

Isabella Pototschnig, BSc

**Untersuchung von Vitamin B3 und seinen Derivaten in Bezug auf
den Lipid- und Energiestoffwechsel**

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Masterstudium Biochemie und molekulare Biomedizin

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuerin

Dr. Renate Schreiber

Institut für Molekulare Biowissenschaften

Karl-Franzens-Universität Graz

Graz, Juli 2018

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. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen recht herzlich bedanken, die mich während der Durchführung meiner Masterarbeit und während des gesamten Studiums unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei meiner Betreuerin Dr. Renate Schreiber für ihre exzellente Betreuung, ihr Engagement in meiner Ausbildung und ihre Geduld zu bedanken. Sie stand mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite und unterstützte mich tatkräftig bei den Experimenten. Außerdem möchte ich Univ.-Prof. Dr. Rudolf Zechner dafür danken, dass er mir ermöglicht hat, in diesem Labor zu arbeiten und hier alle Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens zu erlernen.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei Dr. Gabriele Schoiswohl, Dr. Ulrike Taschler und Dr. Achim Lass für ihre Unterstützung und Ideen. Außerdem gilt ein großer Dank meinen Kolleginnen Carina, Ursula und Pia, an die ich mich mit jeder Frage wenden konnte und mit denen ich heitere Stunden im Labor verbracht habe.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und vor allem meinen Eltern, die mir überhaupt ermöglicht haben zu studieren und einen Beruf zu wählen, der mich erfüllt. Darüber hinaus kann ich mich mit all meinen Sorgen und Gedanken immer an sie wenden. Außerdem gilt meinem Bruder Uli, Paul, Lisa, Klara und Antonia ein spezieller Dank. Diese Menschen motivieren mich, heitern mich bei Schwierigkeiten auf, und begleiten mich stets durch mein Leben. Den Abschluss meines Studiums habe ich zu einem großen Teil ihnen allen zu verdanken.

Abstract

Nicotinic acid (NA) is a chemical agent that lowers plasma FA, triglycerides (TG), glycerol, and lipoproteins in humans. NA is suggested to act via the G_i-protein-coupled receptor GPR109A by inhibiting adenylyl cyclase leading to reduced cAMP levels and to an inactive protein kinase A (PKA). PKA is critical to stimulate lipolysis. Two of the major enzymes in lipolysis, adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) are regulated by PKA. Thus, NA is suggested to block adipocyte lipolysis, which impedes the FA release into circulation. To date, the lipolysis-inhibiting effect of NA has not been proven in lipase-deficient mice. In this study we investigated the effect of NA on lipolysis using *in-vitro* approaches and lipase-deficient mice.

We injected NA into overnight fasted C57BL/6J mice. NA reduced plasma FA, glycerol and TG by 60%, 50% and 35%. To confirm adipocyte-specific effects of NA under lipolytic conditions, we added different concentrations of NA to (i) 3T3-L1-adipocytes, (ii) primary adipocytes, (iii) adipose tissue explants. We did not see any NA-driven decrease in FA or glycerol release in either of these *in-vitro*-experiments.

Thereafter, we injected NA into (i) adipocyte-specific ATGL-knockout mice (AAKO), (ii) adipocyte-specific HSL-knockout mice (AHKO), and (iii) adipocyte-specific ATGL/HSL-double-knockout mice (DAKO). NA reduced plasma FA and glycerol levels in all mouse models. NA had no influence on FA reesterification in adipocytes and FA uptake in cardiomyocytes, but lowered hepatic TG to 50%. So far, the NA lipid-lowering properties could not be explained. We also considered the NA-derivate nicotinamide riboside (NR), which activates sirtuins via NAD⁺. The injection of NR reduced plasma FA, glycerol and TG levels in C57BL/6J mice by 40%, 30% and 60%.

In summary, these findings demonstrate that NA reduces plasma FA levels independently of intracellular lipolysis but its mechanism of action remains unclear.

Zusammenfassung

Nikotinsäure (NA) senkt Plasmawerte von Fettsäuren (FS), Triacylglycerol (TG), Glycerol, und Lipoproteinen. NA bindet an den G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR109A. Dadurch wird Adenylatzyklase inaktiviert, das intrazelluläre cAMP-Niveau sinkt und die Proteinkinase A (PKA) bleibt inaktiv. PKA ist ein Lipolysemediator. Lipolytische TG-Spaltung wird von *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) und *Hormon-sensitive Lipase* (HSL) katalysiert, diese Enzyme werden durch PKA reguliert. Wenn PKