mithilfe des mikrosomalen TG-Transportproteins (MTP) mit ApolipoproteinB-48 (ApoB-48) assoziiert und bilden anschließend durch Fusionierung mit LDs des ER-Lumens prechylomicron transport vesicles (PCTVs), die mit dem *cis*-Golgi fusionieren.

CMs bestehen hauptsächlich aus TGs, aber auch aus Cholesterinestern und Phospholipiden. Anschließend werden diese Partikel vom *trans*-Golgi an die Plasmamembran transportiert und dort in die Lymphe sekretiert, bis sie zum Schluss über den Ductus thoracicus in die Blutbahn abgegeben werden. (reviewed in [6, 13])

Die in der Blutbahn zirkulierenden naszierenden CMs reifen durch Kontakt mit ApolipoproteinE (ApoE)- und ApolipoproteinC-II (ApoC-II)- Proteinen des high-density Lipoproteins (HDL). Die Lipoprotein-Lipase (LPL) wird durch ihren Cofaktor ApoC-II aktiviert und stellt durch Hydrolyse der TGs den peripheren Geweben des Organismus freie FS und Glycerin zur Verfügung. Das übrig gebliebene Partikel wird als CM-Remnant bezeichnet. (reviewed in [15, 16]) CE-reiche CM-Remnants, die neben CEs auch fettlösliche Vitamine, ApoB-48 und ApoE beinhalten, werden durch spezifische Bindung an ApoE-Rezeptoren der Lebermembran und anschließende Endozytose via low-density lipoprotein (LDL) receptor-like protein abgebaut und somit aus der Zirkulation entfernt. Die Lipide werden im Anschluss für die Synthese von very low-density Lipoproteinen (VLDLs) oder HDLs herangezogen. (reviewed in [16])

1.1.2.2 Hepatische Lipoproteinsynthese

TGs und Cholesterin werden in der Leber durch MTP mit ApolipoproteinB-100 (ApoB-100) zusammengefügt und bilden so naszierende VLDL-Partikel, die erneut in die Blutzirkulation abgegeben werden. Neben CM stellt VLDL die wichtigste TG-Quelle für periphere Zellen und Gewebe dar. Durch die LPL wird eine Umwandlung der VLDL-Partikel in intermediate-density Lipoproteine (IDL) katalysiert, die wiederum durch die hepatische Lipase in LDL umgewandelt werden. (reviewed in [17]) Abschließend werden sowohl LDL als auch IDL via hepatischer LDL-Rezeptoren gebunden. Nach Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor wird der Komplex internalisiert und zum Endosom transportiert. Während der Rezeptor anschließend wieder an die Zelloberfläche zurücktransportiert wird, wird der Inhalt der Endosomen den Lysosomen zugeführt, in denen die LDL-Partikel durch die lysosomal acid lipase (LAL) hydrolysiert werden. (reviewed in [18])

1.1.2.3 TRL-Assemblierung: Unterschiede Darm/Leber

Zu Triglyzerid-reichen Lipoproteinen (TRLs) zählen neben den CMs, die von den Enterozyten synthetisiert werden, auch VLDLs der Hepatozyten. Diese Partikel werden entweder direkt (Leber) oder über das lymphatische System (Darm) in die Blutzirkulation abgegeben. Beide Formen beinhalten eine Vielzahl an austauschbaren Apolipoproteinen, wobei ApoB das dominanteste nicht-austauschbare Apolipoprotein der CM- und VLDL-Partikel darstellt. Dabei sind die intestinal sekretierten CMs mit ApoB-48, die hepatischen VLDLs mit ApoB-100 assoziiert (*Abb.3*). In der Maus sind diese zwei Organe jedoch nicht anhand ihrer ApoB-Variante zu unterscheiden, da hier auch intestinal ApoB-100 sekretiert wird. Ein weiterer Unterschied dieser zwei Lipoproteine liegt darin, dass CMs ausschließlich postprandial, und VLDLs sowohl im gefasteten, als auch postprandialen Zustand sekretiert werden. [19, 20] Diese postprandiale Lipämie ist in der Forschung besonders aufgrund ihres Risikofaktors für kardiovaskuläre Erkrankungen von Interesse. Vorangegangene Studien zeigten, dass nicht wie anfänglich geglaubt, CMs und CM-Remnants (ApoB-48) [21], sondern VLDL-Remnants (ApoB-100) die charakteristischen Lipoproteine in der postprandialen Hyperlipidämie darstellen. [19]

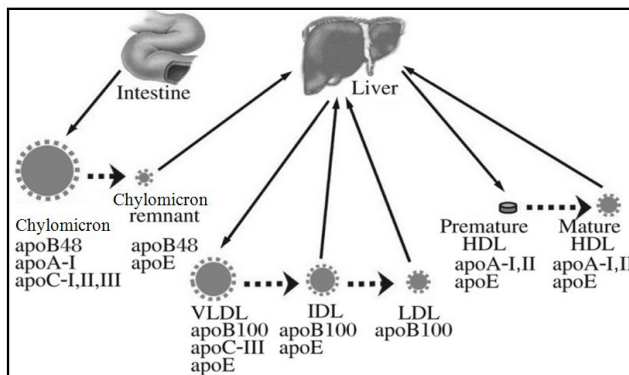


Abb. 3: Lipoproteinmetabolismus.

Die intestinal produzierten CMs enthalten ApoB-48, ApoA-I, ApoC-I, ApoC-II und ApoC-III. Die durch die LPL gespaltenen CMs (CM-Remnants) werden von Hepatozyten aufgenommen. In der Leber wird ApoB-100-reiches VLDL und unreifes HDL gebildet. VLDL wird in der Blutzirkulation zu IDL und LDL hydrolysiert, während das naszierende HDL reift und als reifes HDL eine wichtige Rolle im reversen Cholesterintransport spielt. [22] **Unverändert übernommen.**

1.1.2.4 Lipoproteine: klinische Bedeutung

Eine Störung des Lipoproteinmetabolismus ist mit zahlreichen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, Hypothyroidismus und Nierenerkrankungen, assoziiert. So resultiert Diabetes mellitus in einer Defizienz der Insulin-regulierten LPL mit folgender Typ1-Hyperlipoproteinämie, während Diabetes mellitus und Hypothyreoidismus zu einem erhöhten Risiko für Hypercholesterinämie und Atherosklerose führen. Dies ist auf den positiven Effekt von Insulin und Schilddrüsenhormonen auf hepatische LDL-Rezeptor Interaktionen zurückzuführen, der bei Diabetes mellitus und Hypothyreose fehlt und zu einer verminderten hepatischen LDL-

Aufnahme und -Metabolismus führt. Tabelle 1 zeigt einige der bisher bekannten Formen der familiären Hyperlipoproteinämie und deren Ursache bzw. Folgen. (reviewed in [23])

Tabelle 1: Formen der Hyperlipoproteinämie.

Hyperlipoproteinämie	Defekt	Anmerkungen
Typ I familiäre LPL-Defizienz / Hyperchylomicronämie	<ul style="list-style-type: none"> • LPL-Defizienz • Produktion von abnormalem LDL • ApoC-II Defizienz 	Behandlung: Ernährungsumstellung (wenig Fett, komplexe Kohlenhydrate). Kein erhöhtes Risiko für Erkrankung der Koronararterien.
Typ IIA familiäre Hypercholesterinämie	LDL-Rezeptor Defekt (4 Klassen)	Führt zu Atherosklerose und Erkrankung der Koronararterien.
Typ III familiäre Dysbetalipoproteinämie	Beeinträchtigung der hepatischen Remnant-Clearance durch ApoE-Abnormalität. Patienten exprimieren nur ApoE ₂ -Isoform	Resultiert in Entstehung von Xanthomen, Hypercholesterinämie und Atherosklerose in peripheren und koronaren Arterien durch erhöhte CM und VLDL-Level.
Typ IV familiäre Hypertriglyzeridämie	Erhöhte VLDL-Produktion, assoziiert mit Glukoseintoleranz und Hyperinsulinämie	Assoziiert mit Typ-II Diabetes mellitus und Fettleibigkeit
Typ V	Erhöhte CM- und VLDL-Gehalte durch unbekannte Ursache	Hypertriglyzeridämie und Hypercholesterinämie mit verminderten LDLs und HDLs
Familiäres Liganden-defektes ApoB	2 verschiedene Mutationen, die zu verminderter Affinität des LDLs zum LDL-Rezeptor führen	Drastische Erhöhung der LDL-Level, kein Effekt auf HDL, VLDL und TG. Ursache für Hypercholesterinämie und Erkrankungen der Koronararterien
familiäre LCAT-Defizienz Norum-Krankheit; Fischaugen-Krankheit	HDL kann durch LCAT-Defizienz kein Cholesterin aufnehmen (reverser Cholesteroltransport)	Verminderte CE-Plasmaspiegel, abnormale LDLs und VLDLs, diffuse Hornhauttrübung, hämolytische Anämie, Proteinurie mit Niereninsuffizienz
Wolman's Erkrankung Cholesterinester-Speicherkrankheit	Defekt in lysosomaler CE-Hydrolase; LDL-Metabolismus beeinflusst	Führt zu Hypercholesterinämie, Atherosklerose und Erkrankung der Koronararterien
Heparin-lösbare hepatische TG-Lipase Defizienz	Defizienz der TG-Lipase führt zu Akkumulation TG-reicher HDLs und VLDL-Remnants (IDLs)	Resultiert in Bildung von Xanthomen und Erkrankung der Koronararterien

Besonders das Lipoprotein(a) (Lp(a)) spielt eine essentielle Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen, während die physiologische Rolle bis dato ungeklärt ist. (reviewed in [24]) Es besteht aus einem LDL-Kern, der mit Apolipoprotein(a) durch Disulfidbrücken verbunden ist und wird in der Leber synthetisiert. Einige Studien konnten in den letzten Jahren zeigen, dass erhöhte Lp(a)-Plasmaspiegel einen Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Erkrankungen darstellen. [25] Innerhalb der Zirkulation können Lp(a)-Moleküle oxidativ modifiziert werden. Diese oxidierten Lp(a)s, sowie auch Lp(a) selbst interagieren über Scavenger-Rezeptor Aufnahme mit Makrophagen, was in einer Cholesterinakkumulierung und Schaumzellenbildung resultiert. Oxidiertes Lp(a) wird schneller phagozytiert als andere Lipoproteinpartikel und akkumuliert daher stark im Subendothel. Dies führt zur Atherogenese und stellt somit den direkten Zusammenhang zwischen den Lp(a)-Plasmaspiegeln und der Erkrankung der Koronararterien dar. Eine andere Modifizierung von Lp(a) durch Glykierung trägt ebenfalls zur Atherogenese bei und korreliert stark mit dem Schweregrad der bei TypII Diabetes beobachteten Hyperglykämie. Des Weiteren konnte auch eine antifibrinolytische Wirkung von Lp(a) nachgewiesen werden, indem es die Bindung von Plasminogen an die Endothelzellen, sowie auch dessen Bindung an Fibrinogen und Fibrin inhibiert, infolgedessen die Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin vermindert und der durch z.B. Gefäßverletzung hervorgerufene Thrombus durch Plasmin nicht abgebaut werden kann. (reviewed in [23])

Bei Personen, die nicht an einer familiären Hyperlipoproteinämie leiden, findet die Atherogenese in der postprandialen Periode statt. [21] Postprandial werden die absorbierten Lipide in Form von CMs in die Peripherie transportiert, während die nach der Spaltung durch die LPL entstandenen CM-Remnants von glatten Muskelzellen der Arterien aufgenommen werden und somit zur Entstehung von Atherosklerose beitragen können. Die Rolle von Nahrungslipiden konnte u.a. durch Zusammenhänge zwischen Atherosklerose und einem verzögerten Abbau postprandialer TRLs, dem Vorhandensein von ApoB-48 in atherosklerotischen Plaques, sowie der Aufnahme von CM-Remnants in die Arterienwand gezeigt werden. Iqbal et al. konnten anhand von $Ire1\beta^{-}/ApoE^{-}$ -Mäusen zeigen, dass eine $Ire1\beta$ -Defizienz unabhängig vom genetischen Hintergrund zu einer Hyperlipidämie führt. Das Ausschalten von $Ire1\beta$, einem Enzym das nur intestinal exprimiert wird und durch Regulation des MTPs – das verantwortliche

Chaperon für die Assemblierung und Sekretion von ApoB-Lipoproteinen – die intestinale Lipidabsorption supprimiert, resultiert in einer erhöhten intestinalen Lipidabsorption ohne Veränderung der hepatischen Lipoprotein-Produktion. Bei $Ire1\beta^{-/-}$ kommt es zu einer Erhöhung der intestinalen MTP-Expression, die in einer verstärkten CM-Assemblierung und Lipidabsorption resultiert und in Abwesenheit von ApoE ($ApoE^{-/-}$) zu einer anhaltenden Hyperlipidämie führt. Weitere Beobachtungen zeigten, dass eine $Ire1\beta$ -Defizienz in ApoE-KO Mäusen zu verstärkter Atherosklerose führt – verglichen zu $ApoE^{-/-}$ -Mäusen mit funktionsfähiger $Ire1\beta$. [26]

1.1.2.5 Pharmakologische Intervention

Die postprandialen, aber auch die familiär bedingten Hyperlipoproteinämien sind aufgrund ihres Risikofaktors für kardiovaskuläre Erkrankungen in der Forschung von großem Interesse. Eine medikamentöse Behandlung, um Plasmalipoproteine und/ oder Plasmacholesterin zu vermindern, zielt in erster Linie auf die Reduktion des Risikos für Atherosklerose und koronare Herzkrankheiten ab. Vor pharmakologischer Behandlung sollten jedoch Alternativmethoden wie Ernährungsumstellung und körperliche Betätigung vorrangig in Betracht gezogen werden. Unterscheiden lassen sich hier die Ezetimibe, Statine, Fibrate, Nikotinsäure und Resine.

Ezetimibe

Ezetimibe ist ein Inhibitor der intestinalen Cholesterinabsorption durch Blockierung des Cholesterintransporters NPC1L1, wird zur Verringerung des zirkulierenden LDL-Cholesterins herangezogen und beeinflusst als Monotherapie oder in Kombination mit Statinen auch die TG- und HDL-Plasmaspiegel. Quellen des LDL-Cholesterins sind hepatisches und extrahepatisches (peripheres) Cholesterin. (reviewed in [9])

Statine

Diese Medikamente wirken als Inhibitor der 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA (HMG-CoA) Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese. Sie führen zu einer erhöhten zellulären LDL-Aufnahme durch Hinaufregulierung der LDL-Rezeptoren, da die intrazelluläre hepatische Cholesterinsynthese inhibiert wird und die Zellen somit von extrazellulären Cholesterinquellen abhängig sind – wodurch die Plasmacholesterinspiegel gesenkt werden. Die Nebenwirkungen sind nicht außer Acht zu lassen, da Mevalonat (das

Produkt der HMG-CoA Reduktase Reaktion) auch für die Synthese anderer wichtiger Isoprenoid-Stoffe neben Cholesterin benötigt wird. Statin-Behandlungen werden vorwiegend bei Diabetes mellitus eingesetzt und gegebenenfalls mit Ezetimibe kombiniert. Neben der cholesterinsenkenden Wirkung haben Statine auch einige pleiotrope Effekte, wie beispielsweise eine anti-inflammatorische Wirkung. (reviewed in [23, 27])

Fibrate

Fibrate wie Fenofibrat sind Derivate der Fibrinsäure und gelten als Aktivatoren der peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) Proteinklasse. Natürliche Liganden von PPAR α sind Leukotrien B₄, ungesättigte FS und oxidierte Bestandteile von VLDLs und LDLs. Durch Dimerisierung der PPARs mit retinoid X receptors (RXRs), deren Ligand die 9-*cis*-Retinolsäure darstellt, werden diese aktiv und regulieren die Expression von Genen, die vorwiegend im Lipidmetabolismus involviert sind. Durch Fibrat-Behandlung kommt es zu einer Aktivierung von PPAR α in Leber und Muskel: In der Leber resultiert dies in einer gesteigerten β -Oxidation von FS, gefolgt von einer verminderten hepatischen Sekretion TG- und cholesterinreicher VLDLs, sowie einer gesteigerten Clearance von CM-Remnants, erhöhten HDL-Konzentrationen und einer gesteigerten LPL-Aktivität, die für den Abbau der VLDLs verantwortlich ist. (reviewed in [23])

Nikotinsäure

Niacin bzw. Nikotinsäure wird hauptsächlich für die Verringerung erhöhter Lp(a)-Spiegel eingesetzt. [25] Eine Behandlung mit Niacin führt zu einer drastischen Erhöhung des HDL-Cholesterins, sowie einer deutlichen Reduktion der VLDL- und LDL-Plasmaspiegel durch Inhibierung der hepatischen VLDL-Sekretion. Weiters wird durch Nikotinsäure auch die Freisetzung von FFS aus dem Fettgewebe supprimiert, indem die Lipolyse inhibiert wird. Als unangenehmer Nebeneffekt tritt sehr häufig eine Rötung des Gesichts durch starke kutane Vasodilatation auf. (reviewed in [28])

Resine

Cholestyramine und Colestipol sind nicht-absorbierbare Resine, die Gallensäuren binden, die anschließend nicht von der Leber reabsorbiert, sondern ausgeschieden werden. Der Rückgang dieser hepatischen Resorption von Gallensäuren löst einen inhibierenden Feedback-Mechanismus aus, der die Gallensäuresynthese inhibiert. Als Ergebnis wird eine größere Menge

Cholesterin zu Gallensäuren umgewandelt, um ein konstantes Niveau in Umlauf zu halten. Zusätzlich wird die Synthese von LDL-Rezeptoren erhöht, um zur Gallensäureproduktion vermehrt Cholesterin aufnehmen zu können – die Gesamtwirkung ist damit eine Verringerung des Plasmacholesterins. Diese Behandlung ist bei Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie unwirksam, da diese einen Defekt in den LDL-Rezeptoren aufweisen. (reviewed in [23])

1.1.3 Lipid-Tröpfchen (LDs)

1.1.3.1 Aufbau

LDs ähneln im Aufbau stark den CMs, unterscheiden sich von diesen allerdings durch ihre Größe, Lokalisation sowie spezifische Proteine (Tabelle 2). Die LDs bestehen aus einem Kern neutraler Lipide wie TGs, Cholesterinestern und Sterolestern, umgeben von einem Monolayer aus amphiphatischen Lipiden wie PL und Cholesterin, sowie von an der LD-Oberfläche lokalisierten Proteinen. Das Proteom der LDs inkludiert neben strukturellen Proteinen der Perilipin-Familie (Perilipin 1-5) auch Proteine des Lipidmetabolismus, Membrantransports, Zytoskeletts, der Signaltransduktion, sowie Chaperone (Abb.4).

Murine Enterozyten des Jejunums exprimieren in vivo einzig Perilipin2 und Perilipin3 an der Oberfläche zytosolischer LDs. [30, 31] Die LDs gelten als dynamische Organellen der Zelle und werden durch Akkumulation neusynthetisierter TGs innerhalb der PL-Doppelschicht der ER-Membran initial als primordiale Tröpfchen gebildet und wandern als naszierende LDs ins Zytosol. [32] In Hepatozyten und Enterozyten können diese LDs anstelle des Zytosols auch in das ER-Lumen abgegeben werden, dem eine TRL-Synthese und anschließende Lipidsekretion folgt (siehe CM-Synthese). Die Lipidverteilung zwischen Zytosol und ER-Lumen ist weitestgehend unklar. Zu TRLs gehören ApoB-48 beinhaltende CMs (Enterozyten), sowie ApoB-100 beinhaltende VLDLs (Hepatozyten). (reviewed in [3])

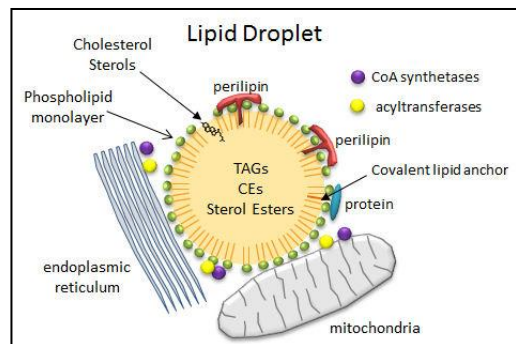


Abb. 4: Aufbau von Lipid Droplets.

Die im Inneren des LD gespeicherten neutralen Lipide (TGs, CEs, Sterolester) sind umgeben von einem Phospholipid-Monolayer. An der Oberfläche der LDs sind viele Proteine lokalisiert. [29] Unverändert übernommen.

Tabelle 2: Unterschied zwischen zytosolischen Lipid Tröpfchen und Chylomikronen. [3]

Zytosolische Lipid Droplets		Chylomikronen
Größe	Bis 6 µm	75-1200 nm
Lokalisation	Zytosol	Lumen des sekretorischen Pathways (ER, Golgi) und extrazellulär
Funktion	Intrazellulärer Lipidspeicher	Lipidverteilung im Organismus
ApoB	Nein	Ja
Perilipin	Ja	Nein

1.1.4 Lipolyse

Aus der Nahrung werden neben TGs, die mengenmäßig den größten Anteil ausmachen, auch PLs, Sphingolipide und Cholesterin resorbiert. Durch Lipolyse werden die Esterbindungen zwischen den Hydroxylgruppen des Glycerins und den Carboxylgruppen der FS aufgespalten, sodass freie FS und freies Glycerin entstehen. Für den Abbau von TGs in FS und Glycerin werden drei Enzyme benötigt: Die adipose tissue triglyceride lipase (ATGL) stellt den initialen Schritt dar, in dem TGs in Diacylglyceride (DG) und FS konvertiert werden. Die hormonsensitive Lipase (HSL) hydrolysiert DGs in Monoacylglyceride (MG) und FS, gefolgt von der Spaltung von MGs durch die MG-Lipase (MGL) (Abb.5). Glycerin als Endprodukt der Lipolyse wird hauptsächlich in der Leber verwertet und nach Phosphorylierung zu α-Glycerophosphat bzw. Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat in die Glykolyse oder Gluconeogenese eingeschleust. [33]

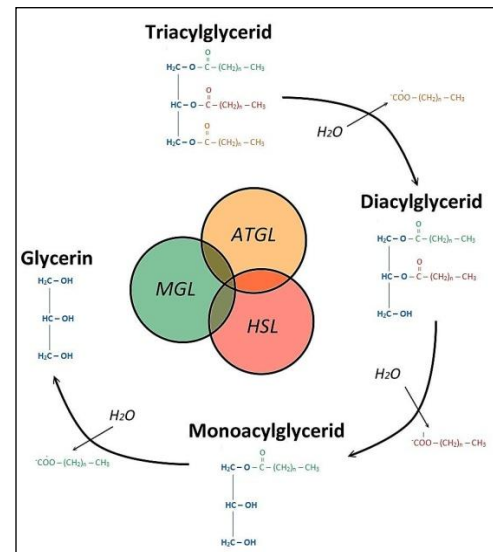


Abb. 5: Lipolyse.

Resorbierte TGs aus der Nahrung werden durch die ATGL initial zu DGs hydrolysiert, die weiters durch die HSL in MGs gespalten werden. Im letzten Schritt erfolgt die Hydrolyse der MGs in Glycerin, katalysiert durch die MGL. In jedem Schritt wird jeweils eine Fettsäurekette abgespalten. [33] **Verändert übernommen.**

Vor bereits 40 Jahren entdeckte man die MGL als wichtige Lipase in der TG-Hydrolyse, während nach der Entdeckung der HSL diese als das hauptverantwortliche Enzym für die Spaltung von TGs gehalten wurde. Als jedoch Haemmerle et al. im Jahr 2002 zeigen konnten, dass durch HSL-Defizienz keine TG-, sondern DG-Akkumulationen in den Geweben zu hervorgerufen werden, wurde der HSL eine essentielle Rolle in der Spaltung von DGs in MGs, jedoch nicht in der TG-

Hydrolyse zugewiesen. [34] Erst im Jahr 2004 wurde dann jenes Enzym entdeckt, das den initialen Schritt der neutralen Lipolyse mediiert: die ATGL. Dieses Enzym wird der Familie der Calcium-unabhängigen Phospholipase A2/Nutrin/Patatin-like phospholipase domain-containing Proteine zugeordnet und ist daher auch als PNPLA2 oder Desnutrin bekannt. [35, 36] Diese drei für den TG-Katabolismus verantwortlichen Enzyme inklusive ihrer komplexen Regulation durch verschiedene, teilweise noch unentdeckte Effektoren u.a. Hormonen, Zytokinen und Adipokinen, bilden das sogenannte „Lipolysom“. (reviewed in [37])

Die Regulation des TG-Katabolismus wird in Kapitel 1.1.5.2 anhand der LD-assozierten Lipolyse detaillierter behandelt.

1.1.4.1 Bedeutung von freien Fettsäuren

Die aus der Lipolyse gewonnenen FS spielen eine wichtige Rolle als Energielieferanten, sowie für die Lipidsynthese von u.a. Membranlipiden und Signalstoffen. Sie agieren entweder direkt oder indirekt als Signalmoleküle und verankern Proteine in biologischen Membranen. (reviewed in [37]) Vorwiegend werden FS in Form von TGs in LDs des weißen Fettgewebes gespeichert, wobei TGs auch ektopisch in LDs der Leber, der Skelett- oder Herzmuskulatur oder anderer Gewebe gespeichert werden können. Trotz ihrer physiologischen Bedeutung ist ein Überschuss an FS schädlich für den Organismus. Erhöhte Konzentrationen an nicht-veresterten FS stören die Stabilität biologischer Membranen, verändern die Säure-Basen-Homöostase und lösen die Produktion schädlicher bioaktiver Lipide aus. All diese Effekte beeinträchtigen die Membranfunktion und führen zu Lipotoxizität, einem Überbegriff für den resultierenden Stress im ER, mitochondrialer Dysfunktion, Entzündung und Zelltod. Als Gegenmaßnahme können einige Zellen nicht-veresterte FS detoxifizieren, indem diese mit Glycerin zu TGs oder mit Cholesterin zu CEs verestert werden. (reviewed in [38, 39])

1.1.4.2 Regulation der LD-assozierten Lipolyse

Wie bereits erwähnt, werden für den Abbau von LD-assozierten TGs zu freien FS und Glycerin drei Enzyme benötigt: ATGL, HSL und MGL. Perilipin kontrolliert sowohl die ATGL- als auch die HSL-Aktivität durch Bindung des ATGL-Coaktivators comparative gene identification 58 (CGI-58) bzw. durch die Regulation der Zugänglichkeit des LDs für die HSL. Im basalen Zustand ist CGI-58 mit Perilipin an der Oberfläche des LDs assoziiert und befindet sich in räumlicher Nähe zur ATGL.

Die HSL wiederum ist im Zytosol lokalisiert. In diesem Zustand mediert die ATGL nur eine basale Hydrolyse der TGs und erlaubt durch Abwesenheit der HSL – und somit fehlender DG-Hydrolyse – eine Reesterifizierung der DGs in TGs (Abb.6). [40, 41]

Regulation durch Hormone

Durch eine lipolytische Stimulation, die bei Nahrungskarenz durch vermehrtes Vorkommen von Katecholaminen und deren Bindung an β -adrenerge Rezeptoren, wie z.B. β_3 an der Zelloberfläche von Adipozyten, erfolgt, wird infolgedessen durch die Bindung stimulatorischer G-Proteine ($G_{\alpha s}$) an den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) die Adenylatcyclase aktiviert. Dadurch steigen die Level von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) an und es kommt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). [1] (reviewed in [42]) Diese phosphoryliert abschließend sowohl HSL

und Perilipin, wodurch es zur Translokation der HSL vom Zytosol an die LD-Oberfläche kommt, während CGI-58 von Perilipin abdissoziiert und an ATGL binden kann. Dabei wird Perilipin an Serin 492 oder Serin 517 phosphoryliert, was die hochaffine Bindung zu CGI-58 löst und eine Translokation des Cofaktors zur ATGL ermöglicht. Im aktivierten Zustand findet somit die vollständige Hydrolyse statt (Abb.6). [40, 41, 43]

Dieser Zustand ist reversibel und kann durch Senkung der zellulären cAMP-Konzentrationen wieder auf den basalen Wert zurückkehren. Andere Hormone, die neben den Katecholaminen zu einer Aktivierung der PKA via GPCR-Stimulation führen, sind beispielsweise Glucagon, parathyreoidäre Hormone, Thyrotropin, α -Melanozyten stimulierendes Hormon

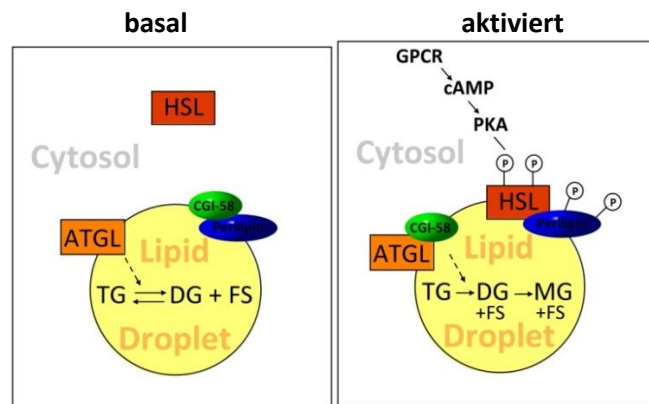


Abb. 6: Lipid Droplet-assoziierte Lipolyse.

Im basalen Zustand sind CGI-58 und Perilipin miteinander assoziiert an die Oberfläche des LDs gebunden. Während die HSL vorwiegend im Zytosol lokalisiert ist, findet sich die ATGL größtenteils an intrazelluläre LDs gebunden, jedoch zu einem geringen Teil auch im Zytosol. Durch Stimulation kommt es zur phosphorylierungsabhängigen Dissoziation des CGI-58 von Perilipin und dessen Assoziation mit ATGL. Unterdessen transloziert die HSL durch Phosphorylierung via PKA an die Oberfläche des LDs, interagiert dort unabhängig von der Perilipin-Phosphorylierung mit Perilipin und ermöglicht nun eine vollständige Lipolyse. [40] **Verändert übernommen.**

(α -MSH) und Adrenocorticotropin. Indes gelten Insulin und der Insulin-like growth factor als inhibierende Hormone der Lipolyse.

Regulation durch Proteine

Auch Proteine tragen durch direkte oder indirekte Beeinflussung der ATGL entscheidend zur Regulation des TG-Katabolismus bei: Neben CGI-58, der als Cofaktor die ATGL-Aktivität um das bis zu 20-fache steigern kann, spielen auch Perilipin (s.o.), sowie der pigment epithelium-derived factor (PEDF) und bestimmte Transportproteine eine essentielle Rolle in der Regulation der Lipolyse. (reviewed in [37]) So konnten Notari et al. zeigen, dass ATGL, die auch im Pigment-Epithelium hoch exprimiert wird und an der Plasmamembran lokalisiert an PEDF bindet, dort als PLA2 agiert. [44] Eine PEDF-Defizienz in Hepatozyten zeigte schließlich, dass die Interaktion von ATGL und PEDF auch in Zellen mit intrazellulär lokalisierter ATGL eine Rolle spielt, da diese PEDF-Defizienz in einer Anhäufung neutraler LDs resultierte, die durch Reexpression des PEDF wieder rückgängig gemacht werden konnte. Dies wiederum indiziert einen aktivierenden Effekt des PEDF auf eine LD-assoziierte, ATGL-medierte Lipolyse. [45]

Weitere Studien identifizierten den vesikulären Transport der ATGL als essentiellen Mechanismus für deren Bindung an die LD-Oberfläche. Soni et al. beobachteten bei einer Defizienz essentieller Komponenten der ER-Golgi Transport-Maschinerie, wie ADP-ribosylation factor 1 (ARF1), dessen guanidin-nucleotide exchange factor (GEF) GBF1 und dessen Effektor coatomer protein coat-complex I (COPI), eine Inhibierung der Translokation von ATGL an die LD-Oberfläche. ATGL bleibt unter diesen Umständen mit dem ER assoziiert. Auch andere Proteine dieser Transportmaschinerie wie small GTP-binding protein 1 (SAR1), und dessen Effektor COPII sind in diesen regulatorischen Prozess involviert. Somit mediiieren COPI, COPII und deren Regulatorproteine die Absonderung der ATGL vom ER an die Oberfläche naszierender LDs. [46]

1.1.5 CGI-58/ABHD5

Der Katabolismus gespeicherter TGs stellt eine wichtige Energiequelle, sowie auch die Basis für Membranlipide und Signalstoffe dar. Zwei Gene, denen eine entscheidende Rolle in der Lipolyse bzw. Hydrolyse von TGs zugewiesen wird, sind *ATGL/PNPLA-2* und *CGI-58/ABHD5*. (reviewed in [47])

1.1.5.1 Chemische und strukturelle Eigenschaften

Das *CGI-58* Gen besteht aus 7 Exons und besitzt eine Länge von 5030 Basenpaaren. Die mRNA, bestehend aus 1050 Nukleotiden, wird in ein 39kDa großes Polypeptid, bestehend aus 349 Aminosäuren (AS), translatiert. Das Synonym ABHD5 weist auf die Zugehörigkeit zu einer Eserase/Thioesterase/Lipase-Familie, der α/β -Hydrolasedomäne-beinhaltenen Proteinfamilie, die 15 Mitglieder zählt, hin. In CGI-58 findet sich das α/β -Motiv zwischen den AS 104 und 345. Weiters besitzt das CGI-58 Protein eine pseudokatalytische Triade an den Positionen 153(Asn)/327(His)/301(Asp). Da das nukleophile Serin des typischen Esterase/Lipase-Motivs GXDXG in CGI-58 durch ein Asparagin ersetzt ist, weist CGI-58 keine Hydrolaseaktivität auf. (reviewed in [47, 48]) Allerdings besitzt das Protein eine intrinsische CoA-abhängige Lysophosphatidsäure-Acyltransferase (LPAAT)-Aktivität, die zur Bildung von Phosphatidylsäure (PA) führt. Diese LPAAT-Aktivität findet sich nur bei Lysophosphatidsäure, jedoch nicht bei anderen Lysophospholipideen oder neutralen Glycerolipiden. Arachidonoyl-CoA und Oleoyl-CoA gelten als präferierte Substrate des Enzyms. [49, 50] Im Jahr 2012 zeigte McMahon jedoch, dass diese beobachtete LPAAT-Aktivität nicht auf CGI-58 selbst, sondern auf eine Proteinkontamination durch *E.coli* (plsC) zurückzuführen ist. [51]

1.1.5.2 Physiologische Funktion

In vitro Studien zeigten, dass CGI-58 als Coaktivator der ATGL, jedoch nicht der HSL, agiert. Durch Interaktion des CGI-58 Proteins mit ATGL wird die TG-Hydrolaseaktivität des Enzyms um das bis zu 20-fache gesteigert. [52] Somit spielt CGI-58 durch ATGL-medierte TG-Hydrolyse eine wichtige physiologische Rolle in der Generierung von Signallipiden und nachfolgender Signaltransduktion. (reviewed in [47]) Mutationen im *CGI-58* Gen, die zu einer für das Chanarin-Dorfman Syndrom (CDS) typischen AS-Substitution führen, resultieren in mutierten CGI-58 Proteinen, die nicht in der Lage sind, die ATGL zu aktivieren. [52]

1.1.5.3 Aktivierung der ATGL

Wie genau CGI-58 mit ATGL interagiert und diese aktiviert, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend erforscht. Gruber et al. konnten jedoch zeigen, dass die N-terminale Region von CGI-58 eine entscheidende Rolle in der LD-Bindung und ATGL-Aktivierung spielt. Während die Proteinstruktur von CGI-58 dicht gepackt ist, so bildet der N-Terminus eine Art Ausläufer, bestehend aus den AS 1-30, die die Lokalisation von CGI-58 an der LD-Oberfläche beeinflussen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich CGI-58 Fragmente, denen das N-terminale Ende fehlte, im Zytoplasma verteilten. Weiters konnte dieses CGI-58 ohne N-Terminus keine ATGL-Aktivierung medieren. Dies lässt darauf zurückschließen, dass die korrekte Lokalisation von CGI-58 an der LD-Oberfläche einen immensen Einfluss auf die Fähigkeit der ATGL-Stimulierung hat. [53]

1.1.5.4 Einfluss von CGI-58 auf den Lipidmetabolismus

Anhand verschiedener Studien wurde bereits die Rolle des CGI-58 Gens im Lipidstoffwechsel ausreichend untersucht.

CGI-58 Überexpression in WAT

Da CGI-58 bekannterweise die Aktivität der ATGL um das bis zu 20-fache steigern kann, liegt der Schluss nahe, dass eine Überexpression des ATGL-Aktivators zu einer Steigerung der Lipolyse *in vivo* führt. Caviglia et al. nutzen dazu transgene Mäuse, die CGI-58 im weißen Fettgewebe (white adipose tissue, WAT) 6-mal höher exprimierten. Weder die basale noch eine via Lipopolysacchariden oder Agonisten des β -adrenergen Rezeptors stimulierte Lipolyse zeigte Unterschiede zwischen Wildtyp (WT) und transgenen CGI-58 Mäusen. Dies weist darauf hin, dass die endogene Expression von CGI-58 keinen limitierenden Faktor im WAT darstellt – weder der basalen noch der stimulierten Lipolyse. [54]

CGI-58 Defizienz und Hepatosteatose

Durch eine Antisense-Oligonucleotide (ASO) Behandlung von Mäusen wurde die CGI-58 Expression in Leber und WAT ausgeschaltet. Sowohl bei normaler als auch bei hochkalorischer Ernährung führte die CGI-58 Defizienz zu einer hepatischen Akkumulation der neutralen Lipide. Diese hepatischen Veränderungen resultierten weiters in einer verminderten TG-Hydrolaseaktivität der Leber, einer verminderten Sekretion TG-reicher Lipoproteine, sowie

reduzierten Plasmakonzentrationen an Ketonkörpern, FFS und Insulin. Trotz des Anstiegs der TG-, DG- und Ceramidgehalte in der Leber blieben die CGI-58 KO Mäuse nach high-fat/high-cholesterol Ernährung (HF/HCD) Glukosetoleranter und insulinsensitiver als ihre WT-Artgenossen, was einen protektiven Effekt der CGI-58 Defizienz auf ernährungsbedingte Fettleibigkeit und Insulinresistenz indiziert. [55]

Einfluss von CGI-58 auf Lipoprotein-Sekretion

Anhand eines *in vitro* Versuchs mit Ratten Hepatoma-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Gen-Silencing von CGI-58 (CGI-58si) zu einer verminderten Sekretion von ApoB-VLDL, TGs und CEs führt. Durch LC-MS Analyse wurde bestätigt, dass die sekretierten TGs bei stillgelegtem CGI-58 hauptsächlich gesättigte FS, sowie kaum Oleat – auch nach Zugabe von Oleat ins Zellmedium – enthielten. Durch radioaktive Markierung des Oleats wurde dessen Metabolismus verfolgt und zeigte eine verminderte Lipolyse zellulärer TGs bei CGI-58si, während Zwischenprodukte von gespeicherten Lipiden in sekretierte TGs und CEs verpackt wurden. Die Inkorporation von exogenem Oleat in sekretierte TGs und CEs hingegen wurde durch CGI-58si nicht beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass CGI-58 die Verwendung von Lipid-Zwischenprodukten, entstanden aus der Lipolyse gespeicherter TGS, für die Assemblierung von ApoB-Lipoproteinen erleichtert. [56]

Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls anhand von *in vitro* Studien mit Hepatoma-Zellen zeigen, dass CGI-58 die Inkorporation von zytoplasmatischen TGs in Lipoproteinpartikel begünstigt. Durch gain-of-function und loss-of-function Experimente konnte gezeigt werden, dass CGI-58 die „Entleerung“ der zellulären TG-Speicher fördert, ohne dass die zellulären Cholesterin- oder PL-Akkumulationen beeinflusst werden. Brown et al. führen diesen Effekt auf die Stimulation der Lipolyse durch CGI-58 zurück, da die TG-Synthese unbeeinflusst blieb. Dies lässt daher auf eine Verbindung von lipolytischem LD-Abbau mit der Produktion TG-reicher Lipoproteine schließen, in der CGI-58 eine wichtige Rolle spielt. [57]

1.1.5.5 Chanarin-Dorfman Syndrom

Mutationen im *CGI-58* Gen resultieren in der Ausbildung des CDS, einer nicht-lysosomalen, multisystemischen, autosomal rezessiv vererbaren Erkrankung, die besonders durch angeborene Ichtyose und ektopische Lipidakkumulationen in zytosolischen LDs verschiedener

Organe, wie u.a. Haut, Muskel, Leber, Zentralnervensystem (ZNS), intestinaler Mukosa und Leukozyten im Blut (Jordan's Anomalie), gekennzeichnet ist. CDS wird auch als Neutrallipidspeicherkrankheit (Neutral Lipid Storage Disease, NLSD) mit Ichtyose (NLSDI) bezeichnet, die von der durch *ATGL*-Mutationen verursachten NLSD mit einhergehender Myopathie (NLSDM) zu unterscheiden ist. (reviewed in [47, 48]) Die bei CDS zu beobachtende Ichtyose, einer Permeabilitätsstörung der Hautbarriere, wird als nicht-vesikuläre angeborene ichthyosiforme

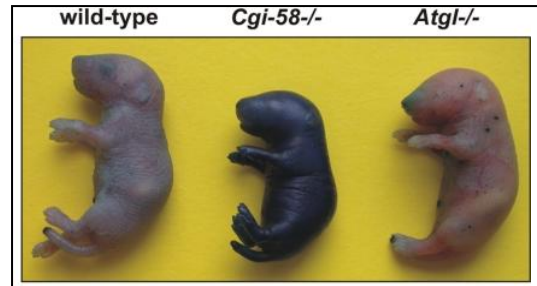


Abb. 7: Störung der epidermalen Permeabilitätschranke bei CGI-58 KO Mäusen.

Je eine WT, eine CGI-58 KO und eine whole-body ATGL-KO Maus wurden für 4 h in eine Färbelösung (Toluidinblau) getaucht und mit PBS gewaschen. Die CGI-58 KO Mäuse zeigen deutlich eine Störung der Hautpermeabilität. [60] Unverändert übernommen.

Erythrodermie (non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma, NCIE) typisiert. Aufgrund dieser Symptomatik sterben CGI-58 KO Mäuse bereits wenige Stunden nach der Geburt (Abb.7). [58] (reviewed in [59]) Der Defekt der Hautbarriere ist ein ATGL-unabhängiger Effekt von CGI-58 und steht in Verbindung mit einer beeinträchtigten Hydrolyse epidermaler TGs. Infolgedessen wird durch verhinderte Absonderung von FS in TGs die Acylceramid-Synthese verhindert. Acylceramide dienen als essentielle Lipidvorstufen, die für die Ausbildung einer funktionellen Hautbarriere nötig sind. [60]

Andere Symptome des CDS sind beispielsweise Hepatosteatose, Hepatomegalie, Myopathie, Ataxie, neurosensorologischer Hörverlust, Nystagmus, sowie neurologische Anomalitäten (mentale Retardierung, psychische Störungen, Mikrozephalus) durch TG-Akkumulationen im ZNS. (reviewed in [59, 61])

1.2 ER-Stress

ER-Stress und die folgende Aktivierung der unfolded protein response (UPR) spielen eine entscheidende Rolle im Lipidmetabolismus bzw. der Lipidhomöostase. Umgekehrt können auch Veränderungen im Lipidmetabolismus, insbesondere ein Überschuss an freien FS, zur Induktion von ER-Stress führen.

1.2.1 Unfolded Protein Response (UPR)

Da im ER die Translation sekretorischer Proteine stattfindet, hat sich im Laufe der Evolution ein sehr empfindlicher Mechanismus entwickelt, der Zellen erlaubt, sich an die verschiedenen Gegebenheiten der Protein-Translation anzupassen. Dieser Mechanismus nennt sich UPR. ER-Stress, der durch falsch- oder nicht gefaltete Proteine hervorgerufen wird, löst die UPR aus, die durch drei proximale Effektoren reguliert wird: Die proximalen "Sensoren" für ER-Stress sind das Chaperon Immunglobulin-bindendes Protein/ Glukose-reguliertes Protein (BiP/Grp78) zusammen mit PKR-like eIF2 α kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) und inositol requiring enzyme 1 (IRE1) und ihren jeweiligen stromabwärts lokalisierten transkriptionellen Effektoren ATF4, ATF6c und X-box binding protein 1 spliced (XBP1s). Die Aktivierung dieser drei Wege führt zu einer Expansion der ER-Kapazität für die Proteinfaltung, um das ER-Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Die Aktivierung der UPR führt zu einem temporären Stillstand der Translation (via eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α), sowie der RNA-Degradierung (via IRE1) und der Transaktivierung von Genen, die an der Protein-Qualitätskontrolle, -Faltung und -Sekretion beteiligt sind. Wenn all diese Mechanismen fehlen, führt ein nicht beseitigter ER-Stress zu Apoptose der betroffenen Zellen. [62] (reviewed in [63])

1.2.2 ER-Stress Marker

1.2.2.1 BiP/Grp78

BiP/GRP78 zählt zur hsp70-Familie und ist ein luminales Stress-Protein des ERs, das mit Zwischenprodukten der Proteinfaltung interagiert. BiP spielt dabei eine wichtige Rolle in der Faltung und Qualitätskontrolle entstehender Proteine, wobei die Interaktion mit Co-Faktoren, wie ER-DnaJ-like Proteinen (ERdj), ausschlaggebend ist. ERdj-Proteine stimulieren die ATPase-Aktivität von BiP/Grp78 und stabilisieren dessen Bindung an Substrate. [62]

IRE1 und PERK sind transmembrane Typ-I Proteinkinasen, die im ER lokalisiert sind. Sie dienen der Transduktion von ER-Stress-Signalen, die durch Störungen in der Proteinfaltung entstehen. Um auf den ER-Stress zu reagieren, müssen PERK bzw. IRE1 ein luminales Signal durch die ER-Membran zur zytosolischen Kinase-Domäne leiten (Abb.8). PERK reagiert nicht auf einen Anstieg falsch- oder ungefalteter Proteine innerhalb des ERs, sondern auf Veränderungen des Verhältnisses zwischen falsch- bzw. ungefalteten Proteinen und ER-Chaperonen. Unter normalen Bedingungen ist BiP/Grp78 an die monomeren, inaktiven Formen der drei Mediatorproteine (PERK, ATF6 und IRE1) gebunden und wird unter Stressbedingungen ins ER-Lumen rekrutiert. Es folgt die Ausbildung hochmolekularer Komplexe aktivierter PERK bzw. IRE1 sowie die Aktivierung derer zytosolischer Kinase-Domänen durch Autophosphorylierung. Eine Überexpression von BiP mindert deren Aktivierung und unterdrückt indes die UPR. [65, 66] (reviewed in [67])

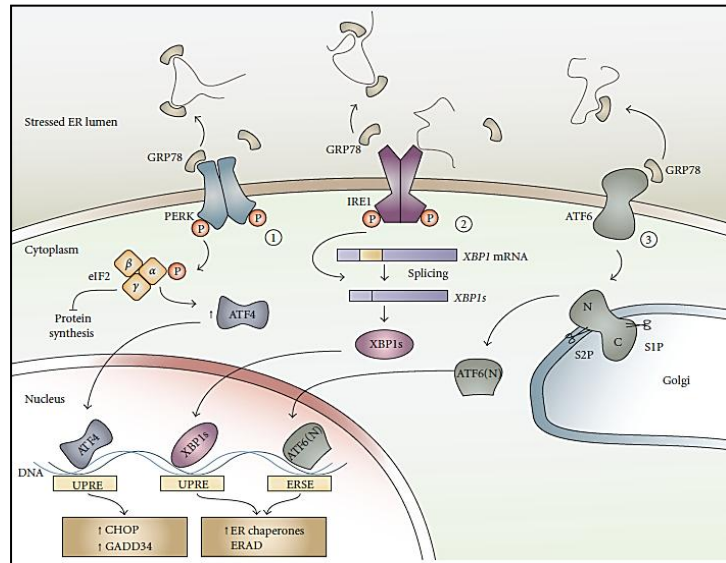


Abb. 8: Detailliertes Schema der UPR-Aktivierung.

Drei proximale Sensoren regulieren die UPR unter ER-Stress Bedingungen. Durch Homodimerisierung und Autophosphorylierung aktivieren PERK und IRE1 ihre stromabwärts gelegenen Zielgene, die schließlich in einer Aktivierung der UPR resultieren. ATF6 wird im Golgi durch Proteasen gespalten und bindet als N-terminales Fragment ATF6c (ATF6cleaved) an ER-stress response elements im Nucleus. [64] Unverändert übernommen.

1.2.2.2 PERK/ATF4-Signalweg

Ein wichtiges Zielgen dieses Wegs ist der proapoptotische Transkriptionsfaktor C/EBP homologes Protein (CHOP), sowie die Phosphorylierung von PERK und eIF2 α als Indikator für die UPR-Aktivierung. Eine durch ER-Stress ausgelöste Homodimerisierung von PERK mit anschließender Autophosphorylierung führt in weiterer Folge auch zu einer Phosphorylierung von eIF2 α . Dadurch kommt es zur Aktivierung und Translokation von ATF4 in den Nucleus, wo ATF4 an die UPR response elements (UPRE) bindet und dadurch Zielgene wie beispielsweise CHOP und GADD34 aktiviert. GADD34 gilt als negativer Regulator des PERK-Pathways, indem er

eIF2 α dephosphoryliert. Das Gen, das für das CHOP codiert, auch bekannt als Wachstumsstillstand- und DNA-Schäden induzierendes Gen 153 (growth arrest and DNA-damage inducible gene, *GADD153*), löst bei persistierendem ER-Stress Apoptose aus. [68, 69] (reviewed in [67])

1.2.2.3 IRE1/XBP1-Signalweg

Die Aktivierung von IRE1 erfolgt ähnlich der von PERK durch Homodimerisierung und Autophosphorylierung. Eine Interaktion von un- oder falsch gefalteten Proteinen mit der luminalen Domäne von IRE1 kann die IRE1-Expression zusätzlich fördern. [70–72]

In diesem Signalweg besonders von Interesse sind *ERdj4* und *Xbp1*. Das ERdj4 Protein ist ein lösliches luminales ER-Protein, das von der UPR bei ER-Stress durch den IRE1/XBP1-Signalweg rekrutiert wird. Wie bereits erwähnt stellt ERdj4 einen wichtigen Cofaktor für das ER-Chaperon BiP/Grp78 dar. ERdj4 assistiert BiP/Grp78 bei der Vernichtung falsch gefalteter sekretorischer Proteine, wobei die Mechanismen, wie falsch- bzw. ungefaltete Proteine durch ERdj4 erkannt werden, unbekannt sind. Die Expression von *ERdj4* ist während des ER-Stresses hochreguliert, da das Protein eine wichtige Rolle in der ER-assoziierten Degradierung (ERAD) ungefaltener sekretorischer Proteine spielt. [62]

Xbp1 gilt als wichtiges Substrat von IRE1. Aus der *Xbp1* mRNA wird durch die Endoribonukleaseaktivität von IRE1 ein 26 Nukleotid langes Fragment ausgeschnitten, was zu einer Verschiebung des Leserahmens des translatierten Proteins zu XBP1s führt. Nur diese Proteinform trägt nun an ihrem C-Terminus die Transaktivierungsdomäne, um weitere Gene der UPR zu aktivieren. Dieser Splicingvorgang kann via PCR und nachfolgender Agarosegelelektrophorese untersucht werden. (reviewed in [63])

1.2.2.4 ATF6/ATF6c-Signalweg

Als Reaktion auf ER-Stress wird ATF6 aktiviert und transloziert in den Golgi-Apparat. Dort wird das Protein durch Proteasen sequenziell geschnitten, wodurch das N-terminale ATF6-Fragment (ATF6c) freigesetzt wird und in den Nukleus transloziert. Dort bindet ATF6c an ER-stress response elements (ERSE) und aktiviert dadurch Zielgene der UPR. [73]

1.2.3 Pharmakologische Induktoren für ER-Stress

1.2.3.1 Tunicamycin

Tunicamycin (TM) ist eine Mischung von homologen Antibiotika, die aus Uracil, N-Acetylglucosamin (GlcNAc), einer C-terminalen Aminodialdose (Tunicamin) und einer FS, gebunden an die Aminogruppe, besteht. TM inhibiert die durch GlcNAc-Phosphotransferase (GPT) katalysierte N-Glykosylierung in Eukaryoten durch Blockierung des Transfers von GlcNAc-1-Phosphat von UDP-GlcNAc auf Dolichyl-monophosphat. Dadurch wird die Synthese aller N-Glykane verhindert und es kommt zu einer Aktivierung der UPR durch ER-Stress. Andere Reaktionen, an denen die GPT beteiligt ist, werden nicht inhibiert, einige von ihnen sind allerdings sensitiv für TM. Die benötigte TM-Dosis, die zur Inhibierung der Glykosylierung nötig ist, variiert in den verschiedenen Zelltypen von 0,1 – 10 µg/ml, was auf eine unterschiedliche Aufnahme bzw. unterschiedliche Expressionslevel der GPT zurückzuführen ist. [74]

1.2.3.2 Thapsigargin

Eines der zentralen Themen der Signalweiterleitung in Zellen ist eine durch spezielle Agonisten medierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Die Signaltransduktion bedarf hier einer aktiven Ca^{2+} -Absonderung, die durch die sogenannten sarkoendoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) erreicht wird. Thapsigargin gehört zur Familie der natürlich vorkommenden 6,12-Guaianolide, kann aufgrund seiner hohen Lipidlöslichkeit biologische Membranen gut durchdringen und wirkt in der Zelle als SERCA-Inhibitor. Die daraus resultierende Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von Thapsigargin führt zu einer Störung der Ca^{2+} -Homöostase im ER, die einer Akkumulation nicht- oder falsch gefalteter Proteine im ER-Lumen nach sich zieht und die UPR auslöst. [75, 76] (reviewed in [77])

1.2.4 Physiologischer Induktor für ER-Stress: hohe Fett- und Cholesterinkonzentrationen in der Nahrung (HF/HC-Diät)

Neben TM und Thapsigargin gilt auch eine hochkalorische Ernährung als Induktor für ER-Stress. Fettleibigkeit geht mit einer leichten chronischen Entzündungsreaktion einher, wobei diese inflammatorischen Signale mit der Wirkung von Insulin interferieren und somit das metabolische Gleichgewicht stören. Dieser negative Einfluss der Entzündungssignale auf die

Insulinwirkung entsteht durch posttranslationelle Modifikation (Serin-Phosphorylierung) von Substratmolekülen des Insulinrezeptors. Eine Störung des metabolischen Gleichgewichts führt zu ER-Stress v.a. in insulinsensitiven Geweben wie WAT und Leber, der schließlich in einer Aktivierung der c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) resultiert. JNK stellt einen zentralen Mediator der Insulinresistenz dar, dessen Aktivierung zu Insulinresistenz und Typ-2 Diabetes führt. Somit trägt ein durch Fettleibigkeit induzierter ER-Stress zu den oben genannten Folgeerkrankungen der Adipositas bei. (reviewed in [78, 79]) Dieser Effekt konnte sowohl bei genetischer (*ob/ob*-Mäuse) als auch ernährungsbedingter (HF/HCD) Fettleibigkeit beobachtet werden. [80]

1.2.5 ER-Stress und Lipidmetabolismus

ER-Stress und die folgende Aktivierung der UPR spielen eine entscheidende Rolle im Lipidmetabolismus bzw. der Lipidhomöostase (Abb.9). Die meisten Studien über deren Zusammenhang fokussieren sich auf den hepatischen Lipidmetabolismus. So konnte bisher u.a. gezeigt werden, dass der IRE1/Xbp1-Signalweg der UPR durch Kohlenhydrate in der Nahrung aktiviert wird und die Expression von Genen, die in der FS- und Cholesterinbiosynthese involviert sind, kontrolliert. Für die Expression lipogener Gene und darauffolgender Pathogenese einer Hepatosteatose sind die PERK-medierte Phosphorylierung von eIF2 α und die dadurch ausgelöste Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (insbesondere von C/EBP und PPAR γ) von Bedeutung. (reviewed in [82])

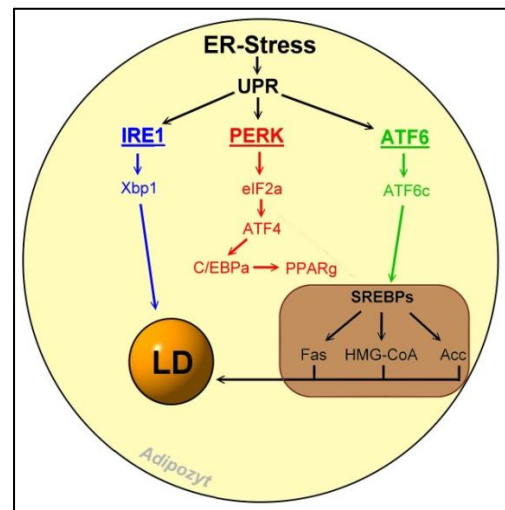


Abb. 9: Möglicher Zusammenhang von ER-Stress und Lipidmetabolismus.

Wie genau die drei UPR-Sensoren IRE1, PERK und ATF6 die Homöostase des Lipidmetabolismus beeinflussen, ist zum jetzigen Stand noch nicht ausreichend erforscht. Das dargestellte Schema ist daher nur ein Modell der Interaktionen zwischen ER-assoziierten Signalwegen und der Ausbildung von LDs im WAT. [81] **Verändert übernommen.**

1.2.5.1 ER-Stress im intestinalen Lipidmetabolismus

Das intestinale Epithel, das als sekretorisches Organ gilt, besteht aus vier epithelialen Zelltypen, die sich alle aus einer gemeinsamen intestinalen epithelialen Stammzelle differenzieren: Paneth-Zellen, Becherzellen, Enterozyten und enteroendokrine Zellen. Besonders die Paneth-Zellen, die sich am Grund der Krypten befinden, sekretieren reichliche Mengen an antimikrobiellen Peptiden und spielen somit eine wichtige Rolle in der Regulation der mikrobiellen Darmflora, sowie der Widerstandsfähigkeit gegen intestinale Pathogene. Becherzellen hingegen produzieren große Mengen an Mucinen, die die Basis der intestinalen Schleimhaut (Mukosa) bilden. Auch das resorbierende Epithel selbst besitzt eine Sekretionsfunktion. Da das intestinale Epithel eine sekretorische Funktion besitzt, ist es sehr empfindlich für Störungen in der UPR, wie genetische Studien belegen konnten. (reviewed in [63])

Ungelöster ER-Stress, hervorgerufen zB. durch genetische Deletionen von UPR-assoziierten Faktoren wie Xbp1, die in der Auflösung von ER-Stress involviert sind, resultieren in spontaner intestinaler Entzündung – ähnlich der humanen chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED). Außerdem gelten einige UPR-assoziierte Gene wie Xbp1, anterior gradient 2 (Agr2) und ORM1-like 3 (ORMDL3) als genetische Risikofaktoren für humane CEDs wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. (reviewed in [83]) Ungelöster ER-Stress führt zu einer mehrschichtigen regenerativen Reaktion im intestinalen Epithelium, einhergehend mit einer Expansion der intestinalen Stammzellen, die durch IRE1 α mediiert wird. Dies ist mit einer IRE1 α abhängigen Entstehung von Tumoren des intestinalen Epithels assoziiert, wobei Xbp1 eine Rolle in der Unterdrückung dieser Tumorbildung spielt, indem es die regenerative Reaktion des intestinalen Epithels auf ER-Stress unterdrückt. Daher spielt Xbp1 nicht nur eine Rolle in der lokalen Entzündungsregulation, sondern bestimmt gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit, epitheliale Tumore auszubilden. [84]

Neben der Rolle der UPR in der CED fanden Lu et al. auch einen Zusammenhang von ER-Stress mit der nekrotisierenden Enterocolitis (NEC), einer häufigen gastrointestinalen Komplikation bei Frühgeburten, charakterisiert durch Entzündung und Nekrose besonders im Ileum des Dünndarms. [85]

1.2.5.2 ER-Stress im hepatischen Lipidmetabolismus

Lee et al. konnten anhand von humanen Hepatozyten zeigen, dass eine künstliche Induktion von ER-Stress mittels den pharmakologischen Induktoren TM und Thapsigargin zu einer gesteigerten hepatischen Lipogenese und LD-Bildung führt. Den Zusammenhang zwischen ER-Stress und hepatischem Lipidmetabolismus bilden die für lipogene Transaktivatorproteine codierenden Gene C/EBP α , PPAR γ 2, PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α) und liver X receptor α (LXR α). Alle diese untersuchten Marker gelten als ER-Stress induzierbare Zielgene in der trans-Aktivierung der *de novo* Lipogenese und zeigten nach TM bzw. Thapsigargin-Behandlung in verschiedenen Dosen eine signifikant erhöhte Expression. [75]

Fuchs et al. konnten einen weiteren Zusammenhang zwischen Lipidmetabolismus und pharmakologisch induziertem ER-Stress in ATGL-KO Mäusen zeigen. TM-Behandlung induzierte interessanterweise ER-Stress nur in den WT Mäusen, während bei ATGL-Defizienz keine Erhöhung der ER-Stress Marker BiP, CHOP, ERdj4 und Xbp1 auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnte. Dies indiziert einen protektiven Effekt von ATGL-Defizienz auf künstlich induzierten ER-Stress. Fuchs et al. führen diesen schützenden Einfluss auf eine Veränderung im FS-Muster zurück: Während gesättigte FS wie Palmitate (palmitic acid, PA) und Stearate als ER-Stress Induktoren bekannt sind [86, 87], so gelten einfach-ungesättigte FS wie Oleate (oleic acid, OA) als Protektoren vor ER-Stress. WT Mäuse zeigten eine höhere PA/OA-Ratio als die ATGL-KO Tiere, was auf eine bevorzugte Inkorporation von OA in TGs der ATGL-KO Mäuse hinweist, während in den WT Tieren hauptsächlich PAs in TGs eingebaut werden. [86]

2 Hypothese und Ziele

Die Enterozyten des Duodenums und proximalen Jejunums spielen eine essentielle Rolle in der Resorption von Nahrungslipiden. Intrazellulär finden sich in den Enterozyten zwei unterschiedliche, voneinander unabhängige TG-Pools: Zu Beginn werden die Hydrolyseprodukte aus der Nahrung am ER wieder zu TGs resynthetisiert, die entweder in CMs verpackt werden oder in Form von LDs als transiente Lipidspeicher im Zytosol fungieren. Die Hypothese hinter dieser Arbeit ist, dass CGI-58 als Coaktivator der ATGL und somit Mediator des initialen Schritts der neutralen Lipolyse durch Aktivierung der an der LD Oberfläche lokalisierten ATGL die Größe der zytosolischen LDs kontrolliert, sowie Lipidabsorption und Lipidmetabolismus beeinflusst. Für die vorliegende Arbeit wurden daher darmspezifische CGI-58 KO Mäuse generiert, um den Einfluss von intestinalem CGI-58 auf Lipidabsorption, Plasmalipidkonzentrationen und Plasmalipoproteine, sowie Lipidakkumulationen zu untersuchen.

Da das ER durch seine Rolle in der Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase in bidirektionaler Beziehung mit dem Fettstoffwechsel steht, liegt ein weiterer Fokus dieser Arbeit in der Untersuchung der Auswirkungen von künstlich induziertem ER-Stress auf den intestinalen Lipidmetabolismus. Wir vermuten, dass während freie FS bzw. Anomalien im Fettstoffwechsel ER-Stress induzieren können, auch die Aktivierung ER-Stress-assoziiierter Signalwege durch pharmakologische Induktoren wie TM zu Veränderungen der Lipidhomöostase bzw. zu gesteigerter Lipogenese führen könnte.

Um die Auswirkungen eines künstlich induzierten ER-Stresses auf den intestinalen Lipidstoffwechsel zu untersuchen, wurde WT Mäusen intraperitoneal eine TM-Suspension injiziert und Einflüsse auf die intestinale Lipidabsorption, hepatische und intestinale TG-, sowie Cholesterinakkumulation und Plasmalipidgehalten untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

3.1.1 Lysis-Puffer

0,1 M KH_2PO_4 pH 7.0 (Roth, Deutschland)

0,25 M Sucrose (Roth, Deutschland)

1 mM EDTA (UltraPure™, Life Technologies, USA)

Auf 200 ml mit dH_2O auffüllen

3.1.2 SDS-Gel

Trenngel-Puffer:

4 ml 10 % SDS (Serva Electrophoresis, Deutschland)

18,2 g Tris (Roth, Deutschland)

80 ml dH_2O

pH 8,8 mit HCl

auf 100 ml mit dH_2O auffüllen

Sammelgel-Puffer:

6 g Tris (Roth, Deutschland)

90 ml dH_2O

→ pH 6,8 mit HCl

auf 100 ml mit dH_2O auffüllen

Acrylamid:Bisacrylamid:

30 g Acrylamid (Applichem, USA)

0,8 g Bisacrylamid (Applichem, USA)

auf 100 ml mit dH_2O auffüllen

Trenngel (15%):

4,3 ml Acrylamid:Bisacrylamid (Applichem, USA)

2,17 ml Trenngel-Puffer

2,13 ml dH₂O

4,4 µl Temed (Sigma-Aldrich, USA)

76 µl APS (10%) (Sigma-Aldrich, USA)

Sammelgel:

250 µl Acrylamid:Bisacrylamid (Applichem, USA)

385 µl Sammelgel-Puffer

885 µl Glyzerin (50%) (Merck, Deutschland)

3,8 µl Temed (Sigma-Aldrich, USA)

38 µl APS (10%) (Sigma-Aldrich, USA)

2x SDS-Probenpuffer:

0,76 g Tris (Roth, Deutschland)

2,15 g SDS (Serva Electrophoresis, Deutschland)

auf 45ml mit dH₂O auffüllen

+ 10 ml Glyzerin (Merck, Deutschland)

→ pH 6,8 HCl

+ 3 mg Bromphenolblau (Merck, Deutschland)

3.1.3 Western-Blot10x Laufpuffer:

75,75 g Tris (Roth, Deutschland)

375 g Glyzin (Amresco, USA)

25 g SDS (Serva Electrophoresis, Deutschland)

auf 2500 ml mit dH₂O auffüllen

10x Blotting-Puffer:

31,5 g Tris (Roth, Deutschland)
75 g Glyzin (Amresco, USA)
auf 2500 ml mit dH₂O auffüllen

10x Waschpuffer:

12,5 g Tris (Roth, Deutschland)
225g NaCl (Roth, Deutschland)
250 ml 1 M Tris/HCl pH 7,4
auf 2500 ml mit dH₂O auffüllen

Stripping-Puffer für Stripping bei 60°C:

6 mM Tris/HCl pH 6,8
2% SDS (Serva Electrophoresis, Deutschland)
100 µl β-Mercaptoethanol zu 15 ml-Aliquot zugeben (

Stripping-Puffer für Stripping bei Raumtemperatur:

58,4 g NaCl (Roth, Deutschland)
7,5 g Glyzin (Amresco, USA)
Auf 1000 ml mit dH₂O auffüllen
→ pH 2,15 HCl

3.1.4 PCR3%-iges Agarosegel

6 g Universal-Agarose (peqGOLD, ?)
2,5 ml 40xTAE
200 ml H₂O
+ 20µl Ethidiumbromid (Merck, Deutschland)

3.1.5 Oil Red O Farbstoff

2,8 g Oil Red O (Sigma Aldrich, USA) in 400ml Propylenglykol lösen
Auf 100°C erwärmen und abfiltrieren

3.1.6 Absorptionsstudie

Substrat / 200 μ l / Maus:

0,5 μ Ci 14 C-Cholesterin [0,1 μ Ci/ μ l] (Perkin Elmer, USA)

2 μ Ci 3 H-Trioleat [5 μ Ci/10 μ l] (Perkin Elmer, USA)

→ unter N_2 abdampfen

+ 4 ml Maiskeimöl (inkl. 10 mg/10 ml freies Cholesterin entspricht 200 μ g / Maus)

→ 15 Min. im Ultraschallbad lösen

3.1.7 weitere Chemikalien

Chlorophorm (Sigma-Aldrich, USA)

DEPC (Roth, Deutschland)

0,5 mM EDTA (UltraPureTM, Life Technologies, USA)

Ethanol (Roth, Deutschland)

Isopropanol (Roth, Deutschland)

Methanol (Roth, Deutschland)

4%-iges Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)

Triton-X100 (Merck, Deutschland)

Tunicamycin (Enzo Life Sciences, USA)

Tyloxapol (Sigma-Aldrich, USA)

Skim-Milk Powder (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Mausexperimente

Via Rekombinations- und Klonierungs-Techniken erfolgte eine Insertion von LoxP und somit eine Flankierung des *Cgi-58* Gens, die erfolgreiche Insertion wurde mithilfe einer PCR identifiziert. Um einen darmspezifischen KO von CGI-58 zu erreichen, wurden *Cgi-58-flox* Mäuse (erhalten von G.Haemmerle, Universität Graz) mit transgenen Mäusen mit *Cre*-Gen (cyclization recombination) und vorgeschaltetem darmspezifischen epithelialen Villin-Promotor gezüchtet, wodurch die *Cre*-Rekombinase nur im Darm exprimiert wird. Durch nachfolgende *Cre*-medierte Rekombination des *Cgi-58-flox* Allels wurden die entsprechenden Exons deletiert und somit die Expression eines funktionstüchtigen CGI-58-Proteins verhindert (*Abb.10*). $CGI-58^{flox/flox}/Villin-Cre$ Mäuse wurden dazu mit $CGI-58^{flox/flox}$ Mäusen gekreuzt, um die zwei Versuchsgruppen für die nachfolgenden Experimente zu erhalten: $CGI-58^{flox/flox}/Villin-Cre$ (CGI-58 iKO) und $CGI-58^{flox/flox}$ (Kontrollen/WT). Genetischer Hintergrund der Mäuse war C57BL/6.

Die Tierversuche wurden gemäß den Standards des Bundesministeriums für Wissenschaft und Forschung, Abteilung für Gentechnik und Tierexperimente (Wien, Austria) durchgeführt. WT und CGI-58 iKO Mäuse hatten freien Zugang zu Futter (regular chow diet, RCD; Ssniff®, Deutschland bzw. high-fat/high-cholesterol diet, HF/HCD; Ssniff®, Deutschland [34% Rohfett + 1% Cholesterin]) und Wasser in einem temperaturkontrollierten Umfeld mit regulärem 12h-Tag/Nacht-Zyklus.

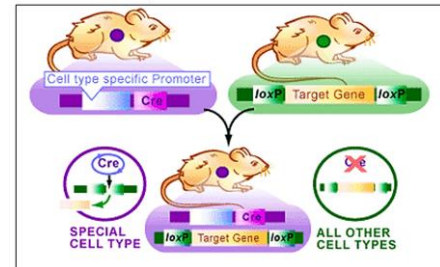


Abb. 10: Zucht einer Cre/lox Maus.

Mäuse mit *Cre*-Protein und vorgeschaltetem gewebsspezifischen Promotor werden mit einer Mauslinie, die ein von *loxP* flankiertes Zielgen trägt, gekreuzt. In den Nachkommen ist in jenen Zellen, in denen die *Cre*-Rekombinase exprimiert wird, das Zielgen ausgeschaltet. [88] **unverändert übernommen.**

3.2.1.2 Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgte am retrobulbären Plexus der Versuchsmäuse. Die Eppendorf-Gefäße wurden dafür mit 3 µl 0,5 mM EDTA als Antikoagulans vorbereitet. Nach einem Zentrifugationsschritt (7 Min., 7.000 rpm) wurde das Plasma für die Bestimmung von TGs, freiem Glycerin (FG), totalem Cholesterin (TC), freiem Cholesterin (FC) und FFS in frische Eppendorf-Gefäße überführt.

3.2.1.3 Gewebsentnahme

Die Versuchstiere wurden via zervikaler Dislokation getötet. Für dieses Projekt von Interesse waren der Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum), die Leber, sowie evt. Niere, Herz und WAT als Kontrollorgane. Aus diesen Geweben erfolgte eine Proteinbestimmung und Lipidextraktion, sowie RNA-Extraktion mit peqGOLD TriFast™ (Peqlab, Deutschland). Die Darmabschnitte wurden dazu aufgeschnitten, in PBS (+ Proteaseinhibitorcocktail 1:2000, PIC) gewaschen und für die Proteinbestimmung die intestinale Mukosa abgeschabt, während von der Leber immer der große Leberlappen verwendet wurde. Für die RNA-Extraktion wurde aufgrund verminderter RNase-Vorkommen immer der vordere Teil von Duodenum und Jejunum (keine Scrapings!) gewählt, während der hintere Teil zur Protein- und Lipidextraktion herangezogen wurde. Für die RNA-Extraktion des Ileums wurde der distale Teil herangezogen, da somit – nach Bedarf – auch Gallensäuretransporter untersucht werden können. Das proximale Jejunum wurde für die Protein- und Lipidbestimmung verwendet. Zur histologischen Untersuchung des Intestinums wurden jeweils zwei Stücke am Übergang von Duodenum zu Jejunum entnommen und in 4%-igem Formalin bis zur Weiterverarbeitung fixiert.

3.2.2 Plasmaparameter

3.2.2.1 Triglyzeride

Zur Analyse der TGs im Plasma wurde der Testkit Triglycerides FS (DiaSys, Diagnostic Systems, Deutschland) verwendet. Jeweils 5 μ l der Proben und des Triglyzerid-Standards wurden als Duplicate in eine 96-Well Platte vorgelegt, mit 250 μ l Reagenz vermischt und nach 15-minütiger Inkubation am Schüttler bei 492nm vermessen. Die Standardkonzentration beträgt 200mg/dl. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf einem colorimetrischen enzymatischen Test mit Glycerin-3-Phosphatoxidase (GPO). Als Farbstoff dient Quinoneimine, der bei 492nm vermessen wird (Abb.11). [89]

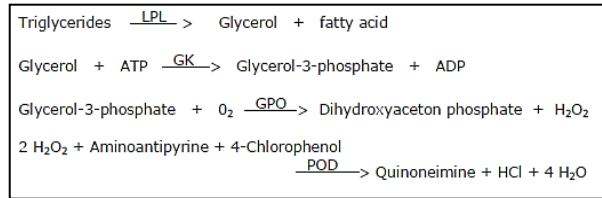


Abb. 11: Enzymatische Triglyzerid-Bestimmung aus Plasma. TGs werden durch die Lipoproteinlipase (LPL) in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Das durch die Glycerinkinase (GK) entstandene Glycerin-3-phosphat wird mithilfe der Glycerin-3-phosphatoxidase (GPO) in Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert. In der abschließenden Trinder-Reaktion entsteht der bei 492 nm detektierbare Farbstoff Quinoneimine [89].

3.2.2.2 Freies Glycerin

Um die Konzentration an freiem Glycerin im Plasma zu bestimmen, wurde das Free Glycerol Reagent (Sigma Aldrich, USA) verwendet. Dazu wurden je 5 μ l der Proben bzw. des Triglyzerid-Standards (Glycerin-Konzentration = 20,7 mg/dl) als Doppelbestimmung mit 200 μ l des Reagenzes vermischt und nach einer 15-minütigen Inkubation bei 544 nm vermessen. Die meisten TG-Reagenzien unterscheiden nicht zwischen endogenem Glycerin und durch hydrolytische Spaltung aus TG entstandenem Glycerin. Durch die verwendete Methode wird unter Verwendung der gleichen gekoppelten Enzymreaktionen wie bei TG-Bestimmung, allerdings ohne der initialen Lipase-Hydrolyse, nur freies endogenes Glycerin vermessen (Abb.12). [90] Zur Ermittlung des tatsächlichen TG-Gehalts werden anschließend die FG-Gehalte von den vermessenen TG-

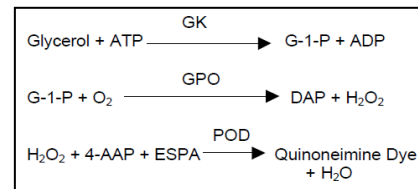


Abb. 12: Bestimmung von freiem Glycerin im Plasma.

Glycerin wird mit ATP via GK zu Glycerin-1-Phosphat phosphoryliert und anschließend durch die GPO zu Dihydroxyacetonphosphat + H₂O₂ oxidiert. Abschließend bildet sich durch Kopplung von H₂O₂ mit 4-Aminoantipyrin (4-AAP) und Natrium-N-ethyl-N-(3-Sulfopropyl)-m-anisidine (ESPA) der Quinoneimine Farbstoff, dessen Absorption bei 544 nm vermessen wird. [90]

Gehalten subtrahiert. Zu beachten ist jedoch, dass durch die verwendete Methode der TG-Bestimmung auch DGs und MGs mitvermessen werden!

3.2.2.3 Totales Cholesterin

Zur Analyse des Gesamt-Cholesterins im Plasma wurde der Testkit Cholesterol FS (DiaSys, Diagnostic Systems, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte analog der TG-Bestimmung. Das Prinzip ist ein enzymatischer photometrischer Test basierend auf der CHOD-PAP Methode. Dabei dient Quinoneimine als Farbindikator, der in der Trinder-Reaktion aus 4-aminoantipyrin, Phenol und H_2O_2 durch katalytisches Einwirken der Peroxidase entsteht (Abb.13). [91]

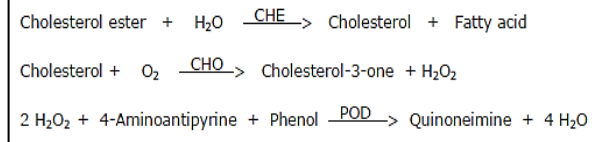


Abb. 13: Enzymatische Reaktion zur Bestimmung von Cholesterin im Plasma.

Cholesterin-Esterase (CHE) hydrolysiert Cholesterinester in Cholesterin und Fettsäuren. Das entstandene Cholesterin wird durch die Cholesterin-Oxidase (CHO) zu Cholesterin-3-one und H_2O_2 oxidiert. In der abschließenden Trinder-Reaktion entsteht der Farbstoff Quinoneimine, der bei 492 nm photometrisch vermessen wird [91]

3.2.2.4 Freies Cholesterin

Zur Analyse des freien Cholesterins im Plasma wurde der Testkit Free Cholesterol FS (DiaSys, Diagnostic Systems, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte analog der TG- bzw. Total-Cholesterin-Bestimmung. Das zugrundeliegende photometrische Prinzip ist ident zu der enzymatischen Reaktion für die Bestimmung von TC (Abb.14). [92]

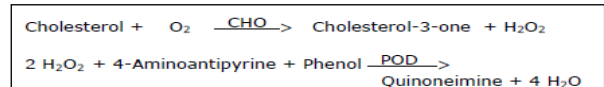


Abb. 14: Enzymatische Reaktion zur Bestimmung von freiem Cholesterin im Plasma.

Cholesterin wird durch die Cholesterin-Oxidase (CHO) zu Cholesterin-3-one und H_2O_2 oxidiert und in der abschließenden Trinder-Reaktion entsteht der Farbstoff Quinoneimine, der bei 492 nm photometrisch vermessen wird [92].

Um den Gehalt an Cholesterinestern im Plasma zu erhalten, werden die vermessenen FC-Gehalte von den vermessenen TC-Gehalten subtrahiert.

3.2.2.5 Freie Fettsäuren

Zur Analyse der FFS im Plasma wurde der Testkit NEFA-HR(2) (Wako Chemicals, Deutschland) verwendet. Dazu wurden je 5 µl der Proben und des Standards (Konzentration = 1 mM/l) als Duplicate mit 180 µl R1a vermischt und 15 Min. unter Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 90 µl R2a wurde wiederholt 15 Min. inkubiert und der entstandene blauviolette Farbkomplex anschließend bei 544 nm vermessen (Abb.15). [93]

3.2.2.6 Auswertung

Die Auswertung erfolgte in allen drei Versuchen über einen mitgeführten Standard mithilfe der unten angegebenen Formeln.

Freie Fettsäuren werden in mM/l angegeben, der Umrechnungsfaktor für NEFA beträgt mg/dl = mM/l x 28,2 bezogen auf Oleinsäure (Molekulargewicht 282 g/mol). TGs, TC und FC

werden in mg/dl angegeben, wobei der Umrechnungsfaktor für TGs mM/l = mg/dl x 0,01126 beträgt, jener für TC mM/l = mg/dl x 0,02586 und der für FC mM/l = mg/dl x 0,02586. [89–93]

$$\text{Cholesterol bzw. Triglyceride [mg/dL]} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Standard}} \times \text{Conc. Standard [mg/dL]}$$

$$\text{Freie Fettsäuren [mmol/L]} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Standard}} \times \text{Conc. Standard [mmol/L]}$$

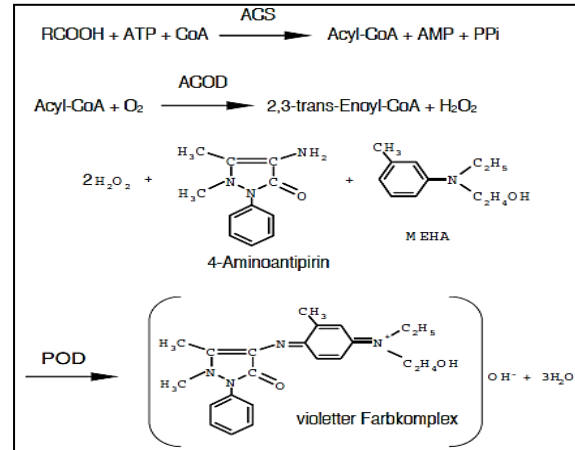


Abb. 15: Testprinzip zur Bestimmung freier FS aus Plasma.

Unveresterte Fettsäuren (NEFA) werden durch Acyl-CoA Synthetase (ACS) zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure (PPI) umgesetzt unter Mitwirkung von Coenzym A (CoA) und ATP. Es entsteht Acyl-CoA, das unter Einwirkung von Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und H₂O₂ umgewandelt wird. In Anwesenheit von Peroxidase (POD) wird unter Einwirkung von 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) und 4-Aminoantipyrin (4-AA) durch oxidative Kupplung ein blau-violetter Farbkomplex gebildet. Durch die Messung der Absorption der blau-violetten Farbe kann die NEFA-Konzentration bei 544 nm bestimmt werden. [93]

3.2.3 RNA Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mittels der optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode von Peqlab via peqGOLD TriFast™ (Peqlab, Deutschland) aus den entnommenen Gewebeproben. Für die Analyse wurden entsprechend viele RNA-Röhrchen (Mäuse x Gewebe), bestückt mit Homogenisierungs-Kügelchen und je 1 ml TriFast™-Reagenz, gerichtet. Die jeweiligen Gewebeproben wurden mit dem TriFast™-Reagenz vermischt und in flüssigem Stickstoff bzw. auf -80°C bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt.

Zur RNA-Extraktion wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, 2x20 Sec. im Precellys Homogenisator lysiert, 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von je 200 µl Chloroform durch Zentrifugation (8.500 rpm, 15 Min., 4°C) die Phasentrennung erreicht: eine obere wässrige Phase (enthält RNA), eine Interphase (enthält DNA), und eine untere organische Phenol-Chloroform-Phase (enthält DNA & Proteine). Mittels 500 µl Isopropanol wurde die RNA aus der wässrigen Phase nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und einem weiteren Zentrifugationsschritt (8.500 rpm, 10 Min., 4°C) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, dem Pellet 1 ml 75%-iger Ethanol zugegeben und erneut zentrifugiert (8.500 rpm, 5 Min., 4°C). Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet für etwa 10-30 Min. luftgetrocknet und aufgrund der Pelletgröße mit 1 ml DEPC-Wasser resuspendiert. Die Behandlung des Wassers mit Diethylpyrocarbonat (0,1% DEPC) verhindert eine Kontamination mit RNasen. [94]

Die Vermessung der RNA-Konzentrationen erfolgte am NanoDrop. Eine 260/280-Ratio von 1,6 – 2,0 ist für die RNA-Isolation erstrebenswert. Ist der Wert niedriger, so weist dies auf Verunreinigungen durch Proteine, Phenol oder anderer Substanzen hin, die bei ca. 280 nm absorbieren. Eine erniedrigte 260/230-Ratio (Richtwert 2,0 – 2,2) weist auf Verunreinigungen durch Substanzen, die bei 230 nm absorbieren, hin. [95] Vermessen und nachfolgend für die reverse Transkription eingesetzt wurde immer die 1:1 verdünnte RNA mit Ausnahme einiger Proben, da hier die Verdünnung teilweise Konzentrationen <200 ng/µl aufwies.

3.2.4 RNA-Gel

Zur Überprüfung der RNA-Qualität und zum Ausschluss möglicher degradierter RNA wurden stichprobenartig Proben auf RNA-Gele aufgetragen. Dazu wurden die fertigen RNA-Gele von Lonza (Flash Gel Cassette: 1.2% 12+1 Single Tier RNA; USA) verwendet, auf die, nach Vorladen von 10 µl DEPC-H₂O, je 2 µg RNA vermischt mit 5 µl Probenpuffer (2x RNA Loading Dye; NewEngland BioLabs Inc.; USA) aufgetragen wurden. Das Gel wurde anschließend für 5 Min. bei 275 Volt gelaufen und via Lonza Flash Gel Dock die aufgetrennten Banden visualisiert. Als Qualitätsmerkmal für intakte, nicht degradierte RNA gelten die 28S- und 18S-RNA Banden (Abb.16).

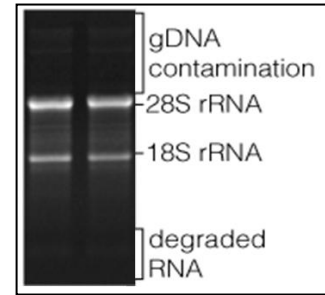


Abb. 16: RNA-Gel.

Als Qualitätskriterium gelten die 28S- und 18S-RNA Bande. [96]
Unverändert übernommen.

3.2.5 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA wurden 2 µg RNA für einen 10 µl-Ansatz eingesetzt, dem 10 µl des Mastermix zugegeben wurden. Dazu wurde aus der vermessenen RNA-Konzentration das passende Volumen errechnet. Für die RT-PCR wurde die cDNA anschließend noch 1:50 mit ddH₂O verdünnt. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung des Mastermixes, Abbildung 17 veranschaulicht das Temperaturprofil der cDNA-Synthese. Verwendet wurde der High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems.

Tabelle 3: Standard-Zusammensetzung des Mastermix für cDNA-Synthese. [97]

Volumen	Komponente
2 µl	10x RT-Buffer
0,8 µl	dTNP Mix
2 µl	10x Random Primer
1 µl	Rev. Transcriptase
0,7 µl	Rnase Inhibitor
3,5 µl	ddH ₂ O

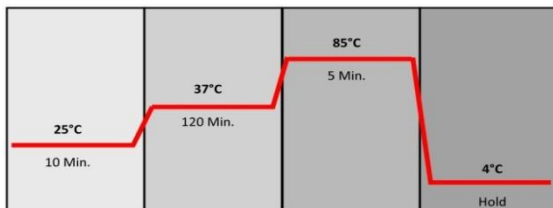


Abb. 17: Temperaturprofil cDNA-Synthese.

Nach 10 Min. bei 25°C (Anlagerung) erfolgt die eigentliche cDNA-Synthese bei 37°C für 120 Min.. Das Erhitzen auf 85°C führt zur Denaturierung.

3.2.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green, der spezifisch in dsDNA interkaliert, kann die Amplifikation während der RT-PCR in Echtzeit quantifiziert werden (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Schweiz).

Je 3 μl 1:50 verdünnte cDNA der zu untersuchenden Proben wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 7 μl des Mastermixes vermischt. Zur Analyse der Genexpression verschiedener Gene, die eine Rolle in der Lipogenese, Lipolyse, β -Oxidation, oxidativem Stress und ER-Stress spielen, sowie CyclophilinA als Referenzgen, wurden dem Mastermix neben dem fertigen SYBR-Green Mix (GoTaq[®] qPCR Mastermix, Promega, USA) die jeweiligen Primer zugegeben. Tabelle 4 zeigt die Komponenten und Volumina des Mastermixes [98], in Tabelle 5 wird das Temperaturprofil der RT-PCR visualisiert. Auf der folgenden Seite finden sich die Sequenzen der verwendeten Primer (Tabelle 6).

Die Auswertung erfolgte mittels Relative Expression Software Tool (REST[®]) unter Normalisierung der Daten auf das Referenzgen CyclophilinA. [99]

Tabelle 4: Standard-Zusammensetzung des Mastermix für Real-Time PCR.

Volumen	Komponente
5 μl	GoTaq [®] qPCR Mastermix
1 μl	Forward-Primer
1 μl	Reverse-Primer

Tabelle 5: Temperaturprofil der qRT-PCR.

Schritt	Zieltemperatur [°C]	Dauer
Denaturierung	95°C	5 Min.
Two-Step (40x)	95°C	10 Sek.
	60°C	30 Sek.
Schmelzkurve	95°C	10 Sek.
	60°C	20 Sek.
	95°C	20 Sek.
Cooldown	4°C	20 Sek.

Tabelle 6: Sequenzen verwendeter Primer.

PRIMERSEQUENZEN	
Abca1	Forward CTCTTCATGACTCTAGCCTGGA Reverse ACACAGACAGGAAGACGAACAC
Acc	Forward GGACTTGGAGCAGAGAACCTTCG Reverse CAAGCTGGTTGTTGGAGGTGTA
Acot1	Forward GGCTGGGAATGGAGTTTCAT Reverse GCTATCCAAGAAAAGTGCCAGG
Acot 2	Forward GCACGAGCGTCACTTCTTGG Reverse CCAGATACTCCAGAAGGCCAC
Acox1	Forward TCCAGACTTCCAACATGAGGA Reverse CTGGGCGTAGGTGCCAATTA
ApoA1	Forward AGCTGAACCTGAATCTCCTG Reverse CACTTCCTCTAGGTCCTTGT
Atgl	Forward GCCACTCACATCTACGGAGC Reverse GACAGCCACGGATGGTGTTT
BiP	Forward ACTTGGGGACCACCTATTCCT Reverse ATCGCCAATCAGACGCTCC
Cd36	Forward GCAGGTCTATCTACGCTGTG Reverse GGTTGTCTGGATTCTGGAGG
Cgi-58	Forward GGTTAAGTCTAGTGCAGC Reverse AAGCTGTCTCACCCTTG
Chop	Forward CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT Reverse CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT
Cpt1α	Forward CTCCGCCTGAGCCATGAAG Reverse CACCAGTGATGATGCCATTCT
Cyclophilin A	Forward CCATCCAGCCATTCAGTCTT Reverse TTCCAGGATTCATGTGCCAG
Dgat2	Forward AGTGGCAATGCTATCATCATCGT Reverse TCTTCTGGACCCATCGGCCCCAGGA
ERdj4	Forward CCCAGTGTCAAAGTGTACCAG Reverse AGCGTTTCCAATTTCCATAAATT
Fas	Forward AGAGGCCAGAAACACAGACTG Reverse AGTAGGAAGTGCTACAAGTTGGA
G0S2	Forward GTGAAGCTATACGTGCTGGG Reverse CCGTCTCAACTAGGCCGAG
Gstk1	Forward AAGCAGTTCTTCCAGGTTCC Reverse CCAGAATGCTCTGATACTCC

Gstm3	Forward	ATGCCATCCTGCGCTACCTT
	Reverse	CCAGGAACTCAGAGTAGAGC
Mttp	Forward	GTCAACAGAGAGGCGAGAAG
	Reverse	CTAGCCAAGCCTCTCTTGAG
Npc1l1	Forward	GCAAGGTGATCAGGAGGTTGA
	Reverse	ATCCTCATCCTGGGCTTGC
Pdk4	Forward	AGGGAGGTCGAGCTGTTCTC
	Reverse	GGAGTGTTCACTAAGCGGTCA
Ppara	Forward	TTCACAAGTGCCTGTCTGTC
	Reverse	GGCCTTGACCTTGTTTATGT
Scd-1	Forward	CCGGAGACCCCTTAGATCGA
	Reverse	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC

3.2.7 Histologie

Von den in 4% Paraformaldehyd in PBS fixierten Jejunum-Proben wurden 8 µm-dicke Kryoschnitte angefertigt (HM 560 Cryo-Star; Microm International GmbH, Deutschland), die anschließend mit Ölrot und Mayer's Hämatoxylin angefärbt wurden. Dazu wurden die Schnitte anfänglich 30 Sek. in 10%-igem Formalin fixiert und anschließend für 10 Min. mit Leitungswasser gewässert. Nach kurzem Eintauchen in ddH₂O folgte eine 5-minütige Inkubation in 100% Propylenglykol, sowie anschließend die Färbung mit Ölrot für 30 Min. unter leichtem Schütteln. Nachfolgend wurden die Schnitte für 1 Min. in 85% Propylenglykol inkubiert, kurz mit ddH₂O gespült und die Nuclei mit Mayer's Hämatoxylin für 10 Min. blau angefärbt. Die Proben wurden anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut, kurz in ddH₂O gespült und eingedeckelt. Durch den fettlöslichen, rot-färbenden Azofarbstoff Oil Red O können hydrophobe Lipide, insbesondere neutrale TGs im Gewebe dargestellt werden. Mithilfe dieser Färbetechnik werden die Nuclei blau angefärbt (Mayer's Hämatoxylin), während ungesättigte hydrophobe Lipide rot eingefärbt werden. Eine Differenzierung zwischen den neutralen Lipiden wie TGs und CEs ist anhand dieser Färbung nicht möglich. [100]

Mikroskopische Bilder wurden via Nikon Eclipse E600, ausgestattet mit einer Nikon Digital Sight DS-U1 Einheit (Spach Optics Inc., New York), aufgenommen.

3.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf dem Coomassie Brilliant Blue G-250 Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum sich durch Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Der Farbstoff bindet bevorzugt basische und aromatische Aminosäurereste, v.a. Arginin. [101]

Zur Proteinbestimmung wurde dem Gewebe 700µl eines Lysis-Puffers pH 7.0 zugegeben und anschließend für 2x10 Sek. via Ultraschall (LabsonicU, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) aufgeschlossen. Die photometrische Proteinbestimmung nach Bradford (BioRad, USA) erfolgte mit 1 µl Probe in 650 µl Bradford-Reagenz (150 µl Reagenz + 500 µl H₂O) bei 595 nm. Zur Auswertung wurde eine Standardkurve mit je 2 µl, 4 µl, 8 µl und 16 µl Standard (Konzentration = 1 mg/ml) + 650 µl Bradford-Reagenz mitgeführt. Vor der Vermessung am Photometer wurden die Proben 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Auswertung erfolgte über eine Eichgerade, die über die mitgeführten Standards erstellt wurde. Durch Umformen der Geradengleichung konnten für die jeweiligen Proben auf die Proteinkonzentration rückgerechnet werden. Da die Proteinkonzentrationen teilweise stark voneinander abwichen, wurden einige Proben weiter verdünnt, sodass alle Proben in etwa die gleiche Proteinkonzentration aufwiesen. Somit wurde gewährleistet, dass bei der nachfolgenden Folch-Extraktion in etwa das gleiche Volumen an Probe eingesetzt wurde, um eine Proteinkonzentration von 1 mg zu erreichen.

3.2.9 Folch-Extraktion der Lipide

Die homogenisierte Gewebeprobe wird mit Chloroform:Methanol (2:1, v/v) vermischt und durch Zugabe von PBS die Phasentrennung erreicht. In der oberen wässrigen Phase finden sich polare Substanzen, wie Proteine, während die untere organische Chloroform-Phase die Lipide enthält. [102]

Zur Lipidextraktion wurden 1 mg Protein pro Probe eingesetzt und mit PBS auf ein Endvolumen von 300 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des 20-fachen Volumens (6 ml) an Chloroform:Methanol (2:1, v/v) wurde für 120 Min. bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und währenddessen 1-2x kräftig gevortext.

Der durch Zentrifugation (4000 rpm, 15 Min., 4°C) erhaltene Überstand wurde mit 1,2 ml PBS vermischt und zur Phasentrennung erneut zentrifugiert (2000rpm, 15 Min., 4°C). Die untere Phase wurde mittels einer Spritze abgesaugt, unter Stickstoff abgedampft, 200 µl Chloroform/2% Triton-X100 zugegeben und fertig abgedampft. Anschließend wurden je 100 µl ddH₂O zu den Proben zugegeben, kräftig am Vortexer vermischt und für 30 Min. im Ultraschallbad gelassen.

Die extrahierten Lipidproben wurden mit dem Triglycerides FS und Cholesterol FS Testkit (DiaSys, Diagnostic Systems, Deutschland) vermessen, mit welchem auch TGs und Cholesterin im Plasma bestimmt wurden. Eingesetzt wurden hier 10 µl Probe bzw. TG-/Chol-Standard + 250 µl Reagenz. Nach 15-minütiger Inkubation unter Schütteln wurden die Proben photometrisch bei 492 nm vermessen.

Die erhaltenen Absorptionswerte der einzelnen Proben wurden über den mitgeführten Standard (200 mg/dl = 2 µg/µl) auf µg/mg Protein berechnet. Um eine exakte Berechnung auf mg Protein zu ermöglichen, wurde unmittelbar vor der Folch-Extraktion noch einmal die Proteinkonzentration via Bradford bestimmt.

3.2.10 Western Blotting

Durch Denaturierung der Proteine mit SDS werden diese in der Elektrophorese ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend zum immunologischen Nachweis auf eine Membran (PVDF oder Nitrocellulose) übertragen.

Untersucht wurden WT- bzw. CGI-58-iKO-Probenpools von Duodenum, Jejunum und Ileum hinsichtlich der CGI-58 (39 kDa) Expression, um den Erfolg des intestinalen CGI-58 Knockouts zu überprüfen. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat des WAT mitgeführt, während als zusätzliche Referenz je eine WT- sowie eine CGI-58-Knockout Probe aus Makrophagen diente. Dieselbe Membran wurde gestrippt und für ATGL (54 kDa) und β-Actin (45 kDa) als Ladekontrolle neu inkubiert. Weiters wurden die HF/HCD-Versuchstiere auf ER-Stress Marker eIF2α, phosphoryliertes eIF2α (beide 38 kDa) und CHOP (27 kDa) sowie ebenfalls β-Actin (45 kDa) als Ladekontrolle hin untersucht.

3.2.10.2 SDS-PAGE

Für die Gelelektrophorese wurden pro Probe 80µg Protein eingesetzt, anschließend 1:1 mit Probenpuffer (Endkonzentration: 5% Mercaptoethanol) vermischt, für 5 Min. bei 95°C inkubiert und für den jeweilig gewünschten Nachweis auf ein dementsprechend hochprozentiges Gel aufgetragen (meist 15%-ig). Von den Kontrollen wurden 10 µg Protein (WAT) bzw. 40-50 µg Protein (Makrophagen WT & CGI-58-KO) eingesetzt und wie oben beschrieben weiter behandelt.

Die Zusammensetzung der Gele, sowie der verwendeten Puffer sind Kapitel 3.1 zu entnehmen. Die Proben wurden entsprechend der Porengröße bei 150 V für 90 Min. (15%-iges Gel) getrennt.

3.2.10.3 Blotting & Inkubation mit Antikörpern

Für den Western Blot wurde immer eine PVDF-Membran gewählt, mit Ausnahme zum Nachweis der ATGL-Expression (Nitrocellulose-Membran). Die PVDF-Membran wurde vorab für 5 Min. in Methanol aktiviert. Anschließend wurde der „Sandwich“ in folgender Reihenfolge in einer Plastikkassette zusammengebaut: farblose Seite der Kassette – Schwamm – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Schwamm – schwarze Seite der Plastikkassette. Die fertige Apparatur wurde in richtiger Orientierung (schwarze Seite (negativ) zeigt zur Kathode) in die Blottingkammer eingesetzt, sodass der richtige Transfer der durch SDS negativ geladenen Proteine vom Gel zur Membran gewährleistet wurde. Benötigt wurde dazu ein Blotting-Puffer aus 100 ml 10x-Blotpuffer, 200 ml Methanol und 700 ml H₂O. Die Proteine wurden für 1,5 h (Nitrocellulose) bzw. 2 h (PVDF) bei 150 mA unter Eiskühlung auf die Membran transferiert. Alternativ zu dieser gängigen Methode wurden einige der durchgeführten Western-Blots auch mittels Trans Blot Turbo Transfer System (BioRad, USA) geblottet. Dieser Transfer benötigt nur 7 Min. anstelle der oben beschriebenen 1,5h, funktioniert allerdings nicht für hochprozentige Gele (>10%) und Proteine >50 kDa.

Anschließend wurde durch PonceauS-Färbung der Erfolg des Transfers überprüft, sowie die Membran entsprechend der Banden von Interesse zugeschnitten und mit Waschpuffer wieder entfärbt. Die Membran wurde nachfolgend mit 5%-iger Milchlösung (5 g Milchpulver in 100 ml 1x Waschpuffer) für ca. 2 h inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blocken. Im darauffolgenden Schritt wurde der in 5%-iger Milchlösung verdünnte primäre Antikörper (AK) (Tabelle 7) der Membran zugegeben und über Nacht bzw. über das Wochenende bei 4°C unter

Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschrift (3x 10 Min. mit 1x Waschpuffer) wurde der sekundäre Antikörper zugegeben. die Inkubation erfolgte unter Schütteln für 2 h. Nach einem erneuten Waschschrift (5x 15 Min. mit 1x Waschpuffer) wurde auf Höhe der zu untersuchenden Banden 1 ml ECL-Lösung wiederholt verteilt und anschließend durch Detektion der Chemilumineszenz ausgewertet (s.u.).

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western-Blotting.

Größe	Primär-AK (Verdünnung)	Sekundär-AK (Verdünnung)
27kDa	CHOP (1:1000)	Anti-Mouse (1:500)
38kDa	eIF2 α (1:1000)	Anti-Rabbit (1:2500)
38kDa	Ⓟ -eIF2 α (1:1000)	Anti-Rabbit (1:2500)
39kDa	CGI-58 (1:500)	Anti-Mouse (1:500)
45kDa	β -Actin (1:20000)	Anti-Mouse (1:500)
54kDa	ATGL (1:200)	Anti-Rabbit (1:2500)

3.2.10.4 Stripping

Meist wurden die Gele für die Immunodetektion von weiteren Proteinen und β -Actin als Ladungskontrolle weiterverwendet. Dazu musste der vorangegangene AK von der Membran entfernt werden (Stripping):

1) Stripping im Wasserbad (60°C): Nach Zugabe von 15 ml Strippingpuffer (inkl. 100 μ l β -Mercaptoethanol) wurde die Membran für 20 Min. im Wasserbad bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde für ca. 10 Min. gewaschen, bis kein β -Mercaptoethanol mehr zu riechen war und wiederum mit 5%-iger Milchlösung für eine Stunde geblockt, bevor über Nacht mit dem nächsten Primär-AK inkubiert wurde.

2) Stripping bei Raumtemperatur: Alternativ zu Variante 1 kann auch mit einem anderen Strippingpuffer (pH 2,15) für 2x15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Milch blockiert und über Nacht mit dem Primär-AK inkubiert werden.

Am Tag darauf wurde nach 3x 10-minütigem Waschen mit dem Sekundär-AK für 2 h inkubiert und analog der oben beschriebenen Proteine detektiert.

3.2.10.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte digital mithilfe des ChemiDocMP Systems (BioRad, USA) durch Detektion entstandener Chemilumineszenz: dazu wurde die Membran mit einer Lösung aus 500 μl Peroxid-Reagenz und 500 μl Luminol-Reagenz inkubiert (Clarity™ Western ECL Substrate Kit bzw. Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescent Kit; BioRad, USA). Für die Detektion von β -Actin als Ladungskontrolle wurde immer der Clarity™ Western ECL Substrate Kit verwendet, da mit dem anderen Substrat keine Quantifizierung aufgrund der hohen Intensität möglich war. Der verwendete Sekundärantikörper, der den Primärantikörper bindet, ist an das Enzym HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt, das in Anwesenheit von Peroxid das Substrat (Luminol) oxidiert und somit ein Lichtsignal erzeugt, das digital erfasst werden kann. [103, 104] Die erhaltenen Daten wurden via ImageJ über ihre Fläche quantifiziert, auf β -Actin normalisiert und graphisch als Diagramm dargestellt.

3.2.11 TG- und Cholesterin-Absorptionsstudie

Insgesamt wurden drei verschiedene Absorptionsstudien durchgeführt: die erste Absorptionsstudie (WT vs. CGI-58 iKO) umfasste sechs Männchen, sowie acht Weibchen, denen nach 4-stündiger Nahrungskarenz jeweils 200 μl eines Maiskeimöl-Substrats mit darin gelösten 200 μg freiem Cholesterin, 0.5 μCi ^{14}C -Cholesterin und 2 μCi ^3H -Trioleat gavagiert und nach 150 sowie 300 Min. Blut aus dem retrobulbären Plexus gewonnen wurden. 300 Min. nach der Gavage wurden die Mäuse getötet und Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Leber entnommen.

Die zweite Absorptionsstudie umfasste eine Mausgruppe von elf Weibchen (WT vs. CGI-58 iKO), die eine intraperitoneale Injektion an 500mg/kg Körpergewicht Tyloxapol, einem LPL-Inhibitor, erhielten. Eine Stunde nach der Injektion erfolgte das Gavagieren des Substrats analog der ersten Absorptions-Versuchsgruppe (200 μl Maiskeimöl-Substrats mit darin gelösten 200 μg freiem Cholesterin, 0.5 μCi ^{14}C -Cholesterin und 2 μCi ^3H -Trioleat pro Maus), sowie Blutabnahme 150 und 300 Min. nach dem Gavagieren. Abschließend wurden die Mäuse getötet und Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Leber entnommen.

Um hinsichtlich künstlich induziertem ER-Stress Veränderungen im Lipidmetabolismus zu untersuchen, wurde für eine dritte TG- und Cholesterinabsorptionsstudie (Ctl. vs. TM) sechs männliche WT-Versuchstiere verwendet. Für diesen Versuch wurde drei Wildtyp-Mäusen 0,75 mg/kg Körpergewicht einer 0,1 mg/ml TM-Suspension in PBS intraperitoneal (i.p.) injiziert, eine wiederholte Injektion erfolgte nach 24 h, die zervikale Dislokation 48 h nach Startzeitpunkt. Mit den Kontrollmäusen wurde gleich verfahren, diese erhielten jedoch eine i.p.-Injektion an reinem PBS. Die Absorptionsstudie wurde analog der ersten Absorptions-Versuchsgruppe durchgeführt, wobei hier nach 120 und 240 Min. Plasmaproben gewonnen wurden, sowie die Organentnahme 240 Min. nach dem Startzeitpunkt erfolgte.

Je 50 µl Plasma, sowie 2x 20 µl des Substrats wurden mit 2 ml Szintillations-Cocktail (Ultima Gold™, PerkinElmer, USA) vermischt und via Flüssigszintillationsmessung die Radioaktivität bestimmt. Die Magen-Proben wurden in 1 ml 1 M NaOH für ca. 3 h im Wasserbad bei 67°C gelöst, bei 4000 rpm für 10 Min. zentrifugiert und anschließend der gesamte Überstand mit 8 ml Szinti-Cocktail vermischt. Die intestinalen Proben, sowie die Leber wurden über Nacht lyophilisiert (VirTis BenchTop K Manifold Gefriertrocknungsanlage, SP Scientific, USA), gewogen und ebenfalls in 1 ml 1 M NaOH für ca. 3 h im Wasserbad bei 67°C gelöst. Das gesamte Lysat wurde nach Zugabe von 8 ml Szintillations-Cocktail vermessen. Alle Proben wurden über Nacht im Szintillations-Cocktail inkubiert.

Mithilfe eines β -Counters (Tri-Carb® 3100TR, PerkinElmer, USA) konnte die Radioaktivität von ^3H und ^{14}C parallel in den jeweiligen Proben bestimmt werden. Bei jedem Lauf wurden Blank (Szinti-Cocktail) und Positivkontrolle (Substrat) mitgeführt. Zur Auswertung herangezogen wurden die DPM-Werte, die je nach Probe auf ein einheitliches Volumen (ml Plasma) oder ein einheitliches Gewicht (g Gewebe) normalisiert wurden.

3.2.12 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Zur Bestimmung der Lipoproteinfraktionen wurde mit jeweils ~200 µl gepooltem Plasma (1x WT-Pool, 1x CGI-58 iKO Pool) eine FPLC, ausgestattet mit einer Superose 6 Säule (Amersham Biosciences, USA) durchgeführt. Aus den einzelnen Fraktionen wurden anschließend TG- und TC-Konzentrationen bestimmt.

3.2.13 Diagramme und Statistik

Alle nachstehenden Diagramme sind nach einem einheitlichen Farbcode sortiert: schwarze Balken stehen für WT-, weiße für CGI-58 iKO-Mäuse. Kontrollen werden ebenfalls in schwarz dargestellt, während die Daten nach TM-Behandlung in Weiß gehalten sind.

Die Ergebnisse der Real-Time PCR wurden mittels REST[©] ausgewertet und auf CyclophilinA als Referenzgen normalisiert. Alle übrigen Daten wurden statistisch über einen ungepaarten bzw. gepaarten student's *t*-test (GraphPad Prism 5.0, CA) ausgewertet und graphisch als Mittelwert + Standardfehler (SEM) dargestellt.

Alle Western-Blots wurden über ImageJ ausgewertet und auf β -Actin als Ladungskontrolle normalisiert.

Die Signifikanzen sind wie folgt definiert: * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$. Ergebnisse, die mit keinem * gekennzeichnet sind, gelten als nicht signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Intestinale CGI-58 Defizienz (RCD)

Alle nachfolgenden Experimente wurden – sofern nicht anders angegeben – mit WT- und CGI-58 iKO-Mäusen auf Rodent Chow Diet (RCD), die in Alter (6-7 Wochen) und Geschlecht (♂) übereinstimmten, durchgeführt.

4.1.1 Überprüfung des darmspezifischen CGI-58 KO

Effizienter Knockout von CGI-58 im Intestinum der CGI-58-iKO Mäuse

Um das erfolgreiche Ausschalten von CGI-58 spezifisch im Darm zu bestätigen, wurden die mRNA-Expressionslevel des Dünndarms (Duodenum, Jejunum, Ileum), sowie der Leber und Niere als Kontrollen untersucht. Die mRNA-Expression von *CGI-58* im Dünndarm der 4h gefasteten Mäuse (Abb.18A), sowie auch der über Nacht-gefasteten (14h) Tiere (Abb.18B), ist in den iKO-Versuchstieren im Vergleich zu ihren WT-Artgenossen signifikant vermindert. Im Gegenteil dazu zeigen Genexpressionsanalysen der Niere und Leber in den 4h gefasteten Tiere eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante *CGI-58* Expression, während in den über Nacht-gefasteten Mäusen eine verminderte *CGI-58* Expression in der Leber zu beobachten ist (Abb.18).

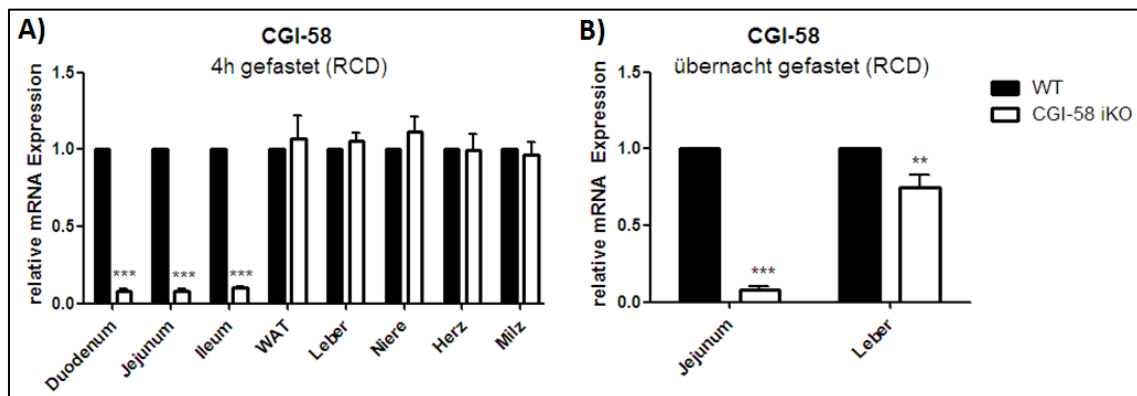


Abb. 18: Überprüfung des CGI-58 Knockouts im Intestinum auf mRNA-Ebene (RCD, ♂).

Der Vergleich der *CGI-58* mRNA Expression zwischen Kontrollorganen (WAT, Leber, Niere, Herz, Milz) und den jeweiligen Dünndarm-Abschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum) zeigt v.a. in den 4h gefasteten iKO-Mäusen (A) einen effizienten darmspezifischen Knockout des Gens. Ebenfalls in den 14h-gefasteten Versuchstieren (B) findet sich eine deutliche Reduktion der *CGI-58* mRNA-Expression der Knockout-Mäuse in Relation zu den WT-Mäusen – zu beobachten sowohl in Jejunum, als auch in der Leber. 4h gefastet: WT n=4, iKO n=3. Über Nacht gefastet: WT n=3, iKO n=3. ** p≤0,01; *** p≤0,001.

Es zeigte sich auch eine signifikante Reduktion der CGI-58 Proteinexpression bei intestinaler CGI-58 Defizienz. Als Kontrolle dienten WT- und makrophagenspezifische CGI-58 KO Proben, sowie ein Lysat des WATs als Positivkontrolle. Als Ladungskontrolle diente β -Actin (Abb.19).

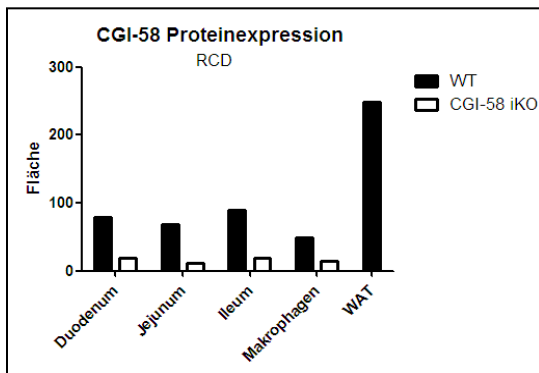
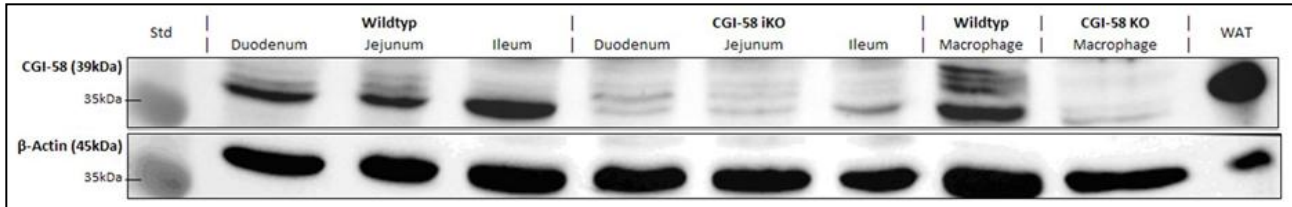


Abb. 19: Überprüfung des CGI-58 Knockouts im Intestinum auf Proteinebene (RCD, ♂).

Der Vergleich von WT- und CGI-58-iKO Mäusen zeigt hinsichtlich der CGI-58-Proteinexpression eine deutliche Reduktion des in den iKO-Tieren. Von den Gewebeprobe wurden 80 μ g Protein aufgetragen. Als Positivkontrolle für CGI-58 diente ein WAT-Lysat, von dem 10 μ g Protein auf das Gel geladen wurden. Als weitere Kontrolle wurden eine WT-, sowie eine CGI-58 KO-Probe aus Makrophagen mit einer aufgetragenen Proteinkonzentration von 50 μ g mitgeführt. WT-Pools n=3, iKO-Pools n=3.

4.1.2 Lipidakkumulationen im Gewebe

Darmspezifische CGI-58 Defizienz führt zu intestinaler TG-Akkumulation (♂)

Da CGI-58 einen wichtigen Cofaktor der ATGL darstellt, ist bei CGI-58 Defizienz eine Störung der Lipolyse sowie eine folglich Akkumulation von Triglyzeriden in Form von LDs zu erwarten. Während die CGI-58 iKO Mäuse hinsichtlich des Cholesteringehalts in Duodenum, Jejunum und Ileum eine, allerdings nicht signifikante, Tendenz in Richtung vermehrter Lipidansammlung aufweisen (Abb.20B), so finden sich bei CGI-58 Defizienz signifikante TG-Akkumulationen in Duodenum und Jejunum nach 4-stündiger Nahrungskarenz (Abb.20A). Im Gegensatz dazu zeigen 14 h-gefastete Mäuse keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich TG- und Cholesteringehalt (Abb.21).

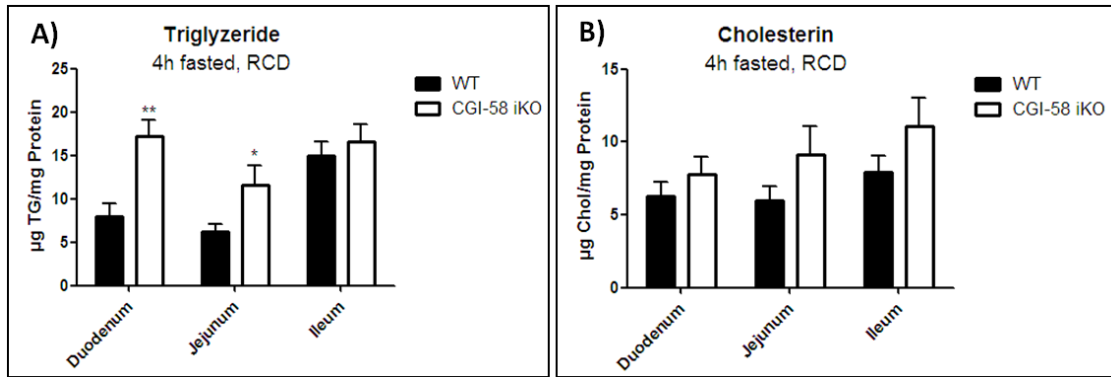


Abb. 20: Lipidgehalt 4h gefastet (RCD, ♂).

Der Vergleich der TG- und Cholesterin-Konzentrationen zwischen WT und CGI-58 iKO Mäusen zeigt nach 4-stündigem Fasten eine signifikante Ansammlung von TGs in Duodenum und Jejunum. Insgesamt lässt sich in allen Darmabschnitten sowohl eine TG- als auch Cholesterinakkumulation beobachten. WT n=6, iKO n=6.
* p<0,05**; p≤0,01.

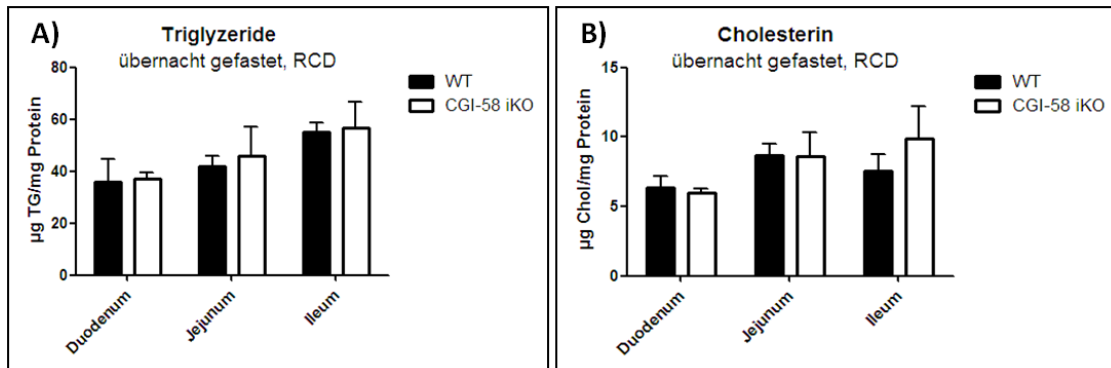


Abb. 21: Lipidgehalt über Nacht-gefastet (RCD, ♂).

Nach 14-stündigem Fasten zeigt der Vergleich der intestinalen TG- und Cholesterin-Konzentrationen zwischen WT und CGI-58 iKO Mäusen keinerlei signifikante Ergebnisse. WT n=6, iKO n=6.

Erhöhte LD-Akkumulationen konnte durch Anfärbung der neutralen Lipide in Kryoschnitten des Jejunums (4h gefastet) via Oil-Red-O Färbung bestätigt werden. Abb. 23 zeigt eine Gegenüberstellung der histologischen Schnitte des Jejunums von WT- und CGI-58-iKO Mäusen in zwei verschiedenen Vergrößerungen (oben: 4.2-fach, unten: 20-fach). Beide Male findet sich in den CGI-58 defizienten Tieren eine signifikante Anhäufung neutraler Lipide, die durch die verwendete histologische Färbung als rote Punkte ersichtlich sind. Dies deckt sich mit den durch Folch-Extraktion ermittelten intestinalen TG-Akkumulationen. Da auch ein Trend zu gesteigerten Cholesterinablagerungen im Duodenum zu beobachten war, und der Ölrot-Farbstoff alle neutralen Lipide, also auch CEs, anfärbt, könnten die ersichtlichen LDs nicht nur TGs, sondern auch CEs darstellen (Abb.23).

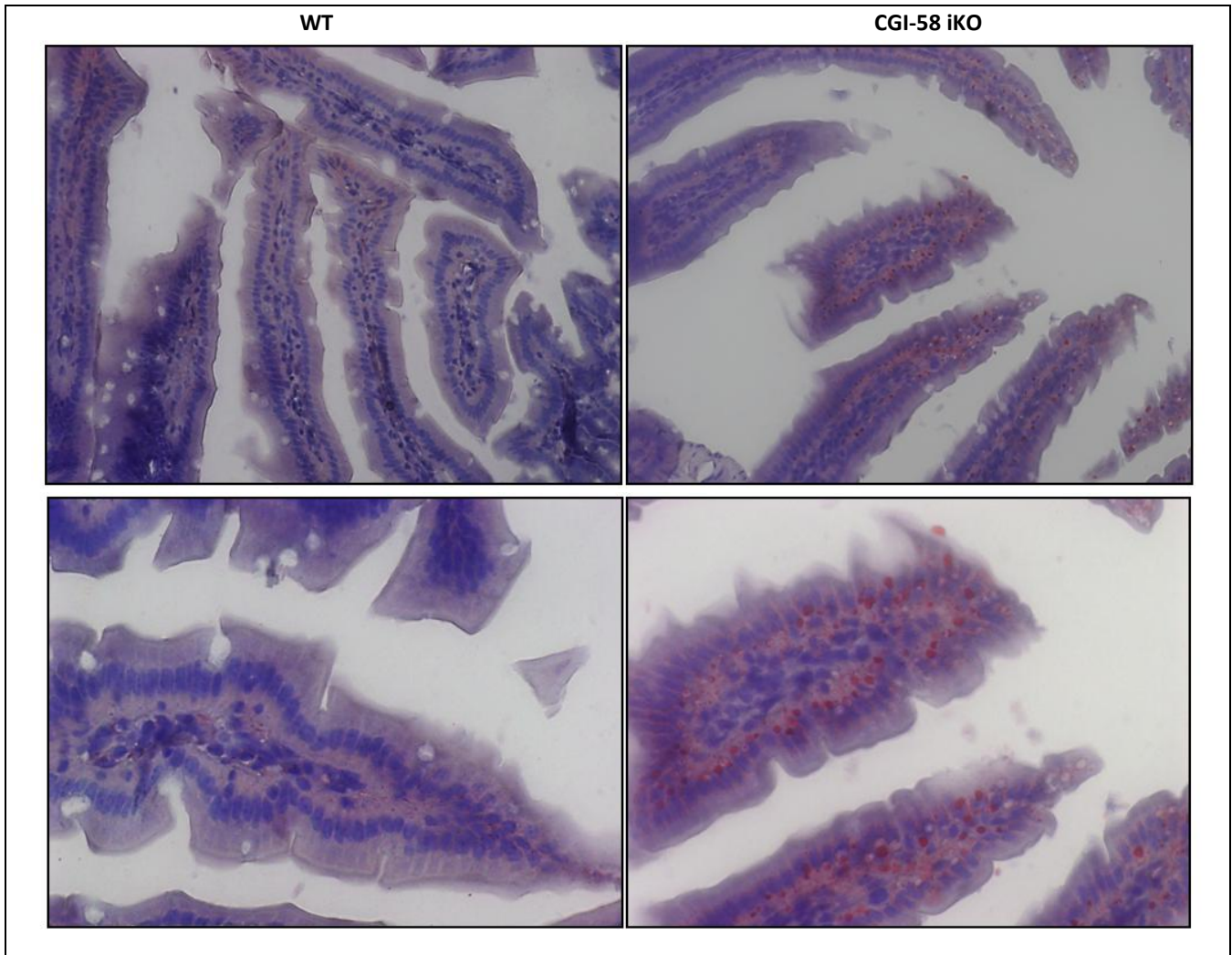


Abb. 22: LD Akkumulation im Jejunum von CGI-58-iKO-Mäusen (RCD, ♂).

Von Kryoschnitten der Jejunum-Gewebeproben wurden mittels Oil-Red-O Färbung die neutralen Lipide visualisiert. Im Vergleich zu den WT Mäusen (links) findet sich in den CGI-58 defizienten Versuchstieren (rechts) eine Akkumulation von Triglyzeriden in Form von LDs, die durch die verwendete histologische Färbung als rote Punkte ersichtlich sind (repräsentative Abbildung).

4.1.3 Einfluss des CGI-58 iKO auf den Lipidmetabolismus (Genexpressionsprofil)

Um die Bedeutung von CGI-58 auf den intestinalen Lipidmetabolismus zu untersuchen, wurden via qRT-PCR eine Reihe von PPAR α -Zielgenen, die an Lipolyse (CGI-58, ATGL, GOS2), β -Oxidation (Acot1, Acot2, Cpt1 α , Acox1), oxidativem Stress (Gstk1, Gstm3), Lipoprotein-Metabolismus und Lipidabsorption (Abca1, NPC1L1, CD36, Mttp, ApoA1), sowie der Regulation der Lipogenese (DGAT2, SCD-1) beteiligt sind, vermessen.

Abnehmender Trend der PPAR α Expression bei CGI-58 Defizienz

PPAR α reguliert die peroxisomale, mikrosomale und mitochondriale FS-Oxidation. (reviewed in [105]) Die intestinale Expression von *Ppara* selbst zeigt einen statistisch nicht signifikanten abnehmenden Trend von Duodenum nach Ileum bei CGI-58 iKO Tieren, verglichen mit der WT-Versuchsgruppe (Abb.23).

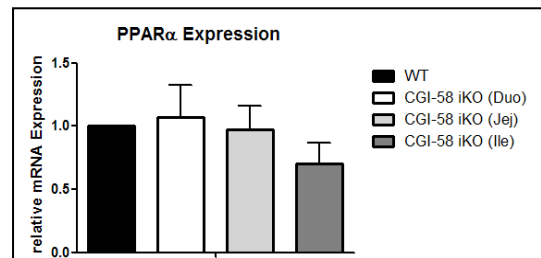


Abb. 23: mRNA-Expression *Ppara* (RCD, ♂).

Die Analyse der intestinalen PPAR α -Genexpression zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen WT und CGI-58 iKO. WT n=3, iKO n=4.

CGI-58 iKO resultiert in erhöhter GOS2 mRNA-Expression (♂)

Die signifikante Verminderung der ATGL-Expression im Jejunum, sowie der leichte Trend in Richtung Herunterregulierung im Duodenum und Ileum (0,978 bzw. 0,894) der CGI-58 iKO Tiere deutet auf eine verminderte ATGL-induzierte Lipolyse in Abwesenheit von CGI-58 hin. Zusätzlich zeigt die mRNA-Expression des lipolytischen ATGL-Inhibitors *GOS2* (G0/G1 switch Regulatorprotein) sowohl in Duodenum, als auch Jejunum eine gesteigerte Expression. Die Leber zeigt keinerlei Veränderung in der Expression LD-assoziiierter Proteine zwischen WT und CGI-58 iKO Versuchsmäusen (Abb.24A).

Gesteigerte Scd1 mRNA Expression in Duodenum von CGI-58 iKO Mäusen (♂)

Die erhöhte Genexpression der Stearoyl-CoA Desaturase-1 (*Scd-1*), die an der Biosynthese einfach-ungesättigter Fettsäuren, ins Besondere von Palmitol und Oleat, beteiligt ist (reviewed in [106]), indiziert eine gesteigerte Lipogenese in CGI-58-iKO Mäusen gegenüber den WT-Versuchstieren – jedoch nur in Duodenum und Jejunum. Des Weiteren findet sich auch eine Tendenz hin zu gesteigerter mRNA-Expression der Acetyl-CoA Carboxylase (*Acc*) und der

Fettsäure-Synthase (*Fas*) im Duodenum der CGI-58 iKO Mäuse. Diese zwei Enzyme sind an der *de novo* Synthese von Lipiden beteiligt und katalysieren die Umwandlung von Acetyl CoA zu Malonyl-CoA (ACC), das in weiterer Folge zur Synthese von Palmitat (16:0) herangezogen wird (FAS). Interessanterweise findet sich konträr zu den mRNA-Daten von Duodenum und Jejunum im Ileum eine signifikante Verminderung der *Scd-1* Genexpression. Weiters zeigt sich auch eine verminderte Expression der *Dgat2* (Abb.24B).

Unveränderte mRNA Expression von Genen der β -Oxidation (♂)

Hinsichtlich der mitochondrialen β -Oxidations-Marker Acyl-CoA Thioesterase (*Acot*) und Carnitine Palmitoyltransferase 1A (*Cpt1 α*) lassen sich keinerlei signifikante Unterschiede bei CGI-58 iKO beobachten, während die Acyl-CoA Oxidase 1 (*Acox1*) als Marker der peroxisomalen β -Oxidation eine signifikant verminderte mRNA-Expression im Ileum der CGI-58 defizienten Tiere aufweist. Insgesamt lässt sich in den CGI-58 defizienten Mäusen ein Trend Richtung abnehmender β -Oxidation von Duodenum nach Ileum beobachten (Abb.24C).

Vergleicht man das Genexpressionsmuster aller drei Darmabschnitte, so zeigt sich deutlich, dass im Ileum alle vermessenen Gene, die eine Rolle in verschiedenen Zweigen des Lipidmetabolismus (Lipolyse, Lipogenese, β -Oxidation, Lipidabsorption) spielen, herunterreguliert sind (Abb.24).

Die erhöhte Genexpression des Cholesterintransporters *Npc1/1* in Duodenum und Jejunum indiziert weiters eine Steigerung der Cholesterinaufnahme, während die anderen in der Lipidabsorption involvierten Gene keine signifikanten Änderungen bei CGI-58 Defizienz zeigen (Abb.24D).

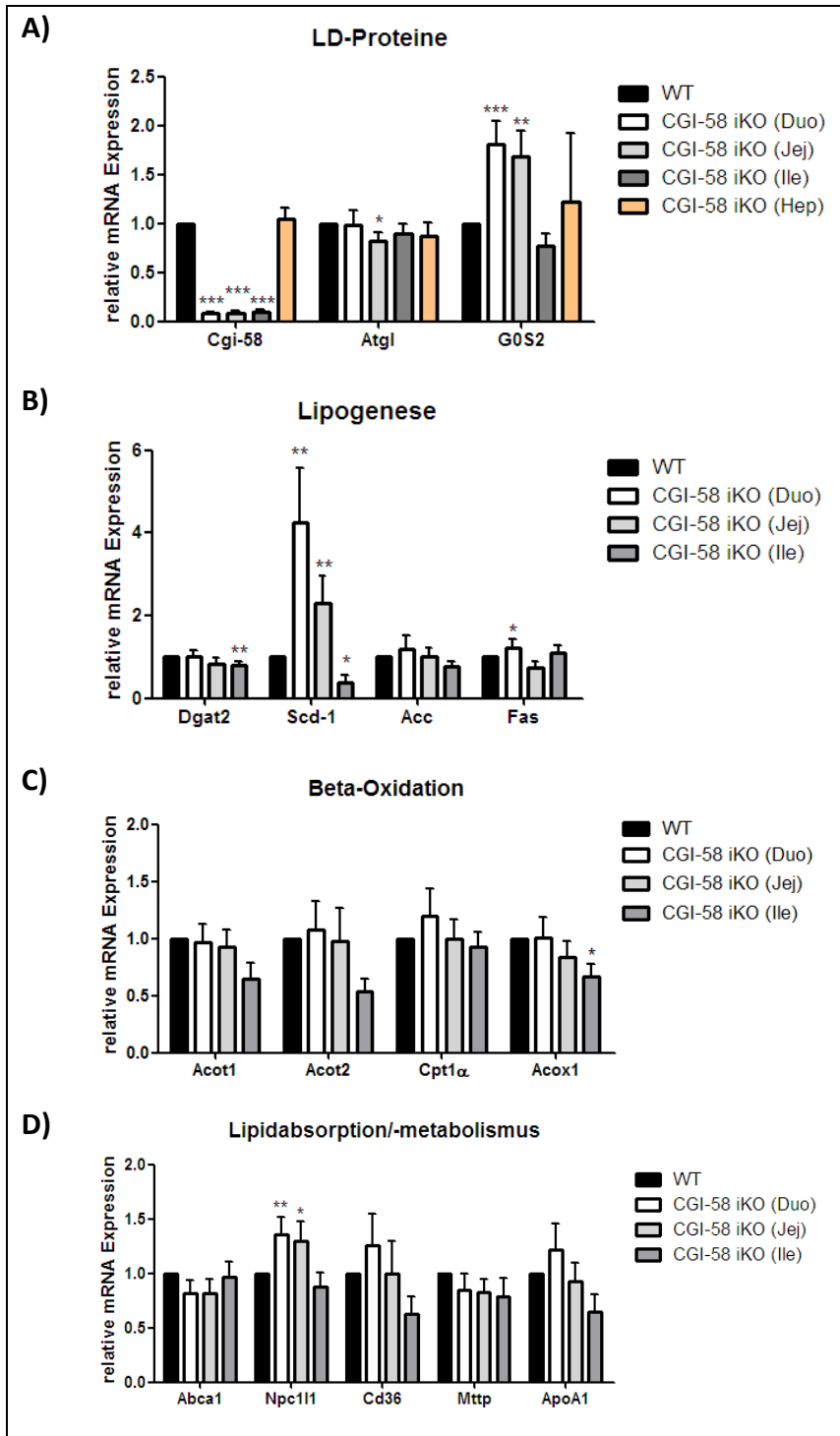


Abb. 24: Genexpression Lipid-metabolismus (RCD, ♂).

Untersucht wurden PPAR α -Zielgene, die eine Rolle im intestinalen Lipid-metabolismus spielen, wie Lipolyse (A), Lipogenese (B) β -Oxidation (C) und Lipidabsorption (D). Alle mRNA Expressionen wurden auf CyclophilinA als Referenzgen normalisiert.

WT n=3, iKO n=4.

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Intestinale CGI-58 Defizienz hat keinen Einfluss auf mRNA Expression von Genen des oxidativen Stresses (♂)

Die Expressionen zweier Marker für oxidativen Stress Glutathion-S-Transferase kappa1 (*Gstk1*) und Glutathion-S-Transferase mu3 (*Gstm3*) zeigen in keinem der untersuchten Darmabschnitte signifikante Unterschiede zwischen WT und CGI-58 iKO Versuchstieren, was einen fehlenden Einfluss der intestinalen CGI-58 Defizienz auf die Entstehung von oxidativem Stress indiziert

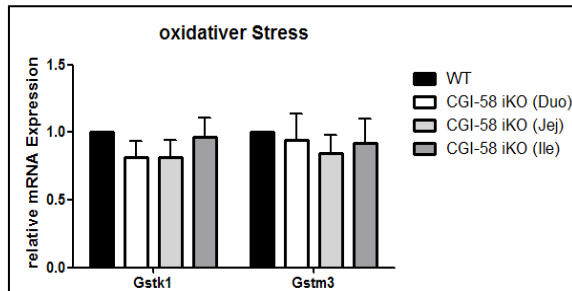


Abb. 25: Oxidativer Stress bei CGI-58 iKO (RCD, ♂).

Keiner der drei Darmabschnitte zeigt bei CGI-58 iKO signifikante Unterschiede im Vergleich zum WT. Im Jejunum findet sich jedoch ein Trend in Richtung verminderter Expression der mit oxidativem Stress assoziierten Marker *Gstk1* und *Gstm3*. WT n=3, iKO n=4.

(Abb.25).

Abnehmende *Pdk4*-Expression bei CGI-58 Defizienz von Duodenum nach Ileum (♂)

Die beobachteten Expressionen für PDK4 gelten zwar statistisch als nicht signifikant, zeigen aber einen deutlichen Trend in Richtung verminderter Expression von Duodenum nach Ileum (Abb.26). Interessanterweise findet sich bei HF/HCD-gefütterten Tieren ein genau gegengleiches Muster, indem von Duodenum nach Ileum eine Zunahme der *Pdk4*-Expression zu finden ist (siehe Abb.46).

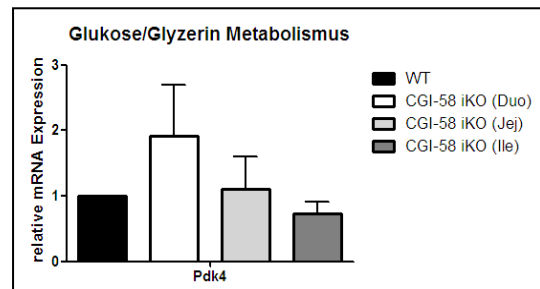


Abb. 26: *Pdk4* mRNA Expression bei CGI-58 iKO (RCD, ♂).

Während im Duodenum PDK4 bei CGI-58 iKO verglichen mit den WT-Mäusen noch vermehrt exprimiert wird, so nimmt die mRNA-Expression zum Ileum hin deutlich ab. Die Daten gelten als statistisch nicht signifikant. WT n=3, iKO n=4.

4.1.4 Intestinale CGI-58 Defizienz und ATGL-Expression

CGI-58 iKO führt zu Verminderung der *Atgl* mRNA-Expression im Jejunum (♂)

Die *ATGL* Genexpression zeigt eine signifikante Verminderung im Jejunum bei CGI-58 iKO im Vergleich zur WT-Versuchsgruppe, was eine reduzierte Aktivierung der ATGL in Abwesenheit von CGI-58 indiziert (siehe Abb.24).

Keine Veränderung der ATGL-Proteinexpression bei CGI-58 iKO Mäusen (♂)

Auf Proteinebene kann diese reduzierte ATGL-Expression nicht beobachtet werden. Während sich im Ileum bei CGI-58 Defizienz eine leicht verminderte ATGL Expression zeigt, so finden sich in Duodenum und Jejunum, sowie auch in den Makrophagen, keine Unterschiede zwischen WT und iKO Tieren (Abb.27).

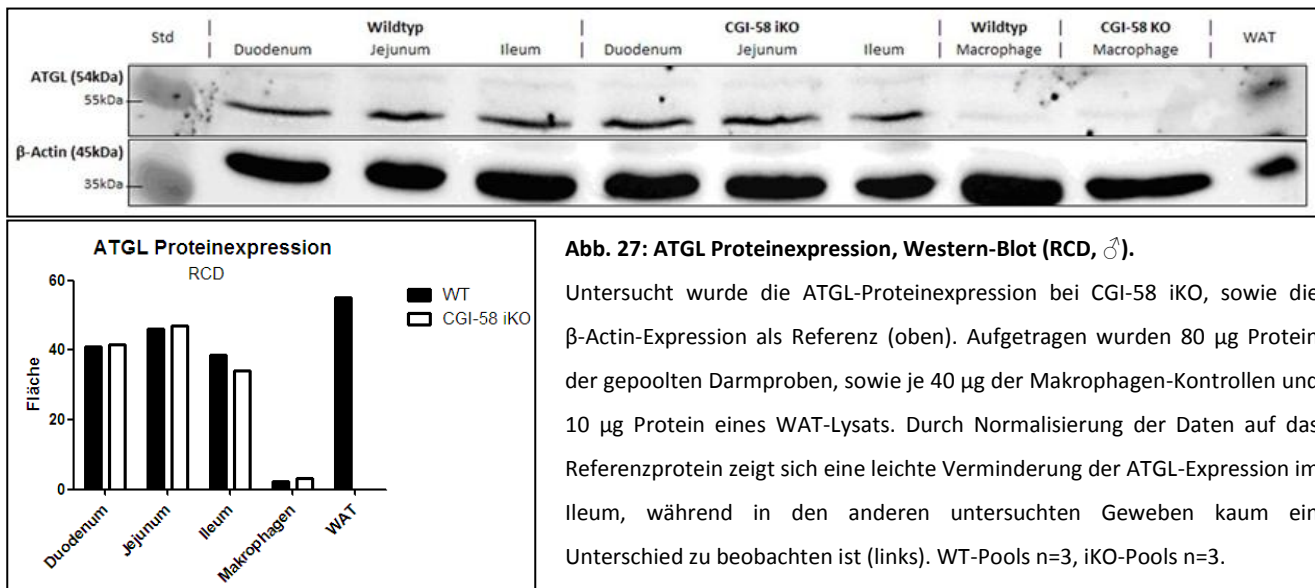


Abb. 27: ATGL Proteinexpression, Western-Blot (RCD, ♂).

Untersucht wurde die ATGL-Proteinexpression bei CGI-58 iKO, sowie die β -Actin-Expression als Referenz (oben). Aufgetragen wurden 80 μ g Protein der gepoolten Darmproben, sowie je 40 μ g der Makrophagen-Kontrollen und 10 μ g Protein eines WAT-Lysats. Durch Normalisierung der Daten auf das Referenzprotein zeigt sich eine leichte Verminderung der ATGL-Expression im Ileum, während in den anderen untersuchten Geweben kaum ein Unterschied zu beobachten ist (links). WT-Pools n=3, iKO-Pools n=3.

4.1.5 Plasmaparameter und Plasmalipoproteine

Kein signifikanter Unterschied in Plasmaparametern bei CGI-58 iKO (♂)

Bei RCD-Fütterung findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und CGI-58 iKO-Mäusen bezüglich der Plasmakonzentrationen von TG, TC, FC, CE oder FG. Hinsichtlich der TG-Plasmagehalte kann jedoch ein leichter Anstieg in CGI-58 iKO Mäusen beobachtet werden. Die dargestellten TG-Gehalte sind die Differenz der vermessenen TG-Konzentration abzüglich der vermessenen FG-Gehalte, während sich die CE-Level aus der Differenz von TC und FC ergeben. (Abb.28).

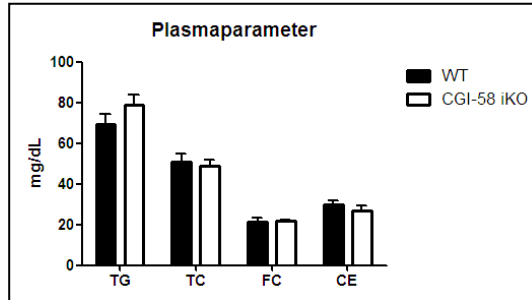
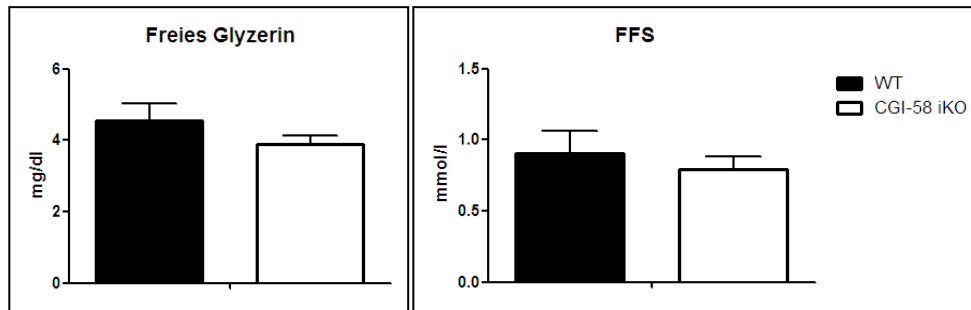


Abb. 28: Plasmaparameter, 4h gefastet (RCD, ♂).

Zwischen WT- und CGI-58 iKO Mäusen findet sich bei RCD kein signifikanter Unterschied bezüglich der Plasmalevel an TG, freiem Glycerin (FG), totalem Cholesterin (TC), freiem Cholesterin (FC), Cholesterinestern (CE) oder FFS. WT n=5, iKO n=10.



Kaum Veränderungen der Plasmalipoproteine bei CGI-58 iKO (♂)

Der Vergleich gepoolter WT- und CGI-58 iKO-Plasmaproben der RCD-Mäuse nach FPLC Auftrennung zeigt nur leichte Unterschiede zwischen den Genotypen. So finden sich in den CGI-58 iKO Mäusen weniger TGs in der LDL-Fraktion als bei den WT Mäusen (Abb.30A), während der Hauptanteil des TCs bei beiden Genotypen ähnlich stark als HDL vorliegt (Abb.30B).

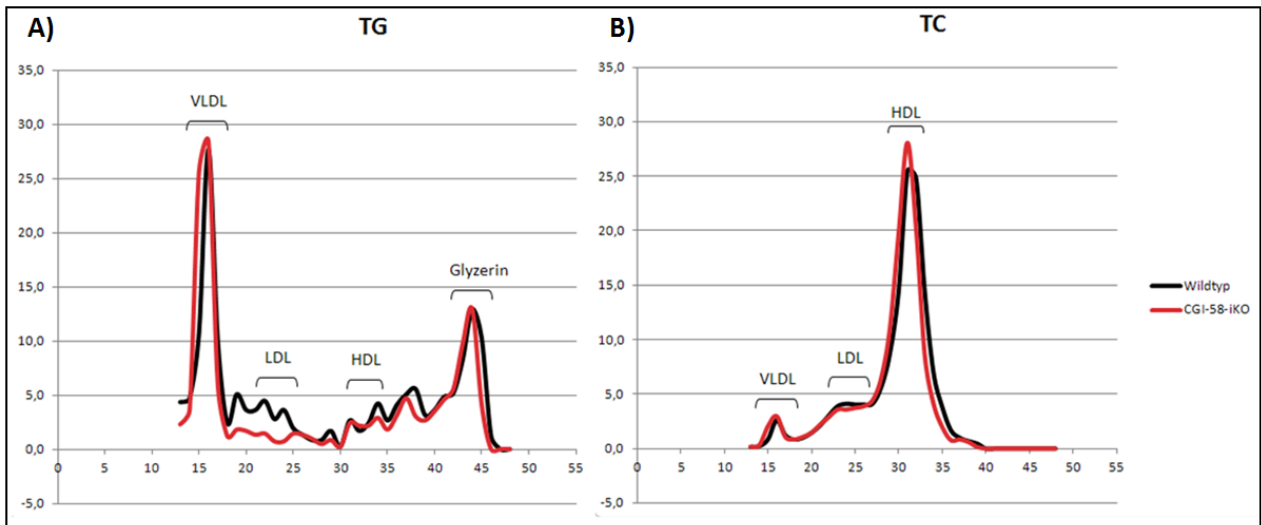


Abb. 29: Lipoproteinprofil, 4h gefastet (RCD, ♂).

Die FPLC-Analyse der gepoolten WT- und CGI-58 iKO Proben zeigt keine deutlichen Unterschiede auf RCD. In beiden Genotypen findet sich der Hauptanteil an Plasma-TGs in der VLDL Fraktion, sowie der Hauptanteil des Plasma-TCs in der HDL-Fraktion. WT n=5, iKO n=10.

4.1.6 Lipidabsorption bei intestinaler CGI-58 Defizienz

Die nachfolgenden Experimente mit radioaktiven Substraten wurden sowohl mit männlichen, als auch weiblichen Versuchstieren gleichen Alters (12 Wochen) auf RCD durchgeführt.

CGI-58 iKO in Weibchen führt zu gesteigerter gastrointestinaler TG-Absorption (♀)

Mithilfe radioaktiv markierter Substrate (^3H -Trioleat, ^{14}C -Cholesterin) konnten die Unterschiede in der Lipidabsorption von TGs und Cholesterin untersucht werden. Dabei zeigte sich in nahezu allen Organen ein geschlechterspezifischer Trend, da besonders in den weiblichen Versuchstieren in Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum eine signifikante Erhöhung der TG-Absorption bei intestinaler CGI-58 Defizienz nachgewiesen wurde. Im Magen konnte zusätzlich eine signifikant erhöhte Cholesterin-Absorption beobachtet werden (Abb.30A&B).

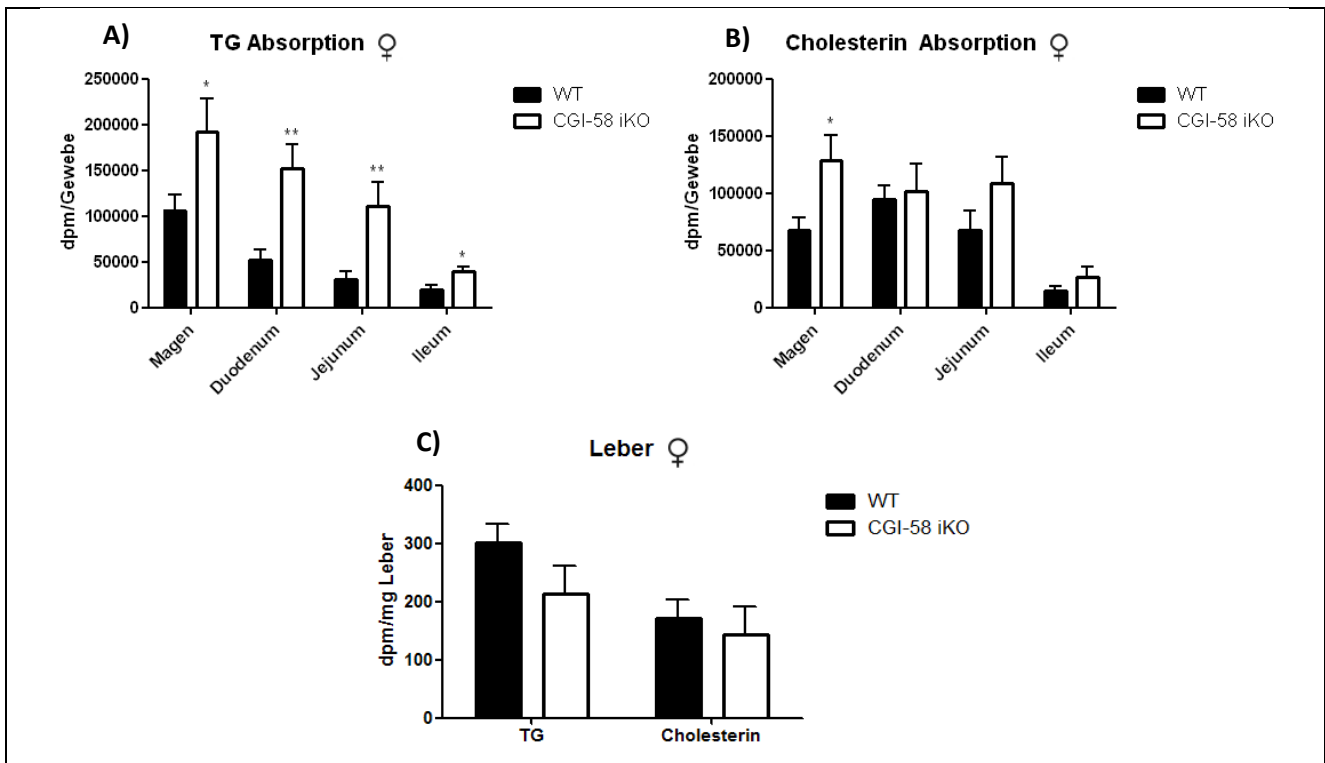


Abb. 30: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption (RCD, ♀).

Mithilfe radioaktiv markierter Substrate (^3H -Trioleat, ^{14}C -Cholesterin) konnte die unterschiedliche Absorption bei CGI-58 Defizienz untersucht werden. Bei den Weibchen finden sich im gesamten untersuchten Gastrointestinaltrakt (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum) signifikante Unterschiede zwischen WT und iKO hinsichtlich der TG-Absorption (A). Da nicht die gesamte Leber, sondern nur der große Leberlappen untersucht wurde, werden diese Daten auf mg Lebergewebe berechnet angegeben. WT n=5, iKO n=3.

* p<0,05; ** p<0,01.

CGI-58 iKO führt zu gesteigerter intestinaler TG-Absorption in Männchen (♂)

Die männlichen Versuchstiere hingegen wiesen einzig im Jejunum eine signifikante Erhöhung der TG-Absorption bei CGI-58-iKO auf, wobei sich im gesamten Intestinaltrakt ein Trend hin zu gesteigerter TG-, sowie verminderter Cholesterinabsorption zeigt (Abb.31A&B).

Verminderte hepatische Lipidabsorption in CGI-58 iKO Mäusen (♂+♀)

In der Leber der männlichen, als auch der weiblichen Versuchstiere konnte hinsichtlich der TG- und Cholesterinabsorption keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und CGI-58-iKO Mäusen beobachtet werden, jedoch zeigen beide Geschlechter eine Tendenz zu verminderter Lipidabsorption bei CGI-58 iKO (Abb.30C & 31C).

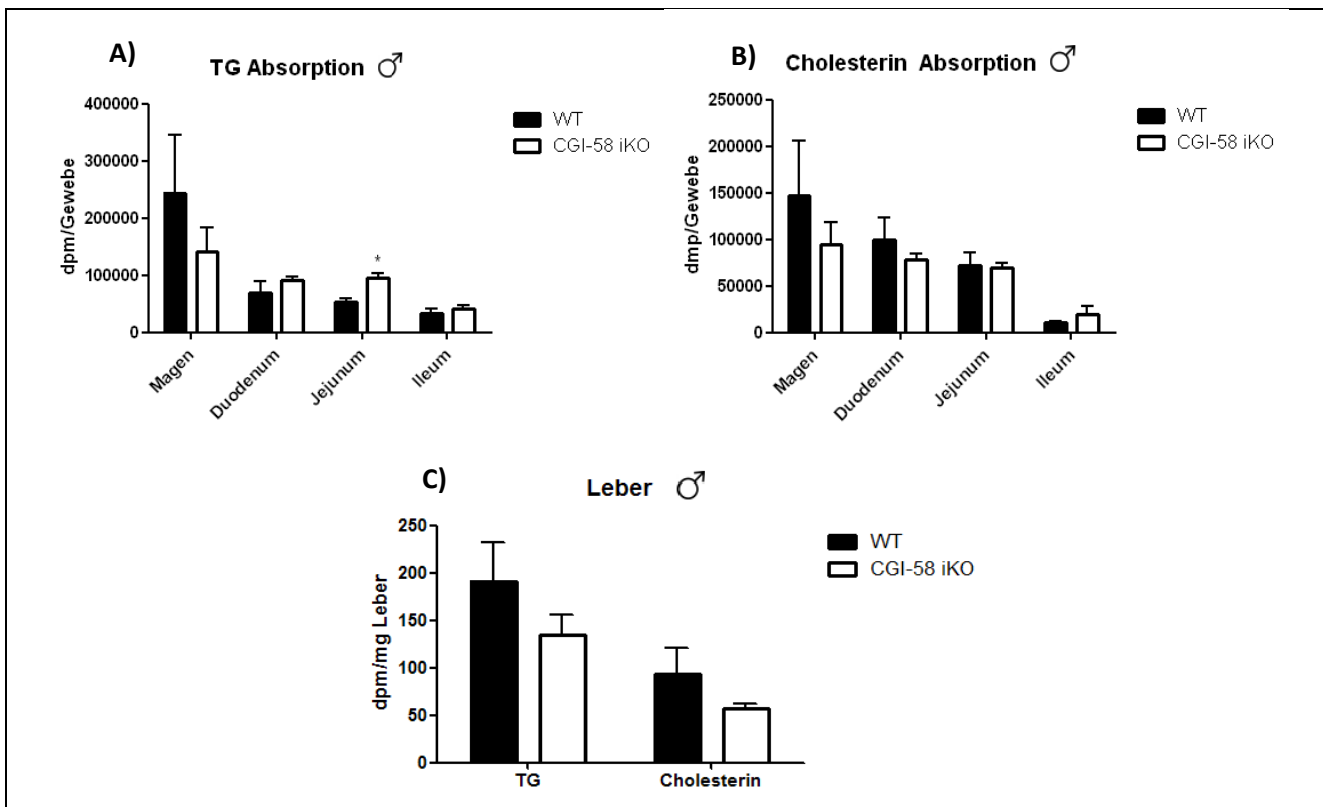


Abb. 31: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption (RCD, ♂).

Durch Gavagieren radioaktiv markierter Substrate (³H-Trioleat, ¹⁴C-Cholesterin) konnte die unterschiedliche Lipidabsorption bei darmspezifischem CGI-58 KO untersucht werden. In den männlichen Versuchstieren finden sich kaum signifikante Unterschiede, wobei hinsichtlich der Cholesterinabsorption eine abnehmende Tendenz bei CGI-58 Defizienz ersichtlich wird. WT n=3, iKO n=3.

* p<0,05.

CGI-58 iKO bedingt verminderte Lipidsekretion in die Blutzirkulation (♀+♂)

Sowohl in der TG- und Cholesterinabsorption der männlichen, als auch der weiblichen Versuchsgruppe findet sich eine Reduktion der Lipide im Plasma. Ebenfalls zu beobachten ist eine Zunahme der Lipidabsorption zwischen den verschiedenen Zeitpunkten bei beiden Genotypen in beiden Geschlechtern (Abb.32). Die verminderten Lipidkonzentrationen im Plasma bei intestinaler CGI-58 Defizienz geht mit der erhöhten intestinalen TG-Absorption, sowie der leicht verminderten hepatischen Lipidaufnahme einher.

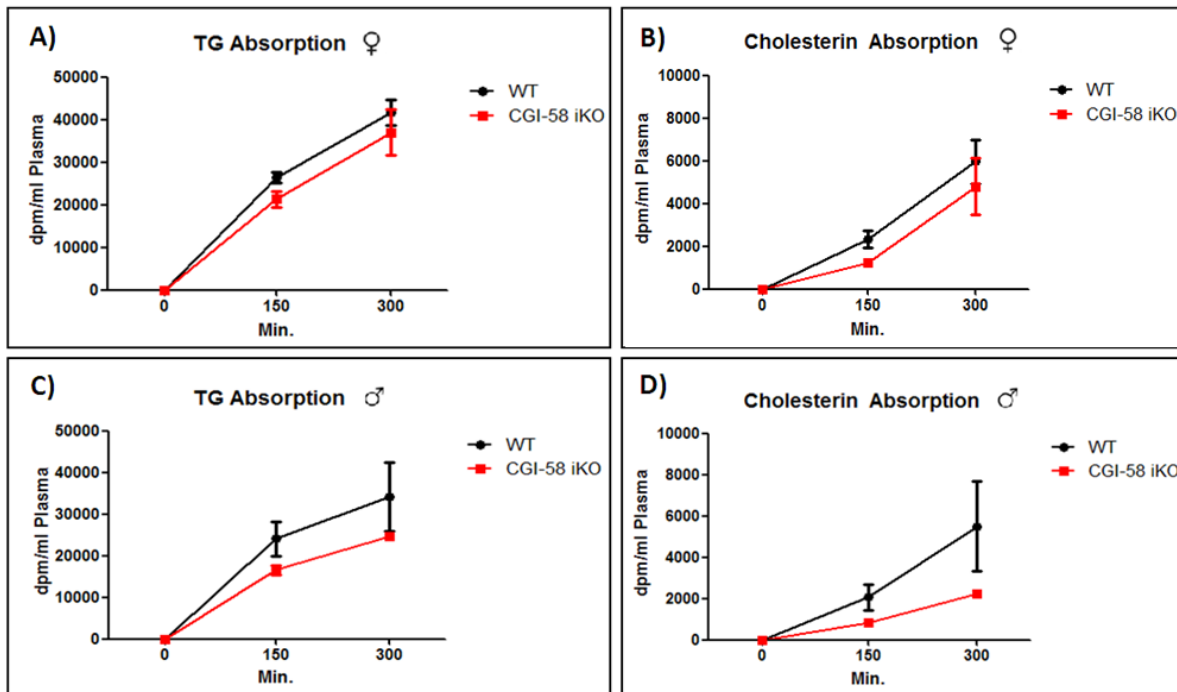


Abb. 32: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption im Plasma (RCD, ♀+♂).

Sowohl bei den weiblichen (A,B), als auch den männlichen (C,D) Versuchstieren findet sich eine Reduktion der absorbierten Lipide (TG, A & C; Cholesterin, B & D) im Plasma 150 und 300 Min. nach Gavagieren. ♂ WT n=3, iKO n=3, ♀ WT n=5, iKO n=3.

Erhöhte TG-Plasmakonzentrationen in weiblichen Versuchstieren

In beiden Genotypen findet sich beim Vergleich der Geschlechter eine leichte Erhöhung der Plasmagehalte an TGs in den Weibchen. Besonders in den CGI-58 iKO Mäusen ist dies ausgeprägt, so finden sich 300 Min. nach Gavagieren bereits 47170 dpm/ml Plasma in den Weibchen, während die männlichen Versuchsmäuse einen Wert von 34800 dpm/ml Plasma zeigen ($p=0,0882$) (Abb.32A&C).

4.1.7 Einfluss intraperitonealer Tyloxapol-Injektion auf die Lipidabsorption

Um zu untersuchen, ob der in der weiblichen Versuchsgruppe beobachtete Effekt auf die Lipidabsorption bei CGI-58 iKO durch LPL mediiert wird, wurde einer zweiten weiblichen Kohorte der LPL-Inhibitor Tyloxapol injiziert und die Absorptionsstudie wiederholt. Das folgende Experiment wurde ausschließlich in weiblichen Versuchsmäusen im Alter von durchschnittlich 15 Wochen (RCD) durchgeführt.

Tyloxapol-Injektion führt zu TG-Akkumulation im Plasma von WT und CGI-58 iKO Mäusen via LPL-Inhibierung (♀)

Tyloxapol als Inhibitor der peripheren Lipolyse durch Hemmung der LPL-Aktivität führt bekanntlich zu Lipidakkumulationen im Plasma, die bereits makroskopisch bei der Probengewinnung durch starke Trübung des Plasmas ersichtlich sind. Der Vergleich zwischen zwei verschiedenen Mausgruppen, übereinstimmend in Geschlecht (♀) und Fütterungs- (RCD) bzw. Fastenzustand (4h) zeigt eine deutliche Steigerung der TG-Absorption im Plasma, sowohl in WT als auch CGI-58 iKO Mäusen nach Tyloxapol-Injektion (500 mg/kg Körpergewicht). So finden sich beispielsweise 300 Min. nach Startzeitpunkt in den unbehandelten CGI-58 iKO-Versuchstieren 3% des gavagierten ³H-Trioleats im Plasma, während zum gleichen Zeitpunkt bereits 11% des Substrats im Plasma der Tyloxapol-behandelten KO-Mäuse zirkulieren (*Abb.33*). In Abbildung 34 findet sich eine Gegenüberstellung der TG-Aufnahme ins Plasma ohne und mit Tyloxapol-Injektion, um diesen Einfluss einer LPL-Inhibierung zu verdeutlichen (*Abb.34*).

Reduzierte hepatische TG-Aufnahme nach Tyloxapol-Injektion in WT und CGI-58 iKO Tieren (♀)

Eine reduzierte hepatische TG-Absorption bestätigt den erwarteten Effekt von Tyloxapol, der durch Inhibierung der LPL und somit verminderter peripherer Lipolyse in Lipidakkumulationen im Plasma und verminderter Lipidabgabe an die peripheren Gewebe resultiert. Durch LPL-Inhibierung entstehen kaum CM-Remnants, die von den Hepatozyten aufgenommen werden können, was sich ebenfalls in einer leicht verminderten TG-Absorption der Leber nach Tyloxapol-Injektion widerspiegelt (WT: 2%; WT+Tyloxapol: 0%) (*Abb.33*). In beiden Genotypen kann dies beobachtet werden, wie in Graphik 35 verdeutlicht wird. Die Ergebnisse dieser Gegenüberstellung sollten jedoch nicht als sehr aussagekräftig angesehen werden, da zwei unterschiedliche Kohorten mit unterschiedlichem Substrat verwendet wurden (*Abb.35A*).

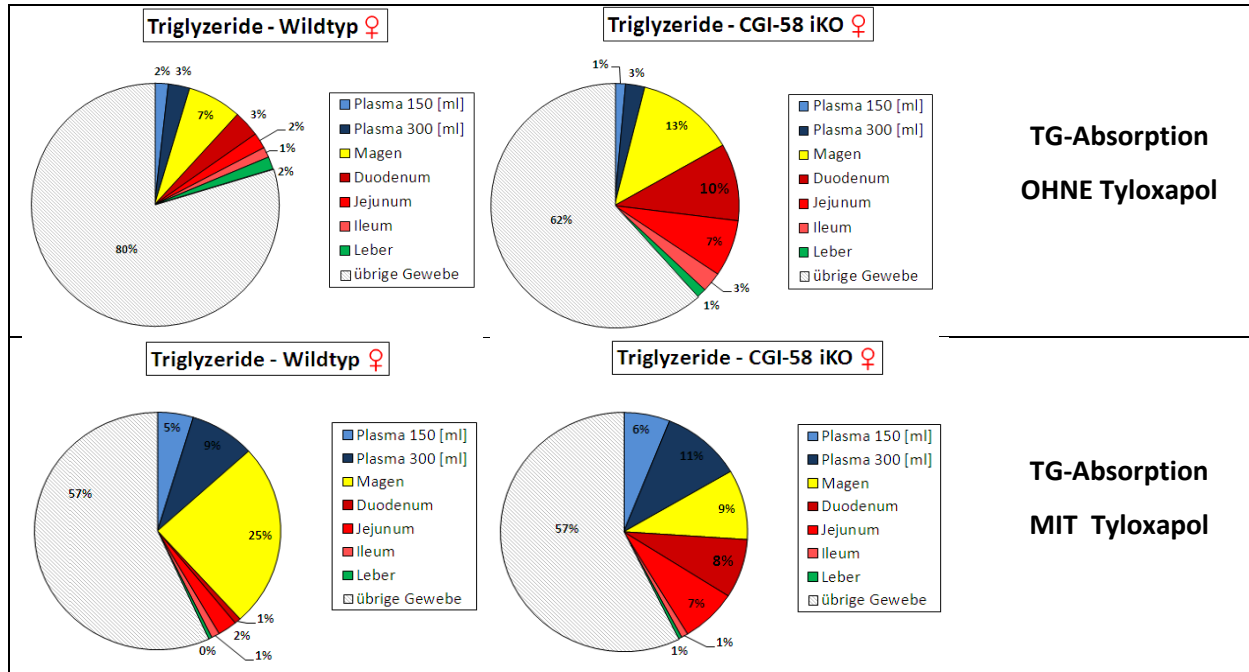


Abb. 33: Unterschiedliche TG-Absorption durch Tyloxapol-Injektion (RCD, ♀).

Durch Hemmung der LPL-Aktivität via Tyloxapol-Injektion akkumulieren TGs der Nahrung vermehrt im Plasma der WT als auch CGI-58 iKO-Mäuse, verglichen mit unbehandelten Versuchsmäusen. Ohne Tyloxapol: WT n=5, iKO n=3, mit Tyloxapol: WT n=6, iKO n=5.

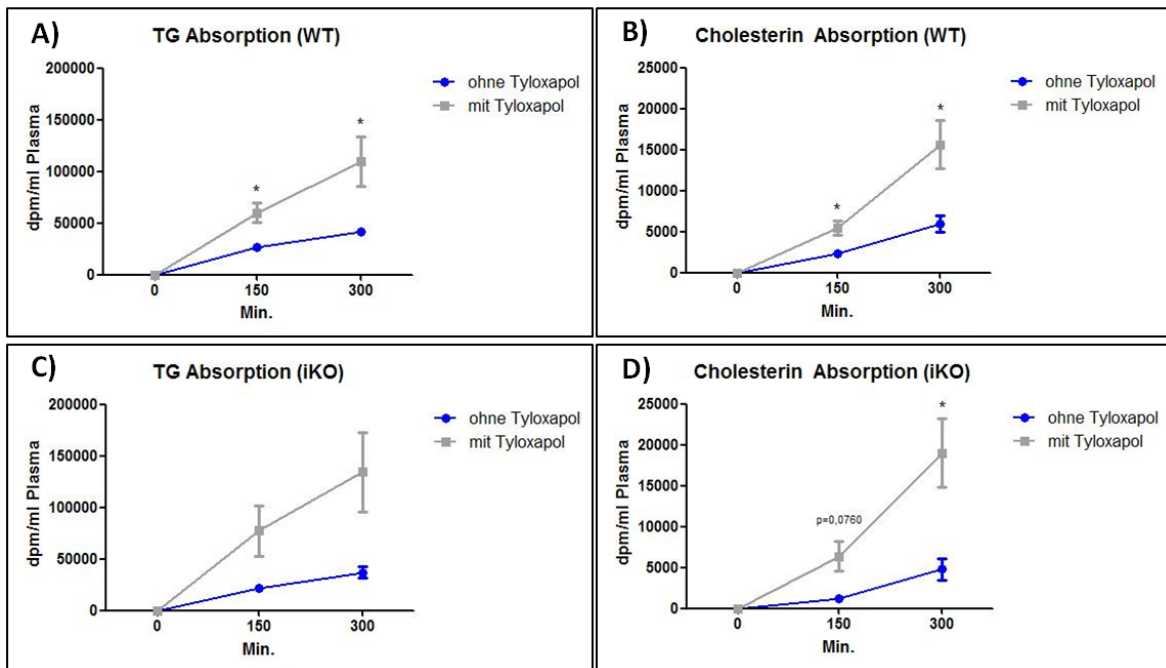


Abb. 34: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption im Plasma ohne und mit Tyloxapol-Injektion (RCD, ♀).

Sowohl in den WT (A,B), als auch den CGI-58 iKO (C,D) Versuchstieren findet sich eine deutliche Lipidakkumulation im Plasma nach Injektion des LPL-Inhibitors Tyloxapol, wobei der Effekt in den WT Tieren ausgeprägter ist. Ohne Tyloxapol: WT n=5, iKO n=3, mit Tyloxapol: WT n=6, iKO n=5. * p<0,05.

Reduzierte Cholesterin-Absorption nach Tyloxapol-Injektion in WT und CGI-58 iKO Mäusen (♀)

Wie auch bei der TG-Absorption findet sich durch Tyloxapol eine signifikante Cholesterinakkumulation in der Blutzirkulation beider Genotypen (*Abb.34*). Eine Tyloxapol-Injektion bewirkt in beiden Genotypen – ähnlich der TG-Absorption – eine verminderte Aufnahme von Cholesterin in die Leber (*Abb.35B*). Der Hauptanteil an Radioaktivität des gavagierten Cholesterin-Substrats findet sich sowohl bei WT als auch CGI-58 iKO Mäusen im Magen und teilt sich anschließend weiter auf alle drei Darmabschnitte auf (*Abb.36*). Diese Daten sind ebenfalls mit Vorsicht zu genießen und nur als Hinweise für die Auswirkungen einer LPL-Inhibierung zu betrachten, da zwei unterschiedliche Kohorten mit verschiedenen radioaktiven Substraten (unterschiedliche cpm) verwendet wurden.

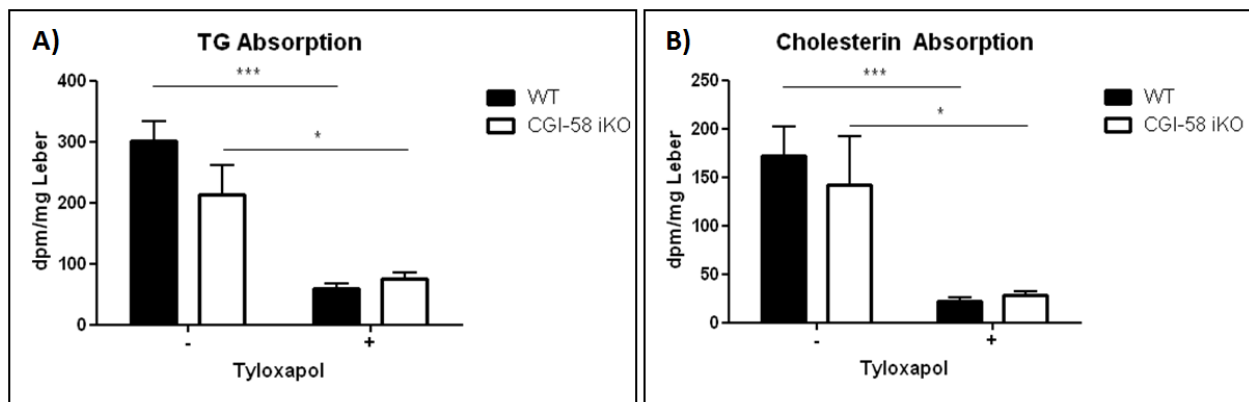


Abb. 35: Tyloxapol-Effekt auf hepatische Lipidabsorption (RCD, ♀).

Eine deutliche Reduktion der hepatischen TG- (A) und Cholesterinaufnahme (B) durch Tyloxapol-Behandlung findet sich in beiden Genotypen, während die WT Mäuse eine stärkere Reduktion in der Lipidabsorption aufweisen. Ohne Tyloxapol(-): WT n=5, iKO n=3, mit Tyloxapol(+): WT n=6, iKO n=5. *** $p \leq 0,001$; * $p < 0,05$.

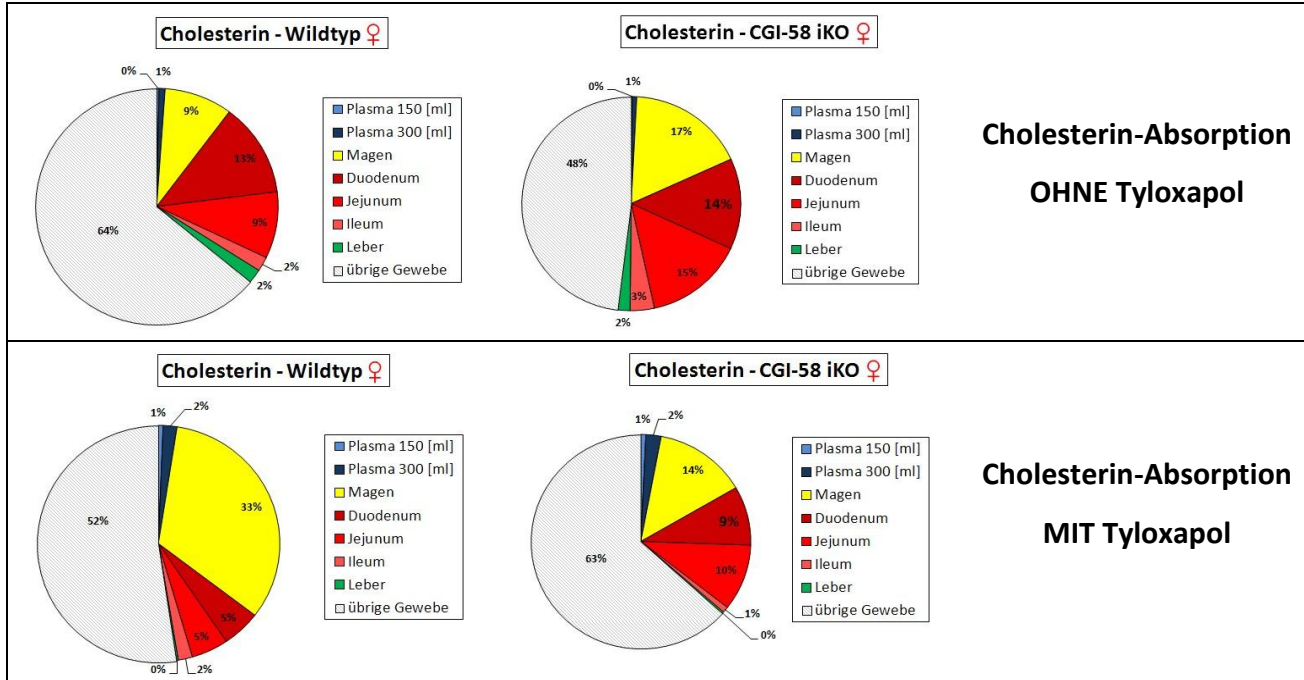


Abb. 36: Cholesterin-Absorption bei unbehandelten und Tyloxapol-behandelten Tieren (RCD, ♀).

Durch Hemmung der LPL-Aktivität via Tyloxapol-Injektion akkumulieren neben TGs der Nahrung auch vermehrt Cholesterin im Plasma der WT- als auch CGI-58 iKO-Mäuse, verglichen mit unbehandelten Versuchsmäusen.

Ohne Tyloxapol: WT n=5, iKO n=3, mit Tyloxapol: WT n=6, iKO n=5.

Gesteigerte Lipidabsorption im Plasma von CGI-58 iKO Mäusen nach Tyloxapol-Injektion (♀)

Während bei den weiblichen Versuchstieren ohne Tyloxapol-Injektion eine Steigerung der TG- als auch Cholesterinabsorption im Plasma der WT- gegenüber der CGI-58 iKO Tiere beobachtet werden konnte, so findet sich konträr dazu nach Tyloxapol-Injektion ein Trend zu gesteigerter Lipidabsorption bei den iKO-Tieren gegenüber ihren WT- Artgenossen (Abb.37).

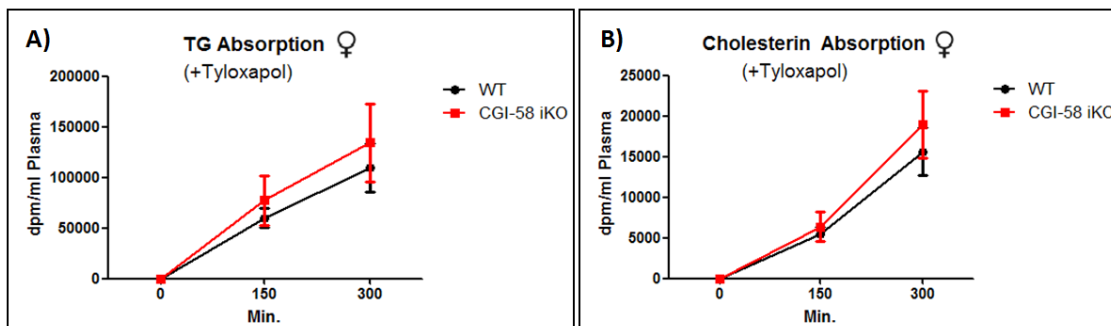


Abb. 37: TG- und Cholesterinabsorption nach Tyloxapol-Behandlung (RCD, ♀).

Beide Genotypen zeigen einen signifikanten Anstieg der Plasmalipidkonzentrationen von TG (A) und Cholesterin (B) innerhalb von 150 Min. bis 300 Min.. WT- und CGI-58 iKO-Mäuse zeigen in beiden Fällen ein ähnliches Muster, während CGI-58 iKO Mäuse einen Trend hin zu gesteigerten Lipidabsorptionen verglichen mit den WT-Mäusen zeigen. WT n=6, iKO n=5.

CGI-58 iKO resultiert bei Tyloxapol-Injektion in gesteigerter intestinaler TG-Absorption (♀)

Während sich ohne Tyloxapol-Injektion im gesamten Gastrointestinaltrakt bei CGI-58 iKO eine gesteigerte TG-Absorption findet, so zeigt sich nach Injektion des LPL-Inhibitors einzig in Duodenum und Jejunum eine erhöhte TG-Aufnahme. Weiters lässt sich eine Tendenz hin zu gesteigerter gastrischer und verminderter hepatischer TG-Absorption in den WT-Mäusen beobachten (Abb.38A&C), während dieser Trend ohne Tyloxapol-Injektion in den CGI-58 iKO Tieren zu finden ist.

Verminderte Magenentleerung von Cholesterin in WT-Mäusen (♀)

Ebenfalls konträr zu den Daten der Absorptionsstudie ohne Tyloxapol findet sich eine erhöhte gastrische Cholesterin-Retention in den WT-Mäusen, während die hepatische Cholesterinabsorption in beiden Radioaktiv-Studien keine signifikanten Unterschiede aufweist (Abb.38B&C).

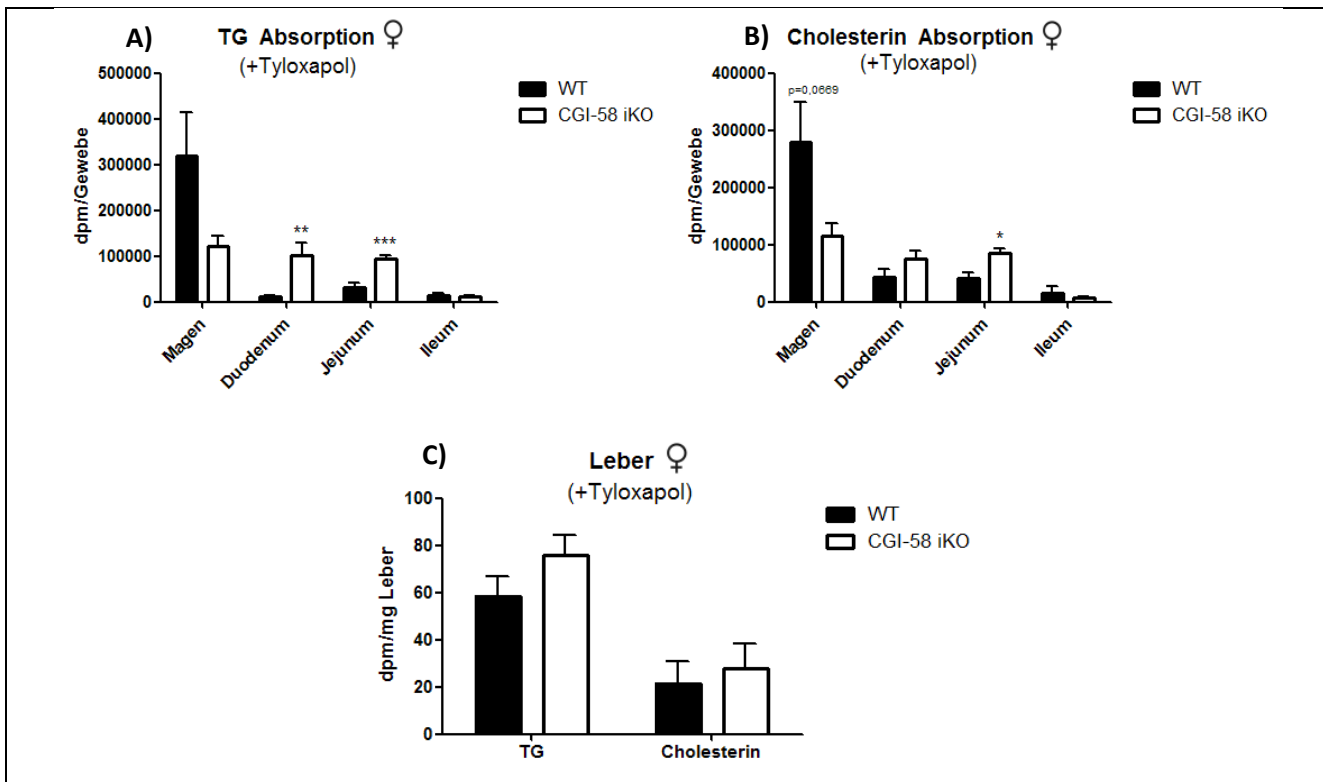


Abb. 38: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption nach Tyloxapol-Injektion (RCD, ♀).

Gegenteilig zu den Daten der ersten Absorptionsstudie ohne Tyloxapol-Injektion findet sich hier in den WT-Versuchstieren eine Tendenz in Richtung gesteigerter gastrischer TG- und Cholesterinabsorption, sowie signifikant erhöhte TG-Absorption einzig in Duodenum und Jejunum der CGI-58 iKO Mäuse. WT n=6, iKO n=5. * p<0,05; ** p<0,01; *** p>0,001.

4.2 Intestinale CGI-58 Defizienz (HF/HCD)

Alle nachfolgenden Experimente wurden in weiblichen Versuchsmäusen auf einer HF/HC-Diät im Alter von ca. 8 Wochen durchgeführt.

4.2.1 Überprüfung des intestinalen CGI-58 Knockouts

Effizienter Knockout von CGI-58 im Intestinum der CGI-58-iKO Mäuse (♀)

Um das erfolgreiche Ausschalten von CGI-58 spezifisch im Darm zu bestätigen, wurden die mRNA-Expressionslevel des Dünndarms (Duodenum, Jejunum, Ileum), sowie der Leber als Kontrolle untersucht. Die mRNA-Expression von CGI-58 im Dünndarm der 4h gefasteten Mäuse ist in den iKO-Versuchstieren im Vergleich zu ihren WT-Artgenossen signifikant vermindert. Allerdings zeigt sich auch in der Leber eine verminderte CGI-58 Genexpression bei CGI-58 iKO (Abb.39), wie sie auch in der über Nacht-gefasteten RCD-Mausgruppe beobachtet werden konnte.

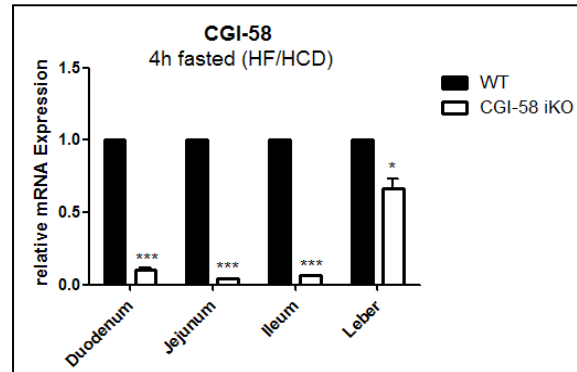


Abb. 39: Überprüfung des CGI-58 Knockouts im Intestinum auf mRNA-Ebene (HF/HCD, ♀).

Der Vergleich der CGI-58-Expression zwischen WT und CGI-58 iKO in den jeweiligen Dünndarm-Abschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum) zeigt einen effizienten darmspezifischen Knockout des Gens. WT n=4, iKO n=4. * p<0,05; *** p≤0,001.

Auch auf Proteinebene konnte ein effizienter Knockout von CGI-58 spezifisch im Darm via Western-Blotting bestätigt werden. Als Kontrollen wurden WAT, sowie jeweils eine WT- und eine CGI-58 KO Kontrolle aus Makrophagen mitgeführt (Abb.40).

Von den Proben wurden je 80 µg Protein aufgetragen, während von den Kontrollen 40 µg (Makrophagen) bzw. 10 µg (WAT) analysiert wurden. Die Auswertung erfolgte wiederum über die Expression der Ladungskontrolle β-Actin.

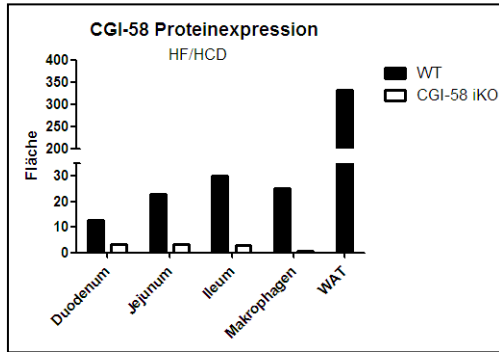
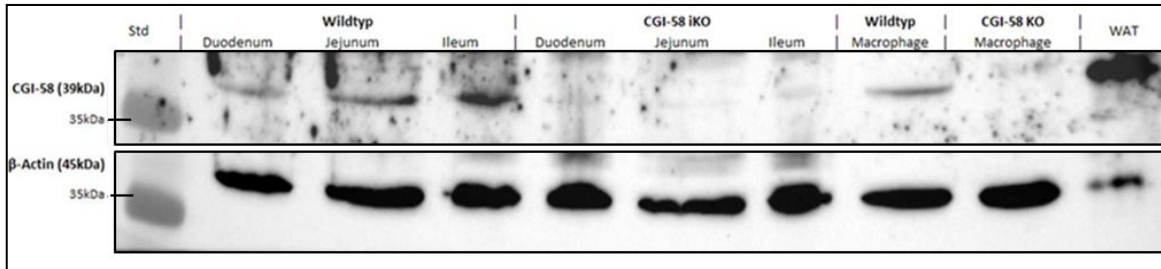


Abb. 40: Überprüfung des CGI-58 iKO auf Protein-Ebene (HF/HCD, ♀).

Der Vergleich von WT- und CGI-58-iKO Mäusen zeigt hinsichtlich der CGI-58-Proteinexpression eine deutliche Reduktion in den iKO-Tieren. Von den Gewebeproben wurden 80 µg Protein aufgetragen. Als Positivkontrolle für CGI-58 diente ein WAT-Lysat, von dem 10 µg Protein auf das Gel geladen wurden. Als weitere Kontrolle wurde eine WT sowie eine CGI-58 KO Probe aus Makrophagen mit einer aufgetragenen Proteinkonzentration von 40 µg mitgeführt. WT-Pools n=8, iKO-Pools n=7.

4.2.2 Lipidakkumulationen im Gewebe bei HF/HCD und intestinaler CGI-58 Defizienz

CGI-58 iKO führt zu gesteigerter intestinaler TG-Akkumulation (♀)

Ähnlich der RCD-Versuchsgruppe findet sich auch bei HF/HCD eine signifikante Steigerung der TGs im Intestinum. Duodenum und Jejunum zeigen eine nahezu idente Steigerung der TGs bei CGI-58 iKO gegenüber dem WT. Die vermessenen Cholesterinkonzentrationen im Gewebe gelten als nicht signifikant, jedoch zeigt sich ein Trend hin zu vermehrter Cholesterinablagerung bei intestinaler CGI-58 Defizienz (Abb.41).

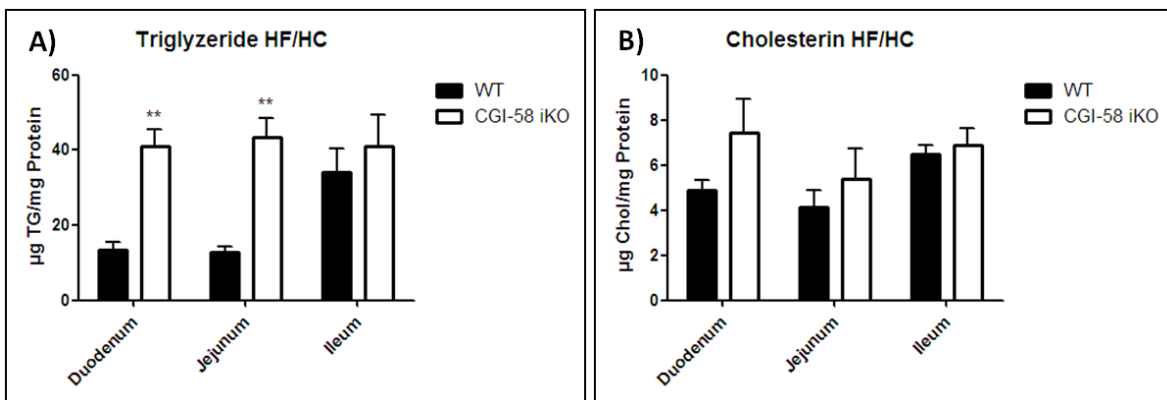


Abb. 41: Intestinaler Lipidgehalt 4h gefastet (HF/HCD, ♀).

Der Vergleich der über einen Zeitraum von 2 Wochen HF/HCD gefütterten Tiere zeigt einen deutlichen Anstieg der TGs in Duodenum und Jejunum bei CGI-58 iKO. Die Cholesterindaten zeigen eine ähnliche Tendenz, gelten jedoch statistisch als nicht signifikant. WT n=4, iKO n=4. ** p<0,01.

CGI-58 iKO führt zu LD-Akkumulation im Jejunum (♀)

Wie bereits bei den RCD-gefütterten Mäusen zu beobachten war findet sich auch auf HF/HCD eine vermehrte Ansammlung an LDs bei CGI-58 iKO. Allerdings finden sich bei fetthaltiger Ernährung auch einige LDs in den WT-Mäusen, allerdings weniger als bei intestinaler CGI-58 Defizienz. Die LDs wurden durch Anfärbung der neutralen Lipide in Kryoschnitten des Jejunums (4h gefastet) via Oil-Red-O Färbung visualisiert. Da sich ebenfalls ein Trend zu gesteigerter intestinaler Cholesterinakkumulation zeigt (Abb.38) und der Ölrot-Farbstoff alle neutralen Lipide anfärbt, könnten die ersichtlichen Lipid Tröpfchen nicht nur TG-, sondern auch CE-Ablagerungen reflektieren (Abb.42).

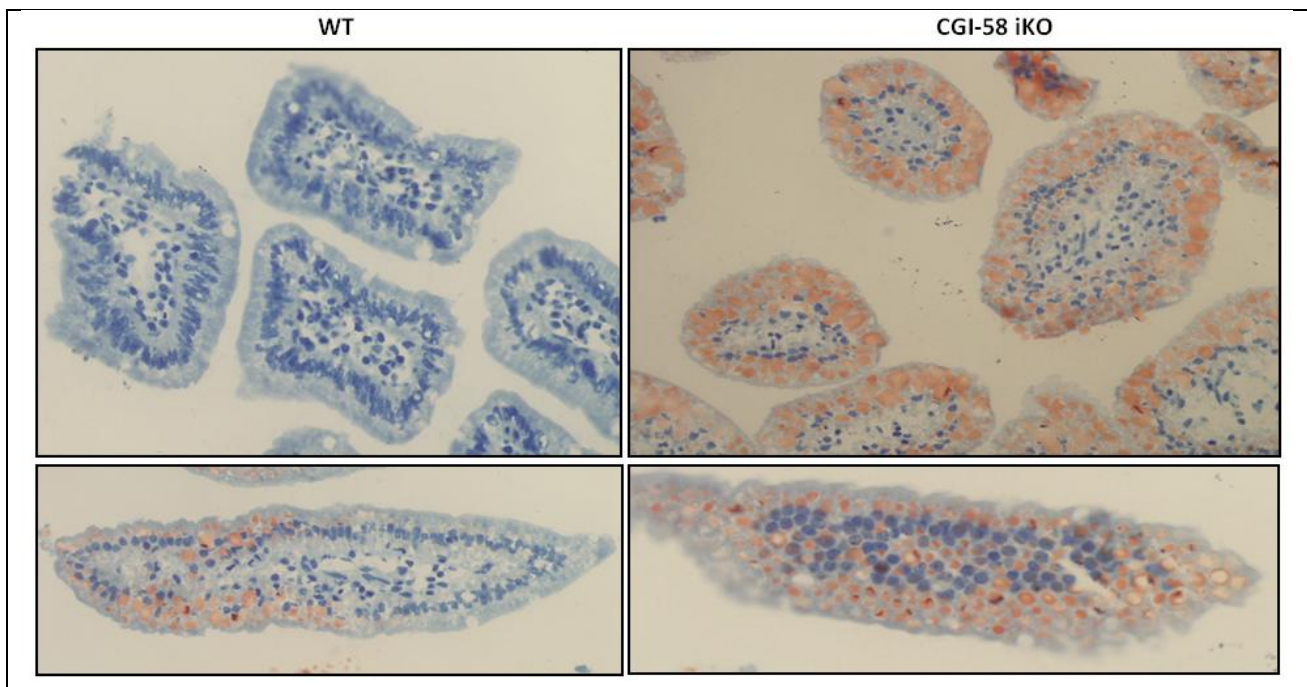


Abb. 42: LD Akkumulation im Jejunum von CGI-58-iKO-Mäusen (RCD, ♀).

Von Kryoschnitten der Jejunum-Gewebeproben wurden mittels Oil-Red-O Färbung die neutralen Lipide visualisiert. Im Vergleich zu den WT-Mäusen (links) findet sich in den CGI-58 iKO Versuchstieren (rechts) eine gesteigerte Akkumulation von Triglyzeriden in Form von LDs, die durch die verwendete histologische Färbung als rote Punkte ersichtlich sind (20-fache Vergrößerung). Auch in den WT-Mäusen zeigen sich vereinzelt LDs bei HF/HCD – dies konnte bei RCD-Mäusen nicht beobachtet werden (repräsentative Abbildung).

4.2.3 Einfluss auf Lipidmetabolismus (Genexpressionsprofil)

Um die Bedeutung von CGI-58 auf den intestinalen Lipidmetabolismus zu untersuchen, wurden dieselben mRNA Expressionen wie in der RCD-Versuchsgruppe via qRT-PCR vermessen.

Zunehmender Trend der *Ppara* Expression bei CGI-58 iKO durch HF/HCD

Die intestinale Expression von *PPAR α* selbst zeigt einen zunehmenden Trend von Duodenum nach Ileum bei CGI-58 iKO Tieren, wobei die gesteigerte mRNA-Expression im Ileum bereits als statistisch signifikant gilt (Abb.43). Interessanterweise findet sich in der RCD-Versuchsgruppe eine konträre Tendenz der *Ppara*-Expression, wobei im Duodenum die höchste und im Ileum die niedrigste Genexpression zu finden ist (Abb.23).

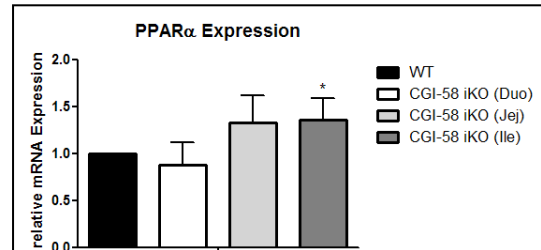


Abb. 43: *Ppara* mRNA Expression (HF/HCD, ♀).

Gegenteilig zu den RCD-Versuchstieren findet sich bei HF/HCD eine Steigerung der Expression von Duodenum nach Ileum. WT n=4, iKO n=4. * p<0,05.

Verminderte *GOS2* mRNA Expression bei HF/HCD-gefütterten CGI-58 iKO Mäusen (♀)

Anders als in der RCD-Versuchsgruppe findet sich auf HF/HC-Ernährung keine Reduktion von Genen der Lipolyse. So zeigen sich in Jejunum und Ileum eine Steigerung der *Atgl*-Expression, sowie eine signifikant verminderte jejunale Expression des ATGL-Inhibitors *GOS2*. Während die durch intestinale CGI-58 Defizienz auch die hepatische CGI-58 mRNA-Expression vermindert wird, so findet sich kein Einfluss auf die zusätzlich untersuchten LD-assoziierten Proteine ATGL und *GOS2* in der Leber (Abb.44A).

Verminderte Expression von Genen der Lipidsynthese bei CGI-58 iKO (♀)

Während *Scd-1* eine deutlich erhöhte mRNA-Expression im Duodenum der CGI-58 defizienten Tiere aufweist, so lässt sich gleichzeitig eine signifikant verminderte Expression der Lipogenesemarker *Acc* und *Fas* beobachten, sowie ein Trend Richtung reduzierter *Dgat2*-Expression (Abb.44B).

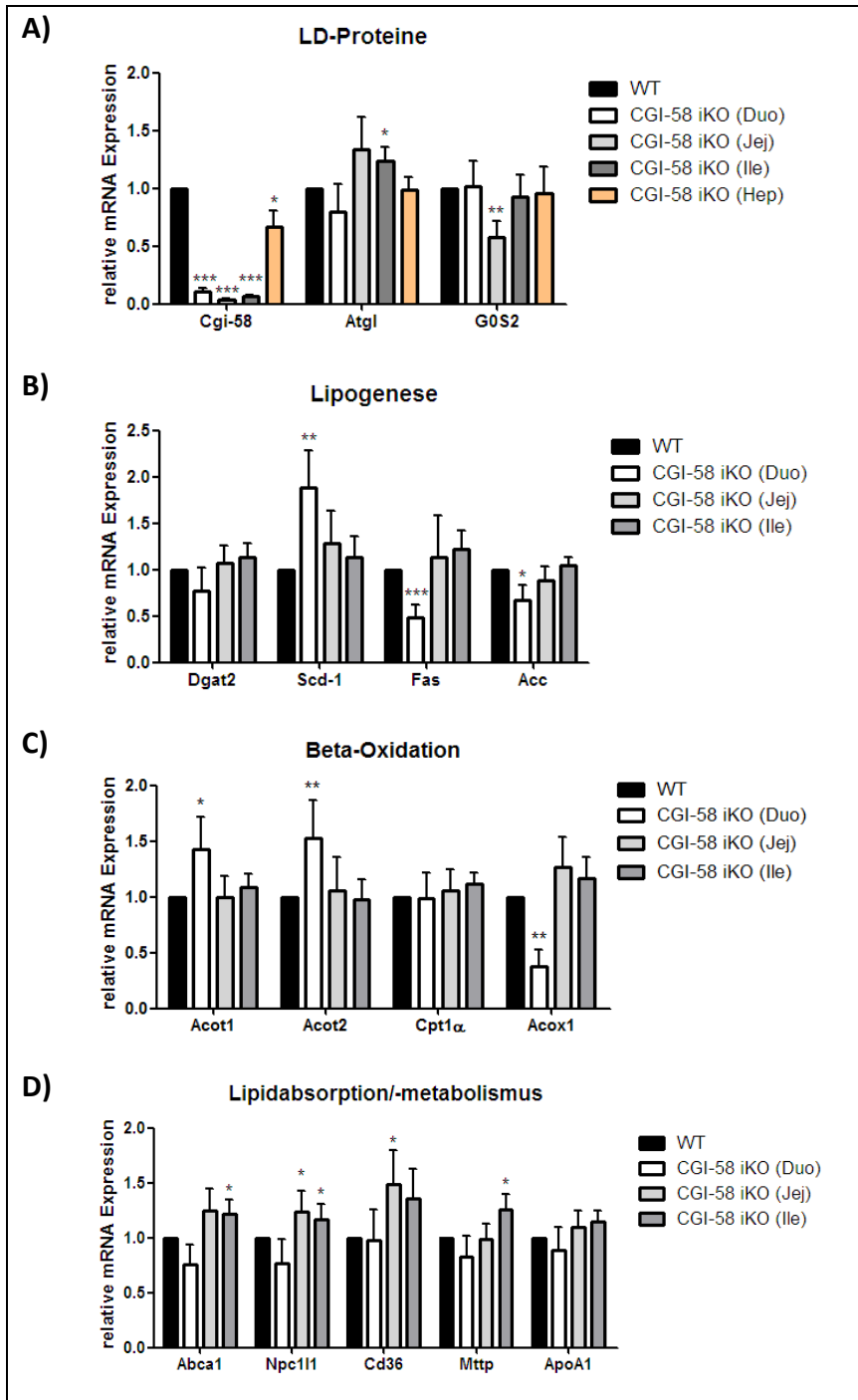


Abb. 44: Genexpression Lipid-metabolismus (HF/HCD, ♀).

Untersucht wurden PPAR α -Zielgene, die eine Rolle im intestinalen Lipidmetabolismus spielen, wie Lipolyse (A), Lipogenese (B) und β -Oxidation (C), sowie Lipidabsorption (D). Alle Daten wurden auf CyclophilinA als Referenzgen normalisiert.

WT n=4, iKO n=4.

* p>0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001.

CGI-58 iKO erhöht Expression von Lipidabsorption-assoziierten Genen (♀)

Die Expression von *Acot1*, einem Marker der mitochondrialen β -Oxidation, sowie *Acot2*, das an der Hydrolyse von Acyl-CoA in freie FS und CoASH beteiligt ist, zeigt eine signifikante Erhöhung im Duodenum der CGI-58 iKO Mäuse. Währenddessen findet sich eine deutliche Verminderung der *Acox1*-Genexpression, dessen Proteinprodukt den ersten Schritt der peroxisomalen β -Oxidation katalysiert. Der zweite mitochondriale Marker *Cpt1 α* zeigt keinerlei signifikante Veränderungen zwischen WT und CGI-58 iKO Tieren (*Abb.44C*). Der Zusammenhang zwischen *Acot* und *Acox* liegt darin, dass FS-Substrate während der β -Oxidation eine kovalente Bindung zu CoASH benötigen, sodass die *Acot*-Expression während der β -Oxidation meist erhöht ist. [107] Aufgrund dieser Daten lässt sich keine Aussage bezüglich des Einflusses eines CGI-58 iKO auf die β -Oxidation treffen.

Wie in Abbildung 44D ersichtlich, finden sich bei CGI-58 Defizienz Hinweise auf eine Steigerung der intestinalen Lipidabsorption. Die Erhöhung von CD36 besonders im Jejunum der CGI-58 iKO Tiere weist auf vermehrte apikale Absorption von freiem Cholesterin und freien FS hin, während Mttp durch Assoziierung der TGs bzw. CEs mit ApoB-48 als wichtiger Faktor der CM-Synthese nur im Ileum der CGI-58 defizienten Tiere eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression zeigt.

Des Weiteren findet sich in Jejunum und Ileum eine zunehmende Expression der Cholesterintransporter *Abca1* und *Npc1l1* bei intestinaler CGI-58 Defizienz, was eine vermehrte Cholesterinabsorption indiziert (*Abb.44D*).

Intestinale CGI-58 Defizienz führt bei HF/HCD zu oxidativen Stress (♀)

Während die Expression von *Gstk1* keine signifikanten Unterschiede bei CGI-58 iKO aufweist, so zeigt sich eine verstärkte *Gstm3*-Expression in Jejunum und Ileum (*Abb.45*).

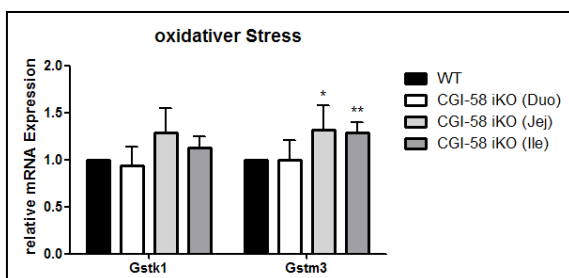


Abb. 45: Oxidativer Stress bei CGI-58 iKO (HF/HCD, ♀).

Während auf RCD keinerlei Unterschiede hinsichtlich oxidativem Stress zu beobachten waren, so findet sich auf HF/HCD eine signifikante Steigerung der *Gstm3*-Expression. WT n=4, iKO n=4. * p<0,05; ** p<0,01.

Unveränderte *Pdk4* mRNA Expression in CGI-58 iKO Mäusen von Duodenum nach Ileum (♀)

Die beobachteten Expressionen für *Pdk4* gelten zwar statistisch als nicht signifikant, zeigen aber einen leichten Trend in Richtung gesteigerter Expression von Duodenum nach Ileum bei intestinaler CGI-58 Defizienz (Abb.46).

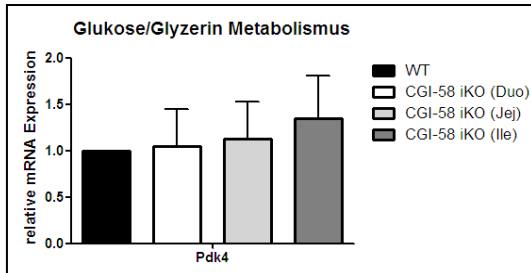


Abb. 46: *Pdk4*-Expression bei CGI-58 iKO (HF/HCD, ♀).

Das intestinale mRNA-Profil von *Pdk4* zeigt von Duodenum nach Ileum eine zunehmende Tendenz. WT n=4, iKO n=4.

4.2.4 Intestinale CGI-58 Defizienz und ATGL-Expression bei HF/HCD

CGI-58 iKO führt bei HF/HCD zu gesteigerter *Atgl*-Genexpression in Jejunum und Ileum (♀)

Während sich bei RCD-Fütterung bei intestinalem CGI-58 KO eine signifikant verminderte mRNA-Expression von *Atgl* im Jejunum zeigt, so findet sich bei HF/HCD einzig in Duodenum ein Trend Richtung verminderter Expression. In Jejunum und Ileum findet sich eine erhöhte *Atgl*-Expression bei CGI-58 iKO verglichen mit der WT-Mausgruppe (siehe Abb.44).

Verminderte ATGL-Proteinexpression bei CGI-58 iKO in Jejunum und Ileum (♀)

Konträr zur mRNA-Expression von *Atgl* findet sich im Duodenum der CGI-58 iKO Mäuse eine leichte Erhöhung der ATGL-Expression auf Proteinebene, während in Jejunum und Ileum bei CGI-58 iKO eine verminderte Expression des ATGL-Proteins zu beobachten ist (Abb.47). Da die Daten der RT-PCR aufgrund ihrer nur minimalen Erhöhung der Expression um das 1.2-fache als nicht aussagekräftig gelten, liegt der Schluss nahe, dass CGI-58 iKO keinen Einfluss auf die Expression der *Atgl* hat. Ob die Aktivität des Enzyms beeinflusst wird, muss via ATGL-Aktivitätsassay abgeklärt werden.

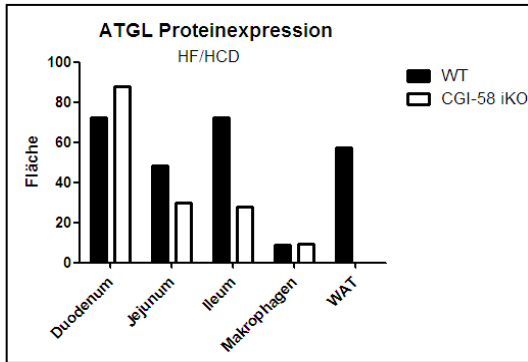
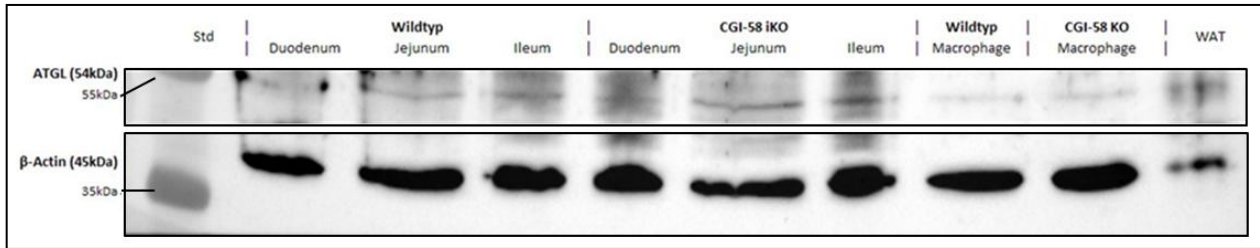


Abb. 47: ATGL-Proteinexpression (HF/HCD, ♀).

Untersucht wurde die ATGL-Proteinexpression bei CGI-58 iKO, sowie die beta-Actin-Expression als Referenz (oben). Aufgetragen wurden 80 µg Protein der gepoolten Darmproben, sowie je 40 µg der Makrophagenkontrollen und 10 µg Protein eines WAT-Lysats. Durch Normalisierung der Daten auf das Referenzprotein zeigt sich eine leichte Verminderung der ATGL-Expression im Ileum, während in den anderen untersuchten Geweben kaum ein Unterschied zu beobachten ist. WT-Pools n=4, iKO-Pools n=4.

4.2.5 Plasmaparameter und Plasmalipoproteine

Unveränderte Plasmalipidkonzentrationen bei CGI-58 iKO (♀)

Ähnlich der RCD-Versuchsgruppe findet sich auch nach 2-wöchiger HF/HC-Ernährung kein signifikanter Unterschied bezüglich der Plasmalipidkonzentrationen. Einzig in den TG- und FFS-Plasmawerten zeigt sich ein Trend in Richtung gesteigerter TG-Akkumulation bei CGI-58 iKO in HF/HCD Versuchstieren (Abb.48).

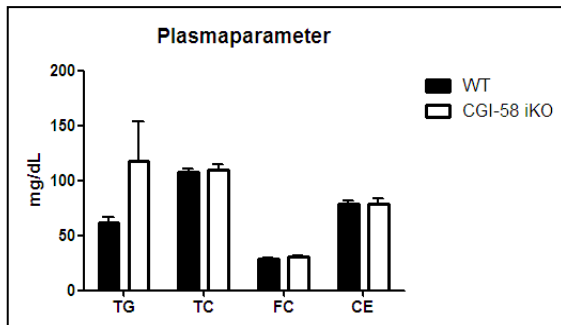
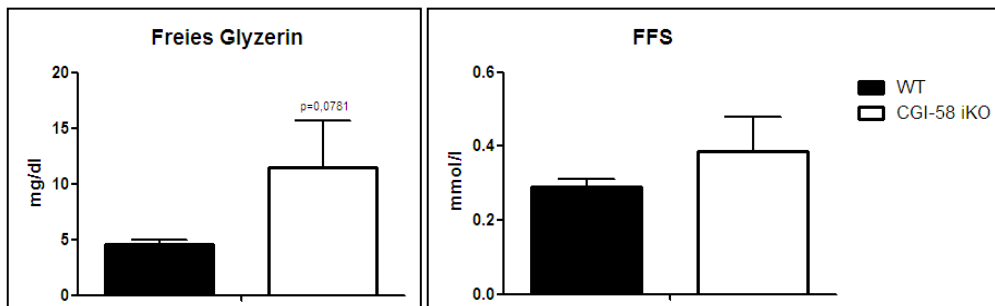


Abb. 48: Plasmaparameter, 4h gefastet (HF/HCD, ♀).

Zwischen WT- und CGI-58 iKO Mäusen findet sich bei HF/HCD kein signifikanter Unterschied bezüglich der Plasmawerte an Triglyzeriden (TG), totalem Cholesterin (TC), freiem Cholesterin (FC), Cholesterinestern (CE) oder freien Fettsäuren (FFS). WT n=8, iKO n=7.



Weiters findet sich auch eine Tendenz hin zu vermehrtem freiem Glycerin in den CGI-58 defizienten Tieren auf HF/HC-Diät, was sich mit den Lipoproteinprofilen nach FPLC-Auftrennung (s.u.) deckt. Die dargestellten TG-Gehalte ergeben sich aus der Differenz gemessener TG-Konzentrationen und dem Gehalt an FG.

Hauptanteil der TGs liegt bei HF/HC-Ernährung in beiden Genotypen als freies Glycerin vor (♀)

Übereinstimmend mit den Daten der enzymatischen Bestimmung von freiem Glycerin im Plasma zeigt die FPLC-Analyse, dass bei intestinaler CGI-58 Defizienz auf HF/HC-Diät mehr TGs als freies Glycerin vorliegen, als in den WT-Versuchstieren. Der Hauptanteil der TGs findet sich in beiden Genotypen in Form von freiem Glycerin im Plasma wieder (Abb.49A). Währenddessen zeigen die auf HF/HC-Ernährung gesetzten Tiere bezüglich des totalen Cholesterins eine Ähnliche Verteilung in den Plasmaproteinfraktionen wie die RCD-gefütterte Versuchsgruppe. Hinsichtlich TC findet sich bei CGI-58 iKO kein Unterschied zu WT-Mäusen (Abb.49B).

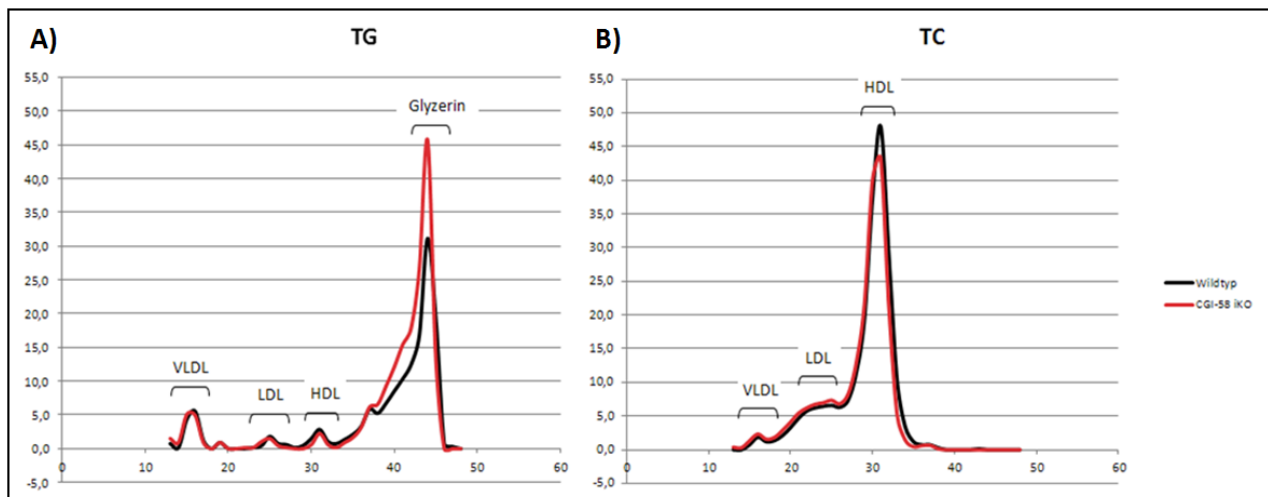


Abb. 49: Lipoproteinprofil, 4h gefastet (HF/HCD, ♀).

Während TC bei HF/HC der Verteilung der RCD-Tiere ähneln, so findet sich bezüglich TGs ein anderes Muster. Auf HF/HC-Diät liegt in beiden Genotypen der Großteil der TGs in Form von freiem Glycerin im Plasma vor. WT n=8, iKO n=7.

4.3 ER-Stress bei intestinaler CGI-58 Defizienz (RCD & HF/HCD)

Da ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Rolle von ER-Stress im intestinalen Lipidstoffwechsel liegt, wurde der Einfluss von CGI-58 iKO auf die Expression ER-Stress assoziierter Gene untersucht.

Verminderte Expression ER-Stress assoziierter Gene in CGI-58 iKO Mäusen bei HF/HCD

Während sich in der RCD-gefütterten Versuchsgruppe keinerlei signifikante Unterschiede bei intestinaler CGI-58 Defizienz zeigen (*Abb.50A*) – weder in Darm noch in der Leber – so findet sich in der HF/HCD Gruppe eine signifikante Verminderung der BiP und CHOP-Expression im Duodenum (*Abb.50B*).

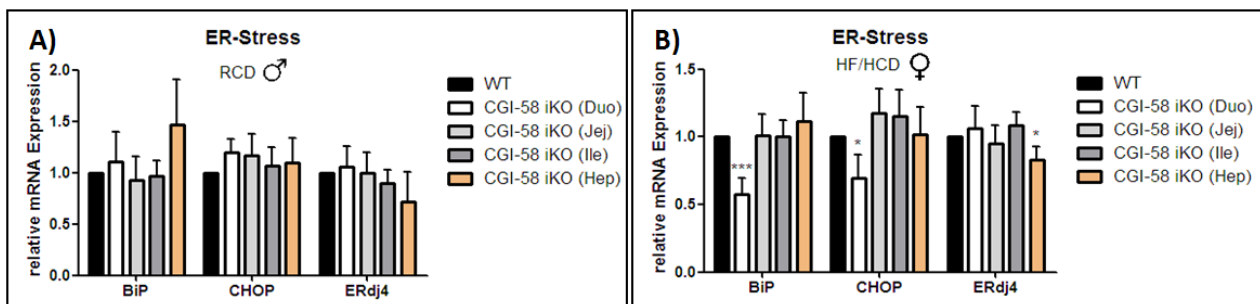


Abb. 50: ER-Stress: WT vs. CGI-58 bei RCD (♂) und HF/HCD (♀).

CGI-58 iKO Mäuse, die einer HF/HCD-Ernährung über einen Zeitraum von 2 Wochen unterzogen wurden, zeigen eine verminderte mRNA-Expression der ER-Stress Marker BiP und CHOP im Duodenum (B), während die RCD-Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich ER-Stress zwischen WT- und CGI-58 iKO aufweist (A). RCD: WT n=3, iKO n=4. HF/HCD: WT n=4, iKO n=4. * p<0,05; *** p<0,001.

Zunehmende Phosphorylierung von eIF2 α bei CGI-58 iKO auf HF/HCD

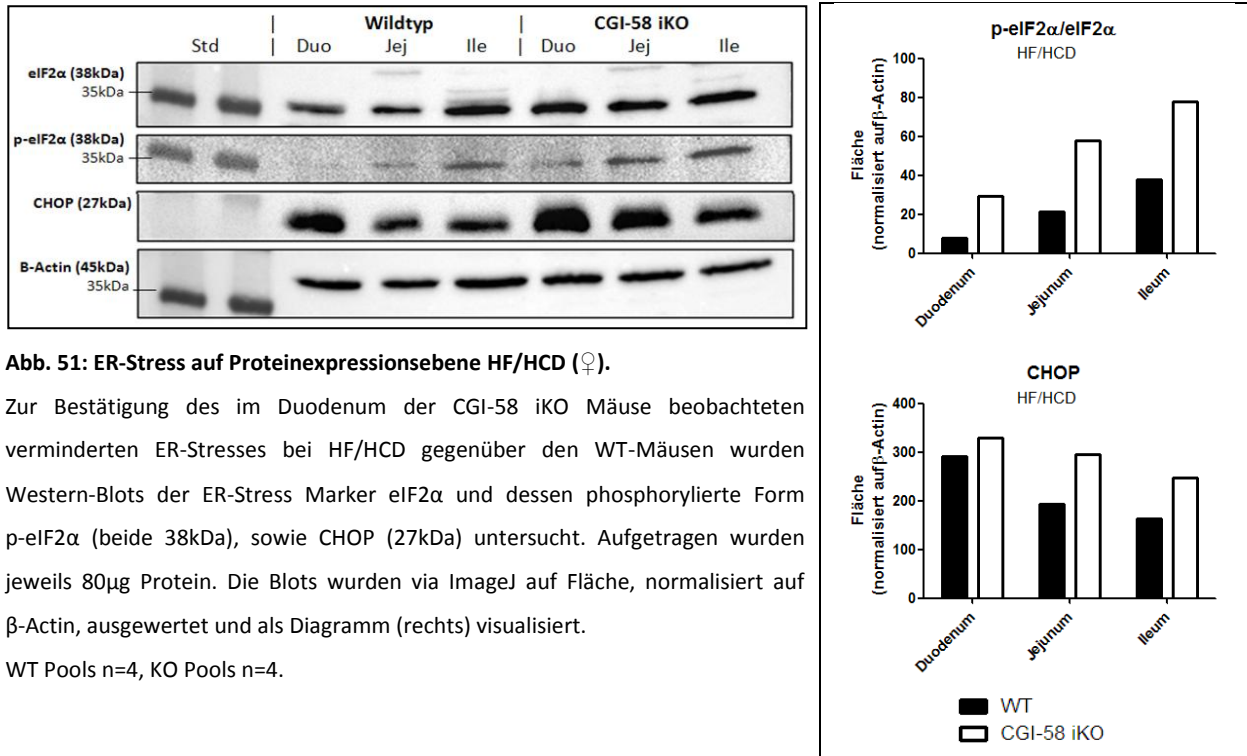
Um diese Beobachtung auch auf Proteinebene bestätigen zu können, wurden weitere ER-Stress Marker in der HF/HCD-Versuchsgruppe via Western-Blot nachgewiesen.

Während bei der eIF2 α -Expression nur leichte Differenzen zwischen WT und CGI-58 iKO zu beobachten sind, so zeigen die CGI-58 iKO Tiere eine deutlich gesteigerte Expression von phosphoryliertem eIF2 α , das bei ER-Stress zu einem temporären Stillstand der Translation führt.

[62] Auch das Verhältnis von phosphoryliertem eIF2 α zu seiner unphosphorylierten Form zeigt eine deutliche Erhöhung bei CGI-58 iKO verglichen mit den WT Versuchstieren (*Abb.51*). Diese Beobachtung ist konträr zu den Erwartungen nach der qRT-PCR.

Leichter Anstieg der CHOP-Proteinexpression bei CGI-58 Defizienz auf HF/HCD

Anhand der mRNA-Expressionsdaten ließ sich eine verminderte CHOP-Expression im Duodenum der CGI-58 iKO Tiere feststellen. Auf Proteinebene zeigt sich jedoch in allen drei Darmabschnitten eine Tendenz hin zu vermehrter CHOP-Expression bei CGI-58 iKO, die im Duodenum allerdings am geringsten ausgeprägt ist (Abb.51).



4.4 ER-Stress im intestinalen Lipidstoffwechsel (WT)

Da ER-Stress und Lipidmetabolismus in engem Zusammenhang stehen, richtet sich ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Rolle von künstlich induziertem ER-Stress spezifisch auf den intestinalen Fettstoffwechsel. Alle nachfolgenden Experimente wurden in 25 Wochen alten männlichen Versuchstieren auf RCD durchgeführt. Für diesen Versuch wurde den Tieren 2x je 1mg/kg Körpergewicht einer TM-Suspension in PBS injiziert – das erste Mal zum Startzeitpunkt, die wiederholte Injektion erfolgte 24h später. Die Mäuse wurden 48h nach Startzeitpunkt durch zervikale Dislokation getötet (48h TM). Die 24h TM Versuchsgruppe erhielt nur 1x eine TM-Injektion und wurde bereits 24h nach Startzeitpunkt getötet.

4.4.1 Tunicamycin als pharmakologischer Induktor für akuten ER-Stress

Intestinaler ER-Stress nur 48h nach TM-Injektion, nicht nach 24h (♂)

Um den ER-Stress induzierenden Effekt von TM zu verifizieren, wurden ER-Stress Marker auf mRNA-Ebene in WT-Versuchsmäusen untersucht. Alle untersuchten Marker zeigten eine signifikante Erhöhung der Genexpression nach 48-stündiger TM-Behandlung, während nach nur 24-stündiger TM-Behandlung ausschließlich in der Leber ER-Stress erfolgreich induziert wurde (Abb.52).

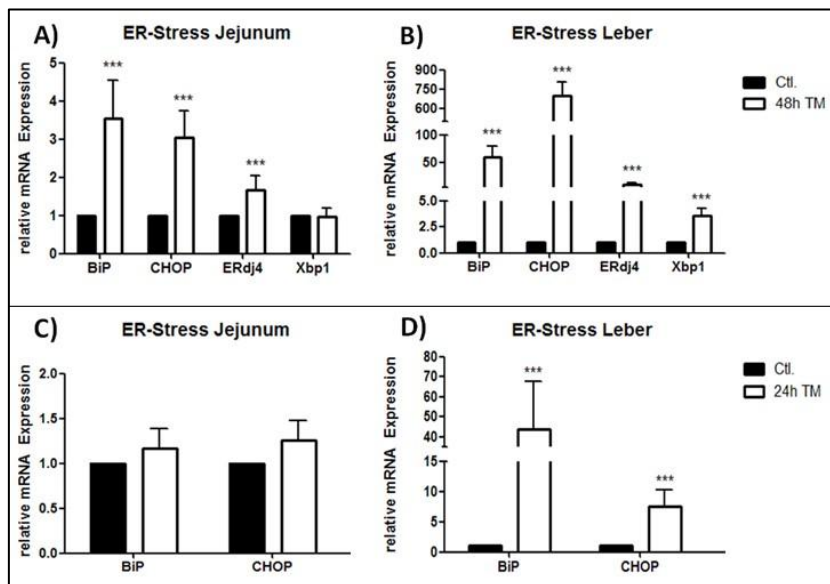
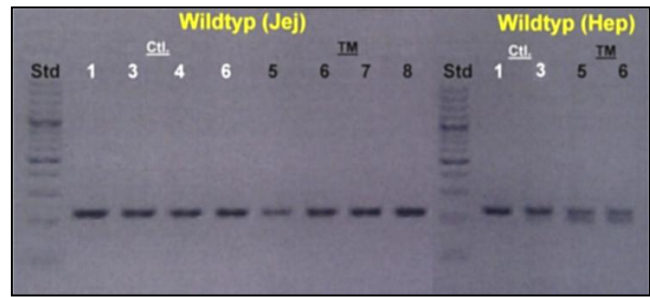


Abb. 52: ER-Stress induzierender Effekt von 48h- und 24h-TM in WT-Mäusen (RCD, ♂).

Zur Überprüfung der Wirkung einer 48h- (A,B) bzw. 24h- (C,D) TM-Behandlung bezüglich ER-Stress wurde das Genexpressionsprofil von ER-Stress Markern in WT-Mäusen untersucht. Es zeigt sich sowohl in Jejunum als auch Leber ein signifikanter Anstieg der ER-Stress Marker bei 48h-TM-Behandlung (A,B), während 24h nach TM-Injektion einzig ein hepatischer ER-Stress zu beobachten ist (C,D). 48h TM: Ctl. n=4, TM n=4. 24h TM: Ctl. n=3, TM n=4. *** p<0,001.

TM-Behandlung resultiert in hepatischem Xbp1-Splicing (♂)

Die erhaltenen mRNA-Expressionsdaten der ER-Stress Marker decken sich mit den Ergebnissen der Xbp1-PCR. Während sich in der Leber nach TM-Behandlung (Abb.53 unten) deutliche Splicingprodukte am Agarosegel nach erfolgter Xbp1-PCR finden, so lässt sich kein Effekt der TM-Behandlung auf intestinales Xbp1-Splicing beobachten. (Abb.53).



Leber

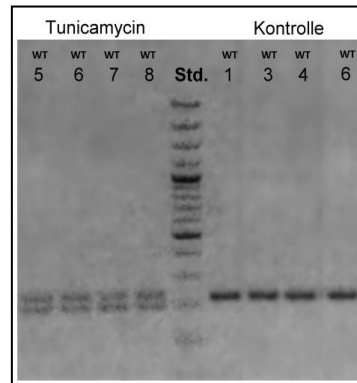


Abb. 53: Xbp1-Splicing in Jejunum und Leber von WT-Mäusen (RCD, ♂).

Das ER-Stress assoziierte Splicing von Xbp1 findet sich einzig in den Leberproben der TM-behandelten Tiere, jedoch nicht im Jejunum.

Tunicamycin zeigt keinen Einfluss auf intestinale CHOP-Proteinexpression (♂)

Während auf mRNA-Ebene eine deutliche Erhöhung der CHOP-Expression bei TM-

Behandlung in WT-Mäusen zu beobachten ist, so zeigt sich auf Proteinebene kein Unterschied zwischen Kontroll- und TM-behandelten Mäusen. Die mitgeführten Kontrollen aus der Leber zeigen hingegen einen deutlichen Unterschied der CHOP-Proteinexpression, wie sie auch anhand der mRNA-Daten zu beobachten war. Deutlich wird hier auch eine gesteigerte CHOP-Expression im Jejunum verglichen zur hepatischen Expression der Kontrollmäuse (Abb.54).

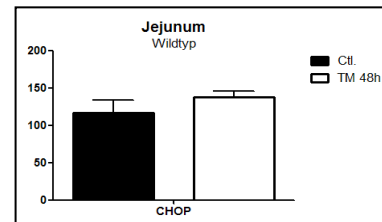
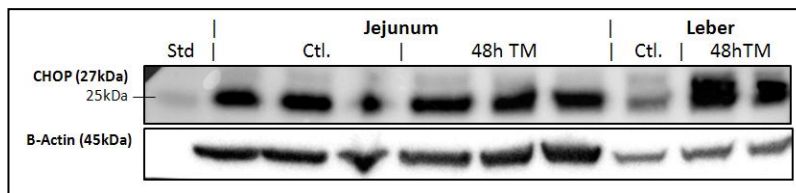


Abb. 54: Proteinexpression CHOP Jejunum – Ctl. Vs. 48h TM (RCD, ♂).

Der Vergleich der Kontroll- und 48h TM-Gruppe zeigt hinsichtlich der CHOP-Proteinexpression keinerlei Unterschiede. In der Leber, die als Kontrolle mitgeführt wurde, findet sich eine deutliche Überexpression von CHOP nach TM-Behandlung. Ctl. n=3, 48h TM n=3.

4.4.2 Auswirkungen von Tunicamycin auf Plasmalipide

TM-Injektion reduziert Plasmacholesterinkonzentration und erhöht FFS-Gehalt (♂)

Während hinsichtlich der Plasmakonzentration der TGs keinerlei signifikante Veränderung ersichtlich wird, so resultiert eine TM-Behandlung in einer Verminderung des totalen Cholesterins in den untersuchten WT-Mäusen. Ebenfalls ist eine Erhöhung der FFS-Konzentration im Plasma nach TM-Injektion zu beobachten (Abb.55).

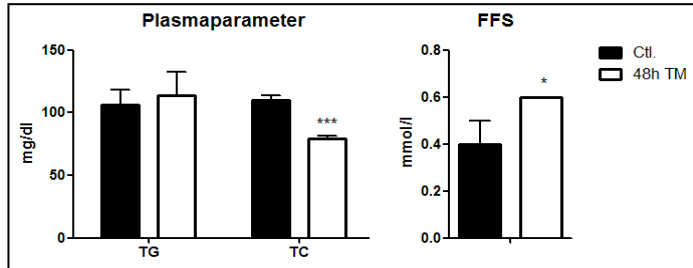


Abb. 55: TM-Wirkung auf Plasmalipidkonzentrationen (RCD, ♂).

Hinsichtlich der TC-Plasmakonzentrationen findet sich eine signifikante Verminderung in den mit TM behandelten Mäusen. Ebenfalls zeigt sich eine Erhöhung der FFS-Konzentration.

Ctl. n=4, 48h TM n=4. * p<0,05; *** p<0,001.

4.4.3 Einfluss von Tunicamycin auf intestinalen und hepatischen Lipidmetabolismus

Gesteigerte hepatische TG-Akkumulation nach 48h TM (♂)

Der Vergleich von Kontroll- und 48h-TM behandelten WT-Mäusen zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der TG-Gehalte in Jejunum, die ähnlich den intestinalen TG-Gehalten nach 24h TM-Behandlung sind. In der Leber hingegen findet sich eine 4-fache Erhöhung der TG-Konzentrationen 48h nach TM-Injektion (Abb.56A).

48h TM-Behandlung resultiert in verminderter intestinaler Cholesterinakkumulation (♂)

Cholesterinakkumulation (♂)

Den Cholesteringehalt betreffend finden sich um etwa 50% reduzierte intestinale Cholesterinkonzentrationen nach 48h TM-Behandlung, die jedoch als statistisch nicht signifikant gelten, während die Leber nicht beeinflusst wird (Abb.56B).

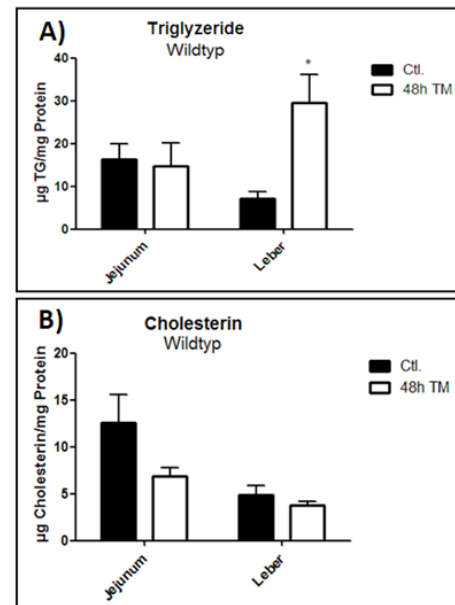


Abb. 56: Effekt einer 48h-TM Behandlung auf Lipidmetabolismus (RCD, ♂).

In der Leber findet sich eine gesteigerte TG-Ablagerung nach Behandlung der WT-Mäuse mit TM, während sich bezüglich Cholesterin eine reduzierte intestinale Akkumulation zeigt. Ctl. n=4, 48h TM n=4. * p<0,05.

24h-TM Behandlung zeigt keine signifikanten Unterschiede bezüglich Lipidakkumulation (♂)

Da die Versuchstiere nach 48h TM-Behandlung sehr geschwächt waren, wurde eine zweite Kohorte mit reinem PBS (Kontrollen) bzw. erneut 1mg/kg Körpergewicht TM injiziert und nach bereits 24h via zervikaler Dislokation getötet (24h TM). Hinsichtlich intestinaler Lipidakkumulationen zeigt sich ein ähnliches intestinales und hepatisches Muster wie nach 48h TM-Behandlung (Abb.57).

Verminderte Expression von Genen der intestinalen Lipidabsorption nach 48h TM (♂)

Anhand des Genexpressionsprofils fanden sich Unterschiede zwischen den 48h und 24h TM-behandelten Versuchsmäusen. Die Analyse von an der Lipidabsorption beteiligten Genen wie *Abca1*, *Npc1l1* und *Mttp* zeigt in untersuchten WT-Mäusen eine signifikant verminderte mRNA-Expression nach 48 TM-Behandlung (Abb.58A). Im Gegensatz dazu weisen die 24h TM-behandelten Versuchsmäuse eine leichte Erhöhung der *Mttp*-Genexpression im Jejunum auf, während die anderen zwei Marker unverändert bleiben (Abb.58B).

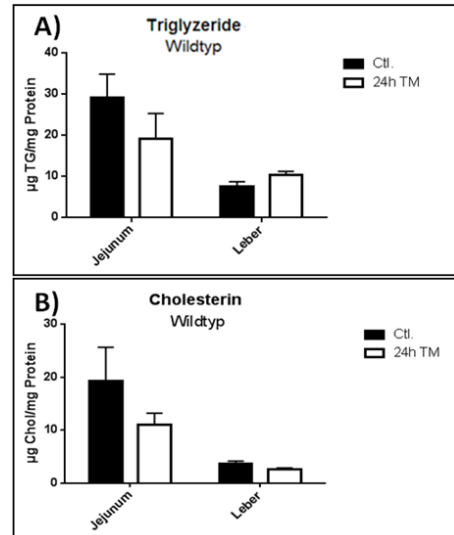


Abb. 57: Auswirkung einer 24h TM-Injektion auf Lipidakkumulationen (RCD, ♂).

Bei WT-Mäusen zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in TG- und Cholesteringehalten in Jejunum und Leber nach 24h-TM Behandlung. Die Ergebnisse der TG- und Cholesterinbestimmung aus dem Darmgewebe (Jejunum) tendieren jedoch in Richtung verminderter Lipidakkumulation bei TM-Behandlung. Ctl. n=3, 24h TM n=4.

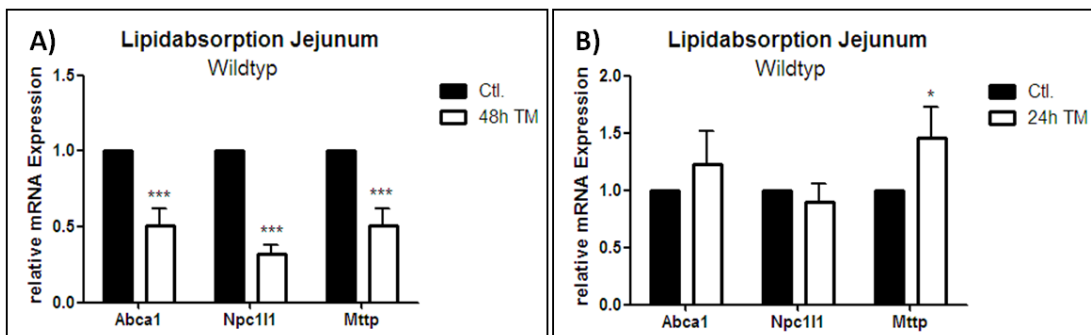


Abb. 58: Intestinale Lipidabsorption bei 48h und 24h TM-Behandlung (RCD, ♂).

Im Vergleich wird deutlich, dass nach TM-Injektion die intestinale Lipidabsorption bei 48h TM-Behandlung signifikant vermindert ist, während in der 24h TM-Versuchsgruppe eine signifikante Erhöhung der *Mttp*-Genexpression zu beobachten ist. Ctl. n=4, 48h TM n=4 – Ctl. n=3, 24h TM n=4. * p<0,05; *** p≤0,01.

4.4.4 Effekt von Tunicamycin auf Lipidabsorption

Um die Auswirkungen eines künstlich induzierten ER-Stresses auf die Absorption von TGs und Cholesterin zu untersuchen, wurde eine weitere Absorptionsstudie durchgeführt. Insgesamt wurden sechs WT-Mäuse verwendet, von denen drei eine i.p.-Injektion von 0,75 mg/kg Körpergewicht TM erhielten.

TM-Behandlung resultiert in verminderter Lipidaufnahme in die Blutzirkulation (♂)

Sowohl TGs, als auch Cholesterin werden nach TM-Behandlung vermindert in den Blutkreislauf abgegeben. Besonders die Plasmakonzentrationen an TGs und Cholesterin 240 Min. nach Gavagieren der radioaktiv markierten Substrate (^3H -Trioleat, ^{14}C -Cholesterin) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und TM-behandelten Mäusen (Abb.59A).

Stark erniedrigte Cholesterinabsorption nach 48h TM Behandlung (♂)

Wie in Abbildung 59 ersichtlich wird, findet sich nach 48h TM-Behandlung im Vergleich zu der Kontrollgruppe so gut wie keine Cholesterinabsorption. Die Plasmakonzentrationen zeigen zu beiden Abnahmezeitpunkten einen Cholesteringehalt nahe Null (Abb.59B).

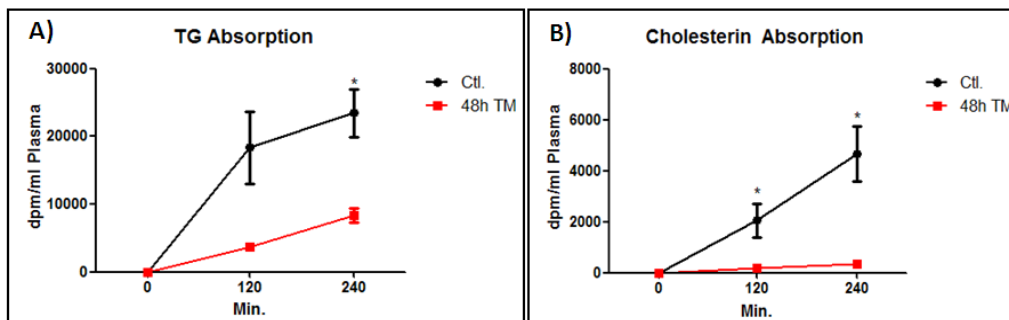


Abb. 59: TG- und Cholesterinabsorption nach TM-Behandlung (RCD, ♂).

TGs und Cholesterin werden nach TM-Behandlung vermindert aufgenommen. Ein besonders deutlicher Unterschied findet sich hinsichtlich der Cholesterinabsorption (B), die zu allen Zeitpunkten nahezu komplett unterdrückt wird. Ctl. n=3, 48h TM n=3. * p<0,05.

Während sich weder in Magen, Intestinum noch Leber ein signifikanter Unterschied bezüglich der TG-Absorption nach TM-Behandlung findet, so zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Cholesterinabsorption sowohl in Magen als auch Duodenum und Jejunum. Einzig Ileum zeigt eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante, Cholesterinabsorption nach TM-Behandlung (Abb.60).

Bezüglich der TG-Absorption finden sich keinerlei statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und TM-behandelten Versuchstieren (Abb.60A). Unterdessen zeigt sich besonders in Jejunum und Leber eine deutliche Reduktion der Cholesterinabsorption nach TM-Injektion (Abb.60B&C).

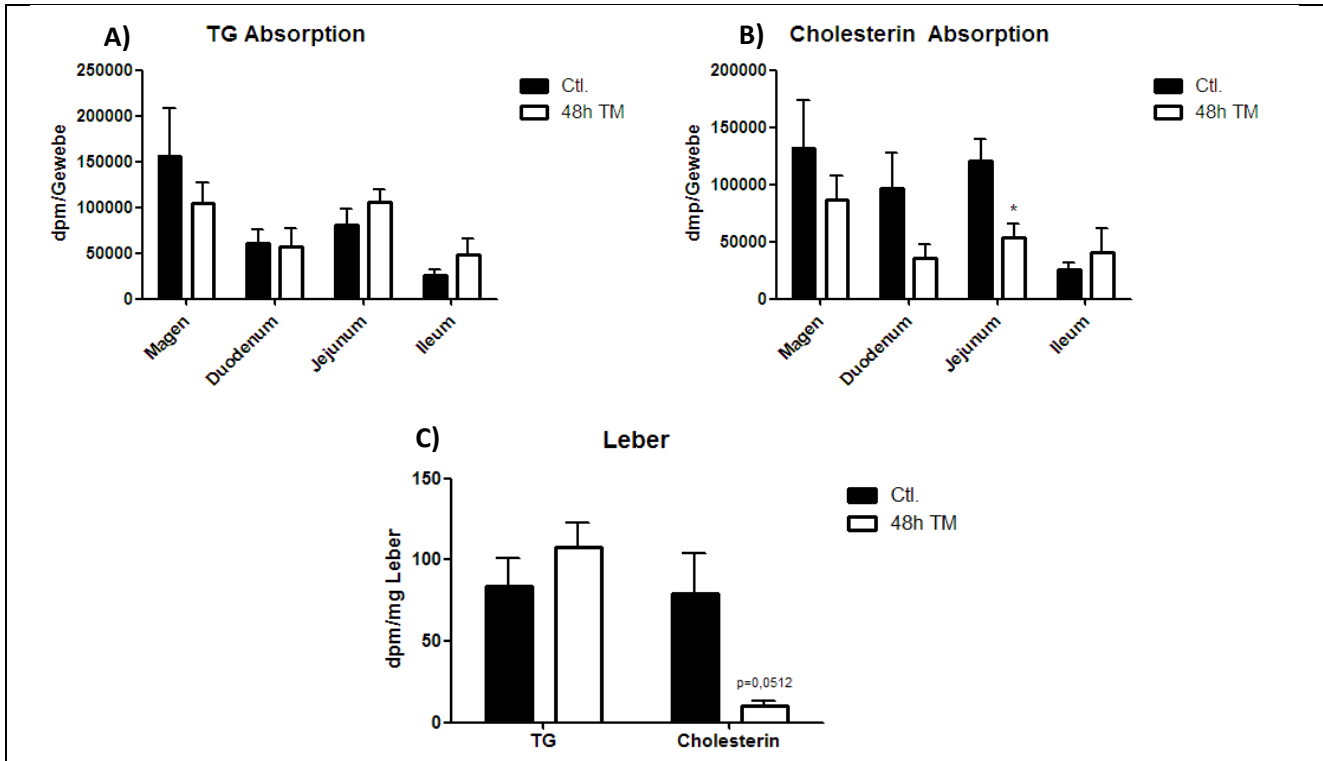


Abb. 60: TG- und Cholesterinabsorption nach TM-Behandlung (RCD, ♂).

Während sich hinsichtlich TG-Absorption keinerlei signifikante Unterschiede bzw. Tendenzen bei TM-Behandlung zeigen, so findet sich in allen Geweben eine deutliche Verringerung der Cholesterinabsorption. Ctl. n=3, 48h TM n=3. * p<0,05.

4.4.5 HF/HCD als physiologischer Induktor für ER-Stress?

Hochkalorische Ernährung führt zu vermindertem intestinalen ER-Stress

Einigen Publikationen zufolge ist ER-Stress stark mit Fettleibigkeit und damit einhergehenden Entzündungsreaktionen assoziiert. Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurde eine Mausgruppe für 4 Wochen auf HF/HC-Ernährung umgestellt.

Insulinsensitive Gewebe wie Leber und Fettgewebe zeigten in vorangegangenen Studien sowohl bei genetischer (*ob/ob* Mäuse), als auch ernährungsbedingter (HF/HCD) Adipositas ER-Stress [80]

(reviewed in [78]). Nach 4 Wochen HF/HC-Diät findet sich in unserer WT-Versuchsgruppe einzig bei ERdj4 eine signifikante Erhöhung der Expression – sowohl in Leber als auch Jejunum. Die ER-Stress Marker BiP und CHOP zeigen hingegen eine deutliche Reduktion in ihrer intestinalen mRNA-Expression (Abb.61).

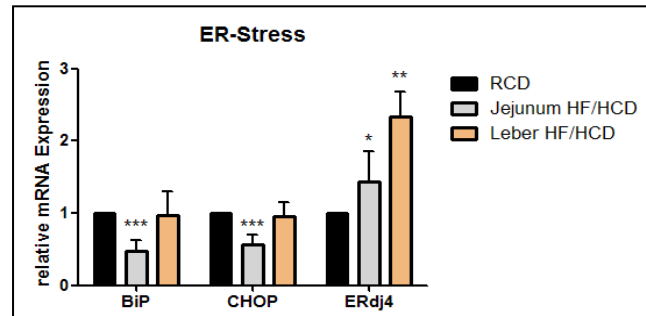


Abb. 61: Einfluss von HF/HCD auf ER-Stress (♂).

Der ER-Stress induzierende Effekt einer 4-wöchigen HF/HC-Ernährung spiegelt sich nur gering wieder, indem einzig ERdj4 sowohl hepatisch als auch intestinal vermehrt exprimiert wird. BiP und CHOP hingegen zeigen eine deutliche Reduktion in ihrer Expression im Jejunum. HF/HCD 4 Wochen n=6, RCD n=4.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von CGI-58 im intestinalen Lipidmetabolismus

TGs aus der Nahrung werden postprandial in Enterozyten vorübergehend als zytosolische LDs gespeichert und dienen als Substrat-Lieferant für die CM-Synthese. Dazu ist eine effiziente TG-Hydrolyse nötig, die durch Lipasen mediiert wird. ATGL katalysiert den initialen Schritt der neutralen Lipolyse. CGI-58, als Cofaktor und Aktivator der ATGL und somit Mediator des initialen Schritts der neutralen Lipolyse, könnte daher eine essentielle Rolle im intestinalen TG-Katabolismus spielen. [53] Frühere Studien konnten zeigen, dass eine komplette CGI-58 Defizienz zu systemischen Akkumulationen neutraler Lipide, insbesondere von TGs (NLSD), führt. Bei der durch Mutationen im CGI-58 Gen hervorgerufenen Krankheit CDS konnte auch ein Ausfall der ATGL-Aktivierung beobachtet werden, was die entscheidende Rolle von CGI-58 hinsichtlich seiner Interaktion mit ATGL hervorhebt. [52] (reviewed in [59])

Da CGI-58 als Coaktivator der ATGL eine entscheidende Rolle im initialen Schritt der neutralen Lipolyse spielt, findet sich in den CGI-58 iKO Tieren eine deutliche intestinale Akkumulation von neutralen Lipiden nach 4-stündiger Nahrungskarenz, sowohl in RCD-, als auch HF/HCD-gefütterten Versuchstieren. Die Analyse der LD-Proteine ATGL und G0S2 sollte weitere Hinweise darauf geben, ob diese beobachteten TG-Akkumulationen tatsächlich auf eine durch CGI-58 iKO hervorgerufene verminderte ATGL-Aktivierung und folglich reduzierte Lipolyse zurückzuführen sind. Yang et al. konnten anhand von *in vitro* Experimenten zeigen, dass für die Inhibierung der ATGL-Aktivität via G0S2 sowohl die hydrophobe Domäne von G0S2, als auch die Patatin-Domäne (Ile10–Leu178) der ATGL nötig sind. [108] Darauf folgende Studien zeigten, dass der N-Terminus des CGI-58 Proteins essentiell für die ATGL-Aktivierung ist. [53] Cornaciu et al. konnten schließlich nachweisen, dass die Interaktionen mit CGI-58 und G0S2 jeweils in einer minimalen Domäne der ATGL stattfinden, die sich an die eigentliche Patatin-Domäne anschließt (Leu178–Leu254). Für die Aktivierung durch CGI-58 sind alle C-terminalen AS-Reste nach Leu254 nicht von Bedeutung, was durch eine Verkürzung des ATGL Proteins an verschiedenen AS-Positionen herausgefunden wurde. So konnten kürzere ATGL Fragmente nicht durch CGI-58 aktiviert werden. Allerdings zeigte sich auch, dass für die Inhibierung der ATGL mittels G0S2 die

ersten 254 AS des ATGL Proteins essentiell sind. **[109]** Aufgrund dieser Beobachtungen könnten die Inhibierung der ATGL via GOS2 und die Aktivierung der ATGL via CGI-58 als eventuell kompetitive und voneinander abhängige Mechanismen angesehen werden. Jedoch wurde anhand eines Coimmunopräzipitationsexperiments beobachtet, dass die An- oder Abwesenheit von CGI-58 keinen Einfluss auf die Interaktion von GOS2 mit dem ATGL Protein hat, was einen kompetitiven Mechanismus von CGI-58 und GOS2 um die ATGL-Bindung ausschließen lässt. **[110]**

Bei der mRNA-Expressionsanalyse von *Atgl* und *GOS2* lässt sich in der RCD-Kohorte bei CGI-58 iKO sowohl eine leichte Herunterregulierung der *Atgl*, als auch eine signifikant erhöhte Genexpression des ATGL-Inhibitors *GOS2* beobachten. Dies lässt einen Effekt des CGI-58 iKO auf den ATGL-Inhibitor *GOS2* vermuten, der in weiterer Folge die *Atgl*-Expression beeinflusst. Eine komplementäre Reaktion, in der CGI-58 iKO direkt auf die *Atgl*-Expression wirkt, könnte die Veränderung der *GOS2*-Expression nicht erklären. Die Annahme, dass ein Fehlen des CGI-58 Proteins zu einer erhöhten Zugänglichkeit der ATGL für *GOS2* führen könnte, was sich möglicherweise in einer Erhöhung der intestinalen *GOS2*-Expression und infolgedessen verminderter *ATGL*-Expression äußern könnte, wurde durch Lu et al. widerlegt. **[110]**

Konträr zu diesen RCD-Daten zeigen HF/HCD Mäuse keinen Hinweis auf verminderte Lipolyse bei intestinal fehlender CGI-58 Expression. Besonders im Jejunum der CGI-58 iKO Tiere findet sich eine Erhöhung der *Atgl* mRNA, sowie eine signifikante Verminderung der *GOS2* mRNA Expression, was eine gesteigerte jejunale Lipolyse bei CGI-58 iKO auf HF/HCD indiziert. Geht man auch in diesem Fall davon aus, dass durch CGI-58 iKO primär die *GOS2*-Expression beeinflusst wird, die sich sekundär auf die *Atgl*-Expression auswirkt, so hätte CGI-58 in der HF/HCD Kohorte eine gegensätzliche Wirkung auf *GOS2*. Da dies unwahrscheinlich ist, liegt eine ernährungsbedingte Ursache dieser veränderten *GOS2*-Expression nahe. Der Vergleich der *Atgl*- und *GOS2*-Expressionen der WT Mäuse zwischen RCD und HF/HCD sollte daher Aufschluss darüber geben, ob dieser Effekt wirklich abhängig von CGI-58 ist oder eher ernährungsbedingt und/oder geschlechterspezifisch beeinflusst wird. Dazu wurden die männlichen RCD-Mäuse mit den weiblichen HF/HCD Versuchstieren verglichen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise findet sich bei hochkalorischer Ernährung in den WT-Mäusen sowohl im Jejunum als auch in der Leber eine Erhöhung der *Atgl*- sowie auch der *GOS2*-Expression. Auch in den KO-Tieren findet

sich eine Erhöhung von *GOS2* im Jejunum der HF/HCD-Mäuse, verglichen mit der RCD-Kohorte. Dies stimmt überein mit der Beobachtung von Yang et al., die eine deutliche Erhöhung der *GOS2*-Proteinexpression auf HFD verglichen mit der RCD-Versuchsgruppe nachweisen konnten. **[111]** Dies lässt die veränderte *GOS2*-Expression daher auf die unterschiedliche Ernährung und nicht auf CGI-58 iKO zurückführen. Warum jedoch bei CGI-58 iKO auf HF/HCD eine verminderte jejunale Expression im Vergleich zu den WT-Mäusen zu finden ist, bleibt offen. Ein möglicher Grund dafür, warum sich bei HF/HCD in den CGI-58 iKO Tieren eine leicht gesteigerte *Atgl* mRNA-Expression findet, könnte daran liegen, dass sobald mehr Lipide mit der Nahrung zugeführt werden, die Genexpression der *Atgl* automatisch hinaufreguliert wird, um den Überschuss an TGs effizient abbauen zu können. Prinzipiell wird die *Atgl*-Expression hochreguliert, sobald sich die Tiere in Nahrungskarenz befinden, um durch eine über Fasten induzierte Lipolyse dem Organismus Energie in Form von FFS zur Verfügung stellen zu können. **[112]** Vermutlich hat eine 4h-Fastenzeit nach HF/HCD stärkere Auswirkungen als nach RCD. Auch eine Wirkung der – ernährungsbedingten – verminderten *GOS2*-Expression auf die *Atgl*-Expression ist nicht auszuschließen. Es ist des Weiteren anzunehmen, dass sich auch das Geschlecht der Kohorten auf die unterschiedliche Expression der LD-assoziierten Proteine auswirkt.

Jedoch konnte in beiden Kohorten (RCD und HF/HCD) keinerlei Effekt des CGI-58 iKO auf die ATGL-Proteinexpression beobachtet werden, was auf eine normale Expression der *ATGL*, jedoch möglicherweise auf eine veränderte ATGL-Hydrolyseaktivität schließen lässt. *Atgl* mRNA-Expressionswerte alleine lassen keine Rückschlüsse auf Einflüsse bezüglich der Enzymregulation zu, da die posttranskriptionelle Modifikation von ATGL durch eine Vielzahl von Phosphorylierungen, sowie auch die Regulation der ATGL-Enzymaktivität durch verschiedene Proteine neben CGI-58 mediiert wird. (reviewed in **[37]**) Um daher die tatsächliche Wirkung von CGI-58 iKO auf die Aktivität der ATGL zu überprüfen, sollte als nächstes Experiment ein ATGL-Aktivitätsassay durchgeführt werden.

Im Plasma zeigt sich in RCD-gefütterten Tieren – trotz keiner bestätigten Wirkung der CGI-58 Defizienz auf die ATGL-Expression – eine Tendenz hin zu gesteigerten TG-, sowie verminderten FFS- und FG-Gehalten, wie sie bei einer Reduktion der Lipolyse zu erwarten wären. Da die ATGL wie erwähnt kaum Beeinflussung in ihrer mRNA- noch in ihrer Proteinexpression bei intestinal fehlendem CGI-58 zeigt, ist ein Effekt von CGI-58 oder GOS2 auf andere Lipasen (HSL), die an der Spaltung von TGs beteiligt sind, zu vermuten. Jedoch finden sich in der Literatur einige Hinweise darauf, dass weder GOS2 [108] noch CGI-58 [113] die TG-spaltende Aktivität der HSL beeinflussen.

Entsprechend der Beobachtung einer leicht erhöhten ATGL-Expression und somit Lipolyse in der HF/HCD-Versuchsgruppe findet sich im Plasma der CGI-58 iKO Mäuse eine leichte Tendenz zu gesteigerten FFS- sowie deutlich erhöhten FG-Gehalten. Eine interessante Beobachtung findet sich auch im Lipoproteinprofil (4h gefasatet) beider Genotypen. So liegt der Hauptanteil der TGs bei HF/HCD in Form von freiem Glycerin im Plasma vor, während quasi keine Lipoproteine zu finden sind. Da dieser Effekt in beiden Genotypen zu beobachten ist, sind mehrere Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. Zum einen könnte dieser Effekt ernährungsbedingt sein: möglicherweise enthalten die Lipide des HF/HC-Futters bestimmte FS, die bevorzugt gespalten werden, was eine Steigerung der FFS- und FG-Konzentration erklären könnte. Andererseits könnte die HF/HC-Ernährung auch zu einer verminderten Lipidsekretion führen, wie sie von Douglass et al. anhand von u.a. verminderten *Mttp*-Expressionen der intestinalen Mukosa, relevant für die CM-Assemblierung, sowie auch anhand oraler Lipid-Toleranztests nach 3 Wochen HF/HCD beobachtet werden konnte. [114] Jedoch ist in unserem Fall eher eine Steigerung der CM-Produktion anzunehmen, da ein Vergleich der WT Mäuse zwischen RCD und HF/HCD zu einer fast 2-fach (Duodenum) bis hin zu einer 6-fach (Ileum) erhöhten *Mttp*-Expression führte (Daten nicht gezeigt). Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Lipoproteinprofil der FPLC einem Zeitpunkt entspricht, an dem die Leber noch nicht genügend CM-Remnants zur VLDL Synthese aufgenommen, jedoch die LPL schon CMs gespalten hat, was ein gehäuftes Vorliegen von Glycerin und FFS im Plasma erklären würde. Im Lipoproteinprofil kann man CMs und VLDL-Fraktionen nicht differenzieren.

Hinsichtlich des Einflusses von CGI-58 iKO auf die Lipogenese kann anhand der ermittelten qRT-PCR Daten keine Aussage getroffen werden. Die deutliche Erhöhung der *Scd-1*-Genexpression indiziert eine gesteigerte Biosynthese einfach ungesättigter FS bei CGI-58 iKO im Duodenum und Jejunum der RCD-Mäuse, sowie im Duodenum der HF/HCD-Versuchstiere. (reviewed in [106]) Andere Lipogenesemarker wie *Dgat2*, *Acc* und *Fas* zeigen dagegen keine deutlichen Unterschiede zwischen den Genotypen auf RCD, während die HF/HCD-Kohorte diesbezüglich verminderte Expressionen bei CGI-58 iKO aufweist. Daraus kann man schließen, dass eine darmspezifische CGI-58 Defizienz keinen (RCD) bzw. einen leicht reduzierenden (HF/HCD) Effekt auf die *de novo* Lipidsynthese hat, sowie die Umwandlung von gesättigten FS wie Palmitat (16:0) und Stearat (18:0) in ihre jeweilige ungesättigte Form Palmitoleat (16:1) und Oleat (18:1) durch SCD-1 via CGI-58 iKO stimuliert wird. Oleate kommen in fast allen Nahrungslipiden vor und zählen daher zu den hauptsächlich alimentär zugeführten FS. (reviewed in [106]) Ihre *de novo* Synthese erfolgt aus Glukose oder Fruktose, die über die Nahrung aufgenommen werden und über den Citratzyklus in Acetyl-CoA verwandelt werden. Dieses wird schließlich mithilfe von ACC und FAS in Palmitat bzw. weiter in Stearat konvertiert, das durch Umwandlung via SCD-1 schließlich in Oleat umgewandelt wird. [115] (reviewed in [116]) Da besonders gesättigte FS als lipotoxisch gelten, wirkt eine intestinale CGI-58 Defizienz wahrscheinlich protektiv auf die Entstehung von beispielsweise ER-Stress. Vorangegangene Studien zeigten, dass eine Stilllegung des CGI-58 Gens in Leberzellen zur Sekretion von TGs aus hauptsächlich gesättigten FS und kaum Oleat führte [56], während eine fehlende ATGL in einer Bildung Oleat-reicher TGs resultierte. [86] Wie sich nun eine intestinale CGI-58 Defizienz tatsächlich auf das FS-Profil von TGs auswirkt, müsste daher mittels GC oder GC/MS überprüft werden.

Obrowsky et al. konnten zeigen, dass bei intestinaler ATGL Defizienz PPAR α -Zielgene herunterreguliert sind. [117] Da PPAR α eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener Prozesse im Dünndarm spielt, wie beispielsweise β -Oxidation, protektive Prozesse vor oxidativem Stress sowie auch Cholesterinabsorption, wurde auch in diesem Projekt der Einfluss von CGI-58 iKO auf diese Aspekte hin untersucht. Hinsichtlich der *Ppara* Expression selbst zeigen sich bei RCD keinerlei Unterschiede bei CGI-58 iKO verglichen mit dem WT, sowie kein Effekt von CGI-58 iKO auf die β -Oxidation oder oxidativen Stress, während sich auf HF/HCD eine leichte

Steigerung der *Ppara*-Expression, sowie auch eine Tendenz zu oxidativem Stress und gesteigerter β -Oxidation findet. Den Cholesterinmetabolismus betreffend weist der Cholesterintransporter *Npc1l1* in Duodenum und Jejunum der RCD-Versuchsgruppe, sowie auch in Jejunum und Ileum der HF/HCD-Tiere eine leichte Erhöhung bei CGI-58 iKO auf, was eine gesteigerte Cholesterinabsorption in diesen Darmabschnitten vermuten lässt. Allerdings findet sich bei den für die Absorptionsstudie verwendeten Mäusen, die in Alter, Geschlecht und Fütterungs- bzw. Fastenzustand (RCD) mit dieser Versuchsgruppe übereinstimmten, keinerlei Hinweis auf gesteigerte intestinale Cholesterinabsorption bei CGI-58 iKO. Da die qRT-PCR-Daten aufgrund ihrer sehr geringen Erhöhung nicht aussagekräftig sind, liegt der Schluss nahe, dass CGI-58 keinerlei Effekte auf die Cholesterinabsorption bei RCD, sowie HF/HCD hat.

Bezüglich der TG-Lipidabsorption kann in der RCD-Kohorte ein deutlicher geschlechterspezifischer Trend beobachtet werden. Mithilfe radioaktiv markierter Substrate (^3H -Trioleat, ^{14}C -Cholesterin) wurde der Einfluss einer intestinalen CGI-58 Defizienz auf die Lipidabsorption bei RCD untersucht, während für HF/HCD-Tiere keine Daten vorliegen. Während bei CGI-58 iKO die weiblichen Versuchsmäuse im gesamten Gastrointestinaltrakt eine signifikant gesteigerte TG-Absorption zeigen, so kann man bei den Männchen kaum deutliche Unterschiede zwischen WT und CGI-58 iKO hinsichtlich TG-Absorption beobachten. Da jedoch anhand männlicher CGI-58 iKO Versuchsmäuse die Lipidakkumulation im Jejunum via Folch-Extraktion und histologischer Schnitte bestätigt wurde, war eine gesteigerte intestinale Lipidabsorption zu erwarten. Diese findet sich einzig im Jejunum der männlichen Kohorte bei CGI-58 iKO, was mit den Kryoschnitten übereinstimmt. Interessant sind allerdings die Unterschiede zwischen der männlichen und weiblichen Kohorte.

Im Menschen finden sich hinsichtlich der Plasmalipidkonzentrationen ebenfalls geschlechterspezifische Unterschiede, die jedoch auch altersabhängig sind. **[118]** Die altersabhängigen Beobachtungen lassen sich auf die Veränderung des Hormonhaushalts insbesondere der Frauen zurückführen. Unter dem Einfluss des Hormons Östrogen steigen die TG-Werte an, während Cholesterinwerte herabgesenkt werden. Dies erklärt die geschlechterspezifische Inzidenz der nicht alimentär bedingten Hypertriglyzeridämie. **[119]** Ob auch im murinen Versuchsmodell die signifikant erhöhte TG-Absorption besonders im Intestinum, sowie auch eine erhöhte gastrische TG-Retention auf hormonelle Ursachen

zurückzuführen sind, bleibt fraglich. Faktum ist, dass die erhöhten Plasmakonzentrationen der weiblichen Versuchsgruppe verglichen zu den männlichen Versuchstieren in beiden Genotypen ähnlich erhöhte Konzentrationen zeigen, was wiederum mit humanen TG-Plasmagehalten übereinstimmt. Für beide Geschlechter finden sich gesteigerte intestinale TG-Absorptionen bei CGI-58 Defizienz, die in einer verminderten TG-Sekretion ins Plasma sowie darauffolgender reduzierter TG-Absorption in der Leber resultieren.

Um nach der Resorption der Nahrungslipide den Organismus mit Energie zu versorgen, findet sich an der Oberfläche der luminalen Endothelzellen in den Kapillaren der peripheren Gewebe wie Fettgewebe und Muskel die LPL. Durch diese werden FS von den via CM und VLDL transportierten TGs abgespalten und dienen als Energielieferanten. (reviewed in [23]) Auch in makrophagen-reichen Plaques ist die LPL lokalisiert und steht aufgrund dessen in Zusammenhang mit Atherosklerose. Es konnte unter anderem auch gezeigt werden, dass die LPL-Aktivität in atherosklerotischen Arterien gesteigert ist. [21, 120] Durch ein weiteres Experiment, in dem die periphere Lipolyse, mediiert durch die LPL, via Tyloxapol inhibiert wurde, konnte beobachtet werden, dass der bei den weiblichen Versuchstieren beobachtete intestinale Effekt bei CGI-58 iKO nicht auf die LPL-Aktivität zurückzuführen ist. Der erwartete Effekt der LPL konnte anhand einer Lipidakkumulation im Plasma, sowie einer verminderten hepatischen Lipidabsorption, zurückzuführen auf eine verminderte Entstehung von CM-Remnants, die für die hepatische VLDL-Synthese benötigt werden, bestätigt werden.

Insgesamt lässt sich daher sagen, dass CGI-58 iKO in männlichen Versuchstieren auf RCD eine wichtige Rolle im intestinalen Lipidstoffwechsel spielt. So resultiert CGI-58 iKO in einer intestinalen Akkumulation alimentärer Lipide, sowie einer Tendenz hin zu gesteigerten intestinalen Lipidabsorptionen. Erwartungsgemäß sollte diese Akkumulierung der TGs im Darm in weiterer Folge zu einer verminderten Lipidabgabe ins Plasma, sowie einer verminderten hepatischen Lipidabsorption führen, was beides im Rahmen der radioaktiven Studie bestätigt wurde. Dieser Effekt der gesteigerten intestinalen Lipidabsorption, gefolgt von verminderter Sekretion ins Plasma und reduzierter hepatischer Lipidabsorption, ist in den weiblichen Versuchstieren ausgeprägter, was möglicherweise auf hormonelle Einflüsse zurückzuführen ist. Anhand der normalen Plasmaparameter konnte jedoch kein Unterschied beobachtet werden.

Da die mRNA- sowie Proteinexpression der ATGL kaum Veränderungen bei intestinaler CGI-58 Defizienz zeigt, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die durch CGI-58 iKO hervorgerufenen Lipidakkumulationen primär nicht mit einer verminderten ATGL-Expression und somit reduzierter Lipolyse, sondern vielmehr mit einer gesteigerten Lipidabsorption in Zusammenhang stehen. Außerdem ist eine Akkumulation der Lipide aufgrund einer Steigerung der *de novo* Lipidsynthese anhand der untersuchten Lipogenesemarker ebenfalls auszuschließen.

Bei hochkalorischer Ernährung hat ein CGI-58 iKO einen ähnlichen Einfluss auf den intestinalen Lipidmetabolismus, wobei die genauen Einflüsse auf die ATGL – wie auch bei RCD – noch via Aktivitätsassays abgeklärt werden müssen. Die Durchführung einer Absorptionsstudie mit HF/HCD Mäusen sollte des Weiteren darüber Aufschluss geben, ob primär eine gesteigerte Lipidabsorption anstelle einer verminderten ATGL-Aktivität zu den beobachteten Lipidakkumulationen führt.

5.1.3 CGI-58 und ER-Stress

Vorangegangene Experimente unserer Arbeitsgruppe (nicht publiziert) konnten zeigen, dass eine intestinale ATGL-Defizienz vor hepatischem ER-Stress schützt, während Fuchs et al. bereits 2012 die Beobachtung einer protektiven Funktion einer Ganzkörper ATGL-Defizienz auf TM-induzierten ER-Stress machten. [86] Da sich ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf die Rolle von ER-Stress im intestinalen Lipidmetabolismus richtet, wurden auch CGI-58 defiziente Mäuse hinsichtlich ihres Einflusses auf ER-Stress Marker untersucht. Dies erfolgte jedoch ohne vorherige künstliche ER-Stress Stimulation. Die Hypothese dahinter ist, dass ER-Stress auch auf physiologischem Weg induziert werden könnte, da Lipidmetabolismus und ER-Stress eng miteinander in Verbindung stehen. Es ist bekannt, dass Veränderungen des Lipidmetabolismus oder überschüssige FS zu einer Induktion von ER-Stress führen. [87, 121] Daher liegt es nahe, dass Veränderungen des intestinalen Lipidstoffwechsels durch KO des CGI-58 Gens in einer Induktion von intestinalem ER-Stress resultieren.

Während sich auf RCD in beiden Genotypen keinerlei Unterschiede in der Genexpression untersuchter ER-Stress Marker finden, so zeigt sich bei HF/HC-Ernährung, die als physiologischer Induktor für ER-Stress gilt, bei CGI-58 Defizienz eine verminderte mRNA Expression der Marker

BiP und *Chop* im Duodenum. Dies indiziert einen reduzierten ER-Stress gegenüber den WT-Mäusen. Dies stimmt mit der erhöhten *Scd-1* mRNA Expression im Duodenum bei CGI-58 iKO überein, da SCD-1 für die Konvertierung der bekannterweise als lipotoxisch und ER-Stress induzierend wirkenden gesättigten FS wie Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) in ihre jeweilige einfach-ungesättigte Form verantwortlich ist.

Weitere Untersuchungen auf Proteinebene weisen jedoch auf vermehrten ER-Stress bei CGI-58 Defizienz hin, indem sowohl eIF2 α , p-eIF2 α als auch CHOP in allen drei Abschnitten des Dünndarms bei CGI-58 iKO vermehrt exprimiert werden.

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass CGI-58 iKO vermutlich ebenso wie ATGL iKO eine Rolle bei ER-Stress spielt. Da die Störung des Lipidmetabolismus durch gezieltes Ausschalten des CGI-58 Gens nicht wie vermutet zu ER-Stress führt, müsste zur Abklärung des Einflusses einer intestinalen CGI-58 Defizienz auf ER-Stress eine künstliche Induktion von ER-Stress via Tunicamycin oder Thapsigargin erfolgen.

5.2 Die Rolle von ER-Stress im intestinalen Lipidmetabolismus

Der Zusammenhang zwischen ER-Stress und Lipidmetabolismus ist bidirektional. Während die Aktivierung ER-Stress-assoziiierter Wege zu Veränderungen der Lipidhomöostase bzw. zu gesteigerter Lipogenese führen kann, so induzieren freie FS bzw. Anomalien im Fettstoffwechsel ER-Stress. [87, 121, 122] (reviewed in [123]) Daher lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit in der Untersuchung möglicher Einflüsse von pharmakologisch induziertem ER-Stress auf den Lipidmetabolismus spezifisch im Intestinum von WT-Mäusen *in vivo*.

Der in den Plasmaparametern zu beobachtende Effekt der erhöhten FS-Freisetzung nach TM-Behandlung gilt als sekundärer Effekt auf TM, da die Versuchstiere nach der i.p.-Injektion sehr geschwächt waren und aufgrund dessen weniger Nahrung aufnahmen. Diese Nahrungskarenz resultiert schließlich in einer Steigerung des Fettabbaus, um Energie zu gewinnen und führt zu einem Anstieg der FFS-Konzentrationen im Plasma.

Hinsichtlich des TG-Metabolismus zeigen sich nach TM-Injektion hepatische Akkumulationen, während die intestinalen TG-Gehalte sowie die TG-Plasmakonzentrationen und die Absorption in diesen Geweben unverändert sind. Es ist bekannt, dass ER-Stress zu intrazellulären Lipidakkumulationen führt, die durch eine Aktivierung des sterol responsive element binding proteins (SREBPs) mediiert wird. Rohrl et al. konnten kürzlich zeigen, dass trotz gesteigerter SREBP2-Expression bei ER-Stress die Cholesterinsynthese vermindert ist. Weiters wurde beobachtet, dass sowohl der Efflux von Cholesterin zu ApoA1 für die HDL-Synthese, sowie auch die *de novo* Cholesterinsynthese in Hepatozyten durch Induktion eines akuten ER-Stresses via Thapsigargin beeinträchtigt wird. [124]

Auch in unserem *in vivo* Versuch zeigte sich ein deutlicher Einfluss von ER-Stress auf den Cholesterinmetabolismus. Sowohl die Plasmakonzentrationen an totalem Cholesterin, als auch die Cholesterinabsorption im gesamten Gastrointestinaltrakt sowie der Leber zeigten bei TM-Behandlung eine deutliche Reduktion. In Zusammenarbeit mit Rohrl et al. wurde ein Lipoproteinprofil dieses Plasmas erstellt, das infolgedessen Aufschluss über die verminderte Cholesterinkonzentration im Plasma der TM-behandelten Mäuse gab: so ist diese Reduktion auf einen verminderten Cholesteringehalt in der VLDL/LDL-Fraktion zurückzuführen, während HDL-Cholesterin unverändert blieb. [124]

Die Abgabe von Cholesterin ins Plasma, die mittels ^{14}C -markiertem Cholesterin untersucht wurde, war nach TM-Injektion nahe Null. Dies unterstreicht die von Rohrl et al. im *in vitro* Versuch beobachteten Auswirkungen von pharmakologisch induziertem ER-Stress auf den Cholesterinmetabolismus. Jedoch finden sich *in vivo* auch verminderte Cholesterinakkumulationen im Jejunum, die im *in vitro* Experiment anhand der Hepatozyten nicht beobachtet werden konnte. Wir erklären diesen *in vitro*-Effekt durch eine Einstellung eines Gleichgewichts, indem sowohl die Cholesterinsynthese, als auch der Cholesterin-Efflux bei ER-Stress vermindert sind. [124]

Ob diese beobachteten Effekte nach TM-Behandlung wirklich auf die Induktion von ER-Stress zurückzuführen sind, oder aber der primäre Effekt von TM – die Inhibierung der Glykosylierung und somit der Proteinsynthese – dafür verantwortlich sind, ist fraglich. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wäre ein Nachweis der ApoB-Proteinexpression oder aber auch anderen Proteinen, wie beispielsweise Albumin empfehlenswert. Eine Untersuchung von ApoB, das für die Assemblierung von CM und VLDL nötig ist, würde Aufschluss darüber geben, ob die beobachteten Effekte besonders auf die Lipidabsorption bzw. auch auf die verminderte Cholesterinkonzentration in der VLDL/LDL-Fraktion wirklich auf ER-Stress selbst, oder auf eine verminderte Proteinsynthese von u.a. ApoB zurückzuführen sind. Allerdings würde eine tatsächliche Verminderung der ApoB-Proteinexpression auch zu Veränderungen in der TG-Absorption führen, die nach TM-Behandlung allerdings nicht so ausgeprägt waren.

Einen Hinweis dafür, dass diese erhaltenen Daten nicht auf ER-Stress selbst zurückzuführen sind, geben die intestinalen und hepatischen Lipidakkumulationen, die bei 24h und 48h TM-Behandlung sehr ähnlich waren. Jedoch zeigten sich 24h nach TM-Behandlung keine intestinalen Effekte auf ER-Stress assoziierte Gene, was eine Beeinflussung v.a. des intestinalen Lipidmetabolismus durch andere Effekte von TM und nicht unbedingt durch ER-Stress vermuten lässt. Auch die Diskrepanz zwischen intestinaler mRNA- und Proteinexpression der ER-Stress Gene (insbesondere von CHOP) in der Kontroll- und TM-Versuchsgruppe weist darauf hin, dass nicht ER-Stress selbst zu den beobachteten Effekten führt.

Da TM, als auch Thapsigargin ohnehin toxische Effekte auf *in vivo* Experimente haben, wäre eine physiologische Induktion von ER-Stress von Vorteil. Im Zuge dessen könnte auch geklärt werden, ob die inhibierte Proteinsynthese oder der dadurch hervorgerufene ER-Stress zu den

beobachteten Effekten besonders im Cholesterinmetabolismus führt. Eine Möglichkeit, ER-Stress physiologisch zu induzieren ist die Störung des Lipidmetabolismus z.B. durch eine HF/HC-Ernährung. Einige Studien konnten zeigen, dass sowohl genetische (*ob/ob* Mäuse), als auch ernährungsbedingte (HF/HCD) Adipositas zu einer Induktion von ER-Stress führt. [80] (reviewed in [78]) Allerdings konnten wir in unserem *in vivo* Versuch mit über einen Zeitraum von 4 Wochen HF/HCD-gefütterten Mäusen keinerlei Überexpression ER-Stress assoziierter Gene beobachten, während intestinal sogar eine um ca. 50% verminderte *BiP* und *Chop* mRNA Expression zu beobachten war.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anabole und katabole Pathways des Lipidmetabolismus.	1
Abb. 2: Modell des Transports und der Verteilung von Neutrallipiden.	2
Abb. 3: Lipoproteinmetabolismus.	5
Abb. 4: Aufbau von Lipid Droplets.	10
Abb. 5: Lipolyse.	11
Abb. 6: Lipid Droplet-assoziierte Lipolyse.	13
Abb. 7: Störung der epidermalen Permeabilitäts-schranke bei CGI-58 KO Mäusen.	18
Abb. 8: Detailliertes Schema der UPR-Aktivierung.	20
Abb. 9: Möglicher Zusammenhang von ER-Stress und Lipidmetabolismus.	23
Abb. 10: Zucht einer Cre/lox Maus.	31
Abb. 11: Enzymatische Triglyzerid-Bestimmung aus Plasma.	33
Abb. 12: Bestimmung von freiem Glycerin im Plasma.	33
Abb. 13: Enzymatische Reaktion zur Bestimmung von Cholesterin im Plasma.	34
Abb. 14: Enzymatische Reaktion zur Bestimmung von freiem Cholesterin im Plasma.	34
Abb. 15: Testprinzip zur Bestimmung freier FS aus Plasma.	35
Abb. 16: RNA-Gel.	37
Abb. 17: Temperaturprofil cDNA-Synthese.	37
Abb. 18: Überprüfung des CGI-58 Knockouts im Intestinum auf mRNA-Ebene (RCD, ♂).	48
Abb. 19: Überprüfung des CGI-58 Knockouts im Intestinum auf Protein-Ebene (RCD, ♂).	49
Abb. 20: Lipidgehalt 4h gefastet (RCD, ♂).	50
Abb. 21: Lipidgehalt über Nacht-gefastet (RCD, ♂).	50
Abb. 22: LD Akkumulation im Jejunum von CGI-58-iKO-Mäusen (RCD, ♂).	51
Abb. 23: mRNA-Expression <i>PPARα</i> (RCD, ♂).	52
Abb. 24: Genexpression Lipid-metabolismus (RCD, ♂).	54
Abb. 25: Oxidativer Stress bei CGI-58 iKO (RCD, ♂).	55
Abb. 26: <i>Pdk4</i> mRNA Expression bei CGI-58 iKO (RCD, ♂).	55
Abb. 27: ATGL Proteinexpression, Western-Blot (RCD, ♂).	56
Abb. 28: Plasmaparameter (RCD, ♂).	57
Abb. 29: Lipoproteinprofil (RCD, ♂).	57
Abb. 30: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption (RCD, ♀).	58

Abb. 31: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption (RCD, ♂).....	59
Abb. 32: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption im Plasma (RCD, ♀+♂).....	60
Abb. 33: Unterschiedliche TG-Absorption durch Tyloxapol-Injektion (RCD, ♀).....	62
Abb. 34: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption im Plasma ohne und mit Tyloxapol-Injektion (RCD, ♀).....	62
Abb. 35: Tyloxapol-Effekt auf hepatische Lipidabsorption (RCD, ♀).....	63
Abb. 36: Cholesterin-Absorption bei unbehandelten und Tyloxapol-behandelten Tieren (RCD, ♀).....	64
Abb. 37: TG- und Cholesterinabsorption nach Tyloxapol-Behandlung (RCD, ♀).....	64
Abb. 38: Triglyzerid-/Cholesterinabsorption nach Tyloxapol-Injektion (RCD, ♀).....	65
Abb. 39: Überprüfung des CGI-58 Knockouts im Intestinum auf mRNA-Ebene (HF/HCD, ♀).....	66
Abb. 40: Überprüfung des CGI-58 iKO auf Protein-Ebene (HF/HCD, ♀).....	67
Abb. 41: Intestinaler Lipidgehalt 4h gefastet (HF/HCD, ♀).....	67
Abb. 42: LD Akkumulation im Jejunum von CGI-58-iKO-Mäusen (RCD, ♀).....	68
Abb. 43: <i>PPARα</i> mRNA Expression (HF/HCD, ♀).....	69
Abb. 44: Genexpression Lipid-metabolismus (HF/HCD, ♀).....	70
Abb. 45: Oxidativer Stress bei CGI-58 iKO (HF/HCD, ♀).....	71
Abb. 46: <i>Pdk4</i> -Expression bei CGI-58 iKO (HF/HCD, ♀).....	72
Abb. 47: ATGL-Proteinexpression (HF/HCD, ♀).....	73
Abb. 48: Plasmaparameter (HF/HCD, ♀).....	73
Abb. 49: Lipoproteinprofil (HF/HCD, ♀).....	74
Abb. 50: ER-Stress: WT vs. CGI-58 bei RCD (♂) und HF/HCD (♀).....	75
Abb. 51: ER-Stress auf Proteinexpressionsebene HF/HCD (♀).....	76
Abb. 52: ER-Stress induzierender Effekt von 48h- und 24h-TM in WT-Mäusen (RCD, ♂).....	77
Abb. 53: Xbp1-Splicing in Jejunum und Leber von WT-Mäusen (RCD, ♂).....	78
Abb. 54: Proteinexpression CHOP Jejunum – Ctl. Vs. 48h TM (RCD, ♂).....	78
Abb. 55: TM-Wirkung auf Plasmalipid-konzentrationen (RCD, ♂).....	79
Abb. 56: Effekt einer 48h-TM Behandlung auf Lipidmetabolismus (RCD, ♂).....	79
Abb. 57: Auswirkung einer 24h TM-Injektion auf Lipidakkumulationen (RCD, ♂).....	80
Abb. 58: Intestinale Lipidabsorption bei 48h und 24h TM-Behandlung (RCD, ♂).....	80
Abb. 59: TG- und Cholesterinabsorption nach TM-Behandlung (RCD, ♂).....	81
Abb. 60: TG- und Cholesterinabsorption nach TM-Behandlung (RCD, ♂).....	82
Abb. 61: Einfluss von HF/HCD auf ER-Stress (♂).....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Formen der Hyperlipoproteinämie.....	6
Tabelle 2: Unterschied zwischen zytosolischen Lipid Tröpfchen und Chylomikronen. [3]	11
Tabelle 3: Standard-Zusammensetzung des Mastermix für cDNA-Synthese. [97]	37
Tabelle 4: Standard-Zusammensetzung des Mastermix für Real-Time PCR.....	38
Tabelle 5: Temperaturprofil der qRT-PCR.	38
Tabelle 6: Sequenzen verwendeter Primer.....	39
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western-Blotting.	44

Literaturverzeichnis

- [1] Yen, Chi-Liang E;Farese, Robert V., JR: *Fat breakdown: a function for CGI-58 (ABHD5) provides a new piece of the puzzle*: Cell Metabolism **2006** ,3(5): 305–307.
- [2] Phan, C.T;Tso, P.: *Intestinal Lipid Absorption and Transport*.: Frontiers in Bioscience **2001** ,6: 299–319.
- [3] Demignot, Sylvie et al.: *Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: Key players in intestinal physiology and metabolic disorders*: Biochimie **2013**.
- [4] Borgstroem, B.: *Influence of bile salt, pH, and time on the action of pancreatic lipase; physiological implications*: Journal of Lipid Research **1964**: 522–531.
- [5] Iqbal, Jahangir;Hussain, M. M.: *Intestinal lipid absorption*: American Journal of Physiology **2009** ,296(6): E1183-94.
- [6] Pan, Xiaoyue;Hussain, M. M.: *Gut Triglyceride Production*.: Biochimica et Biophysica Acta **2011** ,1821: 727–735.
- [7] Greenwalt, D. E. et al.: *Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet*: The Journal of clinical investigation **1995** ,96(3): 1382–1388.
- [8] Buhman, Kimberly F. et al.: *Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases*.: Biochimica et Biophysica Acta **2000** ,1529 (1-3): 142–154.
- [9] Bays, Harold: *Ezetimibe*: Expert opinion on investigational drugs **2002** ,11(11): 1587–1604.
- [10] Clearfield, Michael B.: *A novel therapeutic approach to dyslipidemia*: The Journal of the American Osteopathic Association **2003** ,103(1): S16-20.
- [11] Hamilton, R. L. et al.: *Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency*: Journal of Lipid Research **1998** ,39(8): 1543–1557.

- [12] Cartwright, I. J.; Higgins, J. A.: *Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes*: The Journal of biological chemistry **2001** ,276(51): 48048–48057.
- [13] Hussain, Mahmood M.: *A proposed model for the assembly of chylomicrons*: Atherosclerosis **2011** ,148(1): 1–15.
- [14] Khandelia, Himanshu et al.: *Triglyceride blisters in lipid bilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes*: PLoS One **2010** ,5(9): e12811.
- [15] Dallinga-Thie, Geesie M. et al.: *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*: Atherosclerosis **2010** ,211(1): 1–8.
- [16] Cooper, Allen D.: *Hepatic uptake of chylomicron remnants*: Journal of Lipid Research **1997** ,38(11): 2173–2192.
- [17] Karpe, F. et al.: *Removal of triacylglycerols from chylomicrons and VLDL by capillary beds: the basis of lipoprotein remnant formation*: Biochemical Society transactions **2007** ,35(3): 472–476.
- [18] Goldstein, Joseph L.; Brown, Michael S.: *The LDL receptor*: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **2009** ,29(4): 431–438.
- [19] Jiang, Zhenghui G. et al.: *Lipoprotein metabolism in nonalcoholic fatty liver disease*: Journal of biomedical research **2013** ,27(1): 1–13.
- [20] Karpe, F. et al.: *Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100*: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **1995** ,15(2): 199–207.
- [21] Cohn, J. S. et al.: *Contribution of apoB-48 and apoB-100 triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters*: Journal of Lipid Research **1993** ,34(12): 2033–2040.

- [22] Zilversmit, D. B.: *Atherogenesis: a postprandial phenomenon*. Circulation **1979** ,60(3): 473–485.
- [23] M. W. King: *Lipoproteins, Lipoprotein Metabolism and Disease*,
www.themedicalbiochemistrypage.org **2013**.
- [24] Berthold, Heiner K;Gouni-Berthold, Ioanna: *Hyperlipoproteinemia(a): clinical significance and treatment options*. Atherosclerosis **2013** ,14(1): 1–5.
- [25] Virani, Salim S. et al.: *Associations between lipoprotein(a) levels and cardiovascular outcomes in black and white subjects: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Circulation **2012** ,125(2): 241–249.
- [26] Iqbal, Jahangir et al.: *Increased intestinal lipid absorption caused by Ire1beta deficiency contributes to hyperlipidemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation research **2012** ,110(12): 1575–1584.
- [27] Rutishauser, Jonas: *Statins in clinical medicine*. Swiss medical weekly **2011**: w13310.
- [28] Bodor, E. T;Offermanns, S.: *Nicotinic acid: an old drug with a promising future*. British journal of pharmacology **2008** ,153(1): S68-75.
- [29] H. Jakubowski: *Biochemistry; LIPID STRUCTURE: Lipids in Water*,
<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/lipidstruct/ollipidwater.html> **2013**.
- [30] Ding, Yunfeng et al.: *Isolating lipid droplets from multiple species*. Nature protocols **2013** ,8(1): 43–51.
- [31] Hodges, Brittany D. M;Wu, Christine C.: *Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets*. Journal of Lipid Research **2010** ,51(2): 262–273.
- [32] C. Ehnholm: *Cellular Lipid Metabolism; Chapter 1 - The Lipid Droplet: a Dynamic Organelle, not only Involved in the Storage and Turnover of Lipids.*, Springer **2009**.

- [33] G. Löffler et al.: *Biochemie & Pathobiochemie; 8.Auflage*, Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland **2009**.
- [34] Haemmerle, Guenter et al.: *Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis*: The Journal of biological chemistry **2002** ,277(7): 4806–4815.
- [35] Zechner, Rudolf et al.: *Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores*: Journal of Lipid Research **2009** ,50(1): 3–21.
- [36] Zimmermann, Robert et al.: *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*: Science **2004** ,306(5700): 1383–1386.
- [37] Jenkins, Christopher M. et al.: *Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities*: The Journal of biological chemistry **2004** ,279(47): 48968–48975.
- [38] Zechner, Rudolf et al.: *FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling*: Cell Metabolism **2012** ,15: 279–291.
- [39] Unger, Roger H. et al.: *Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome*: Biochimica et Biophysica Acta **2010** ,1801(3): 209–214.
- [40] Granneman, James G. et al.: *Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes*: The Journal of biological chemistry **2007** ,282(8): 5726–5735.
- [41] E. E. Kershaw: *The role of tissue-specific lipid metabolism in obesity and the metabolic syndrome*., <http://www.kershawlab.pitt.edu/research.html> **2013**.
- [42] Yamaguchi, Tomohiro: *Crucial role of CGI-58/alpha/beta hydrolase domain-containing protein 5 in lipid metabolism*: Biological & pharmaceutical bulletin **2010** ,33(3): 342–345.

- [43] Granneman, James G. et al.: *Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl)*.: The Journal of biological chemistry **2009** ,284(50): 34538–34544.
- [44] Yamaguchi, Tomohiro;Osumi, Takashi: *Chanarin-Dorfman syndrome: deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase*: Biochimica et Biophysica Acta **2009** ,1791(6): 519–523.
- [45] Notari, Luigi et al.: *Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor*: The Journal of biological chemistry **2006** ,281(49): 38022–38037.
- [46] Chung, Chuhan et al.: *Anti-angiogenic pigment epithelium-derived factor regulates hepatocyte triglyceride content through adipose triglyceride lipase (ATGL)*: Journal of hepatology **2008** ,48(3): 471–478.
- [47] Soni, Krishnakant G. et al.: *Coatmer-dependent protein delivery to lipid droplets*: Journal of cell science **2009** ,122(11): 1834–1841.
- [48] Lord, Caleb C;Brown, J. M.: *Distinct Roles for α - β hydrolase domain 5 (ABHD5/CGI-58) and adipose triglyceride lipase(ATGL/PNPLA2) in lipid metabolism and signaling*: Adipocyte **2012** ,1(3): 123–131.
- [49] Schweiger, Martina et al.: *Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5*: American Journal of Physiology **2009** ,297(2): E289-96.
- [50] Ghosh, Ananda K. et al.: *CGI-58, the causative gene for Chanarin-Dorfman syndrome, mediates acylation of lysophosphatidic acid*: The Journal of biological chemistry **2008** ,283(36): 24525–24533.
- [51] Montero-Moran, Gabriela et al.: *CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase*: Journal of Lipid Research **2010** ,51(4): 709–719.
- [52] D. B. McMahon: *A functional characterisation of CGI-58*. **2012**.

- [53] Lass, Achim et al.: *Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome*: Cell Metabolism **2006** ,3(5): 309–319.
- [54] Gruber, Astrid et al.: *The N-terminal region of comparative gene identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase*: The Journal of biological chemistry **2010** ,285(16): 12289–12298.
- [55] Caviglia, Jorge M. et al.: *Adipose-selective overexpression of ABHD5/CGI-58 does not increase lipolysis or protect against diet-induced obesity*: Journal of Lipid Research **2011** ,52(11): 2032–2042.
- [56] Brown, J. M. et al.: *CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance*: Journal of Lipid Research **2010** ,51(11): 3306–3315.
- [57] Caviglia, Jorge M. et al.: *ABHD5/CGI-58 facilitates the assembly and secretion of apolipoprotein B lipoproteins by McA RH7777 rat hepatoma cells*: Biochimica et Biophysica Acta **2009** ,1791(3): 198–205.
- [58] Brown, J. M. et al.: *CGI-58 facilitates the mobilization of cytoplasmic triglyceride for lipoprotein secretion in hepatoma cells*: Journal of Lipid Research **2007** ,48(10): 2295–2305.
- [59] Rozenszajn, L. et al.: *Jordans' anomaly in white blood cells. Report of case*: Blood **1966** ,28(2): 258–265.
- [60] Radner, Franz P. W. et al.: *Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58)*: The Journal of biological chemistry **2010** ,285(10): 7300–7311.
- [61] Bruno, Claudio et al.: *Clinical and genetic characterization of Chanarin-Dorfman syndrome*: Biochemical and biophysical research communications **2008** ,369(4): 1125–1128.

- [62] Lai, Chunwei W. et al.: *ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery.*: The Journal of biological chemistry **2012** ,287(11): 7969–7978.
- [63] Adolph, Timon-Eric et al.: *Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation.*: Digestive Diseases **2012** ,30(4): 341–346.
- [64] Basseri, Sana;Austin, Richard C.: *Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential.*: Biochemistry research international **2012**: 1–13.
- [65] Morris, J. A. et al.: *Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins.*: The Journal of biological chemistry **1997** ,272(7): 4327–4334.
- [66] Bertolotti, A. et al.: *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response.*: Nature cell biology **2000** ,2(6): 326–332.
- [67] Marciniak, Stefan J;Ron, David: *Endoplasmic reticulum stress signaling in disease.*: Physiological reviews **2006** ,86(4): 1133–1149.
- [68] Marciniak, Stefan J. et al.: *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.* Genes & development **2004** ,18(24): 3066–3077.
- [69] Wang, X. Z. et al.: *Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153).*: Molecular and cellular biology **1996** ,16(8): 4273–4280.
- [70] Credle, Joel J. et al.: *On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2005** ,102(52): 18773–18784.
- [71] Kimata, Yukio et al.: *Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins.* The Journal of cell biology **2007** ,179(1): 75–86.

- [72] Gardner, Brooke M;Walter, Peter: *Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response*: Science **2011** ,333(6051): 1891–1894.
- [73] Ye, J. et al.: *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs*: Molecular cell **2000** ,6(6): 1355–1364.
- [74] A. Varki et al.: *Essentials of Glycobiology (2nd edition); Chapter 40, Natural and Synthetic Inhibitors of Glycosylation.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY) **1999**.
- [75] Lee, Jin-Sook et al.: *Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation*: American journal of translational research **2012** ,4(1): 102–113.
- [76] Lytton, J. et al.: *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*: The Journal of biological chemistry **1991** ,266(26): 17067–17071.
- [77] Treiman, M. et al.: *A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases*: Trends in pharmacological sciences **1998** ,19(4): 131–135.
- [78] Hotamisligil, Gokhan S.: *Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes*: Diabetes **2005** ,54(2): S73-8.
- [79] Hotamisligil, G. S.: *Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes*: International journal of obesity **2008** ,32(7): S52-4.
- [80] Ozcan, Umut et al.: *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*: Science **2004** ,308(5695): 457–461.
- [81] Zha, Beth S;Zhou, Huiping: *ER Stress and Lipid Metabolism in Adipocytes*: Biochemistry research international **2012**: 312943.
- [82] Lee, Ann-Hwee;Glimcher, Laurie H.: *Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism*: Cellular and molecular life sciences **2009** ,66(17): 2835–2850.

- [83] Kaser, Arthur et al.: *The unfolded protein response and gastrointestinal disease: Seminars in immunopathology* **2013** ,35(3): 307–319.
- [84] Niederreiter, Lukas et al.: *ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells: The Journal of experimental medicine* **2013** ,210(10): 2041–2056.
- [85] Lu, Peng et al.: *Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response and altered T cell differentiation in necrotizing enterocolitis: PLoS One* **2013** ,8(10): e78491.
- [86] Fuchs, Claudia D. et al.: *Absence of adipose triglyceride lipase protects from hepatic endoplasmic reticulum stress in mice: Hepatology* **2012** ,56(1): 270–280.
- [87] Wei, Yuren et al.: *Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells: American Journal of Physiology* **2006** ,291(2): E275-81.
- [88] A. Prechisler: *Targeting your DNA with the Cre/Lox System*. **2004**.
- [89] DiaSys Diagnostic Systems: *Triglycerides FS; Instruction Manual*, Deutschland **2008**.
- [90] Sigma Aldrich: *Free Glycerol Reagent; Instruction Manual*., USA **2011**.
- [91] DiaSys Diagnostic Systems: *Cholesterol FS; Instruction Manual*, Deutschland **2009**.
- [92] DiaSys Diagnostic Systems: *Free Cholesterol FS; Instruction Manual*, Deutschland **2008**.
- [93] WAKO Chemicals: *NEFA-HR(2); Instruction Manual*, Deutschland **2009**.
- [94] Peqlab: *peqGOLD TriFast™; Datenblatt* **2012**.
- [95] Thermo Scientific: *NanoDrop; Technical Bulletin*, USA **2008**.
- [96] D. Wiczorek et al.: *Methods of RNA Quality Assessment*.,
<http://at.promega.com/resources/articles/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/> Updated
October 2012. **2012**.

- [97] Applied Biosystems: *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Protocol*, USA **2010**.
- [98] Promega: *GoTaq® qPCR Mastermix.*, USA **2010**.
- [99] Pfaffl, Michael W. et al.: *Relative Expression Software Tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*: Nucleic Acids Research **2002** ,30(9): 2–10.
- [100]W. Internet Pathology Laboratory: *SURGICAL PATHOLOGY - HISTOLOGY Staining Manual: Oil Red O - Propylenglycol - Fat*, <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html> **2013**.
- [101]BioRad: *Bradford Protein Assay; Instruction Manual*, USA **2000**.
- [102]Folch, Jordi et al.: *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*: Journal of Biological Chemistry **1957** ,226: 497–509.
- [103]BioRad: *Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescent Kit; Instruction Manual.*, USA **2012**.
- [104]BioRad: *Clarity™ Western ECL Substrate Kit; Instruction Manual*, USA **2012**.
- [105]Nguyen, P. et al.: *Liver lipid metabolism*: Journal of animal physiology and animal nutrition **2008** ,92(3): 272–283.
- [106]Paton, Chad M;Ntambi, James M.: *Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase.*: American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism **2009** ,297(1): E28 – E37.
- [107]Tilton, Gregory B. et al.: *Biochemical and molecular characterization of ACH2, an acyl-CoA thioesterase from Arabidopsis thaliana*: The Journal of biological chemistry **2004** ,279(9): 7487–7494.
- [108]Yang, Xingyuan et al.: *The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase*: Cell Metabolism **2010** ,11(3): 194–205.

- [109]Cornaciu, Irina et al.: *The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and GOS2, respectively*. PLoS One **2011** ,6(10): e26349.
- [110]Lu, Xin et al.: *Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and GOS2*. Cell Cycle **2010** ,9(14): 2719–2725.
- [111]X. Yang et al.: *Overexpression of G0/G1 Switch Gene 2 Promotes Hepatic Steatosis Through Inhibition of Triglyceride Turnover and Fatty Acid Oxidation*, Scottsdale **2012**.
- [112]Villena, Josep A. et al.: *Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis*. The Journal of biological chemistry **2004** ,279(45): 47066–47075.
- [113]Schweiger, Martina et al.: *Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism*. The Journal of biological chemistry **2006** ,281(52): 40236–40241.
- [114]Douglass, John D. et al.: *Intestinal mucosal triacylglycerol accumulation secondary to decreased lipid secretion in obese and high fat fed mice*. Frontiers in physiology **2012** ,3: 25.
- [115]Miyazaki, Makoto et al.: *Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis*. Cell Metabolism **2007** ,6(6): 484–496.
- [116]Strable, Maggie S;Ntambi, James M.: *Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology **2010** ,45(3): 199–214.
- [117]Obrowsky, Sascha et al.: *Adipose triglyceride lipase is a TG hydrolase of the small intestine and regulates intestinal PPARalpha signaling*. Journal of Lipid Research **2013** ,54(2): 425–435.

- [118]Wakabayashi, Ichiro: *Influence of age and gender on triglycerides-to-HDL-cholesterol ratio (TG/HDL ratio) and its association with adiposity index*. Archives of gerontology and geriatrics **2012** ,55(3): 729–734.
- [119]J. Huber: *Herz-Kreislauf System*, http://www.drhuber.at/gendermed/herz_kreislauf.html.
- [120]Renier, G. et al.: *High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis*: Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **1993** ,13(2): 190–196.
- [121]Guo, Wen et al.: *Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes*: American Journal of Physiology **2007** ,293(2): E576-86.
- [122]Fu, Suneng et al.: *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*: Nature **2011** ,473(7348): 528–531.
- [123]Gentile, Christopher L. et al.: *Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease*: Biofactors **2011** ,37(1): 8–16.
- [124]Rohrl, Clemens et al.: *Endoplasmic reticulum stress impairs cholesterol efflux and synthesis in hepatic cells*: Journal of Lipid Research **2013**.

Abkürzungen

4-AAP	4-Aminoantipyrin
α-MSH	α -Melanozyten stimulierendes Hormon
Abca1	ATP-binding cassette protein
ABHD5	α/β -Hydrolasedomäne 5
Acat2	acyl-CoA:cholesterol-acyltransferase 2
Acc	acetyl-CoA carboxylase
ACOD	acyl-CoA-oxidase
Acot1,2	acyl-CoA thioesterase1,2
Acox1	acyl-CoA oxidase 1
ACS	acyl-CoA synthetase
Agr2	anterior gradient 2
AK	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
AS	Aminosäure
ASO	antisense-oligonucleotide
ATF6	activating transcription factor 6
ATGL	adipose triglyceride lipase
BiP/Grp78	Immunoglobulin-bindendes Protein/ Glukose-reguliertes Protein 78
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDS	Chanarin Dorfman Syndrom
CE	Cholesterinester
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CGI-58	comparative gene identification 58
CHE	Cholesterin-Esterase
CHO	Cholesterin-Oxidase
CHOP	C/EBP homologes Protein
CM	Chylomikronen

CoA	CoenzymA
COP I+II	coatomer protein coat-complex I + II
Cpt1α	carnitine palmitoyltransferase 1 α
Cre	cyclization recombination
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DG	Diacylglycerid
DGAT	diacylglycerol-acetyltransferase
eIF2α	eukaryotic translation initiation factor 2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradierung
ERdj4	ER-DnaJ-like protein 4
ERSE	ER-stress response elements
ESPA	Natrium-N-ethyl-N-(3-Sulfopropyl)-m-anisidine
FABP (pm/c)	fatty acid binding protein (plasma membrane/ cytosolic)
Fas	fatty acid synthase
FAT/CD36	fatty acid translocase / cluster determinant 36
FATP	fatty acid transport protein
FC	Freies Cholesterin
(F)FS	(freie) Fettsäuren
FG	Freies Glyzerin
G0S2	G0/G1 Switch Regulatorprotein
GADD	growth arrest and DNA-damage inducible gene
GEF	guanidin-nucleotide exchange factor
GK	Glyzerinkinase
GlcNAc	N-acetylglucosamin
GPCR	G-protein coupled receptor
GPO	Glyzerin-3-Phosphatoxidase
GPT	GlcNAc-Phosphotransferase
HDL	high-density lipoprotein
HF/HCD	high-fat/high-cholesterol diet

HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA
HRP	horseradish peroxidase
HSL	Hormonsensitive Lipase
i.p.	intraperitoneal
IDL	intermediate density lipoprotein
IRE1	Inositol requiring enzyme 1
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
KO	Knockout
LAL	lysosomal acid lipase
LD	lipid droplet
LDL	low density lipoprotein
loxP	locus of X-over P1
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LPAAT	lysophosphatidic acid acyltransferase
LPL	lipoprotein lipase
LXRα	liver X receptor α
MEHA	3-Methyl-N-Ethyl-N-(β -Hydroxyethyl)-Anilin
MG	Monoacylglycerid
MGAT	monoacylglycerol-acetyltransferase
MGL	monoacylglycerid-lipase
MTP	microsomal triglyceride transport protein
NCIE	non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma
NEC	nekrotisierenden Enterocolitis
NEFA	non-esterfied fatty acid (Unveresterte Fettsäure)
NLSDM/NLSDI	neutral lipid storage disease with myopathy/ ichtyosis
NPC1L1	niemann-Pick C-1-like 1
OA	oleic acid (Oleat)
ORMDL3	ORM1-like 3
PA	phosphatidic acid (Phosphatidylsäure)
PA	palmitic acid (Palmitat)

PC	Phosphatidylcholin
PCR	polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PCTV	prechylomikron transport vesicle
PEDF	pigment epithelium-derived factor
PERK	PKR-like eIF2 α -kinase
PGC1α	PPAR γ coactivator 1 α
PIC	Proteaseinhibitorcocktail
PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipide
PLA2	Phospholipase A2
PNPLA2	patatin-like phospholipase domain-containing protein 2
POD	Peroxidase
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RCD	rodent chow diet
REST	Relative Expression Software Tool
RT	Real-Time
RXR	retinoid X receptors
Sar1	small GTP-binding protein 1
SCD-1	stearoyl-CoA desaturase
SERCA	sarkoendoplasmatisches Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
TC	Totales Cholesterin
TG	Triglyzeride
TM	Tunicamycin
TRL	triglyceride-rich Lipoprotein
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetylglucosamin
UPR	unfolded protein response
UPRE	UPR-response elements
VLDL	very low density lipoprotein
WAT	white adipose tissue (weißes Fettgewebe)
WT	Wildtyp

XPB1 X-box binding protein 1

ZNS Zentralnervensystem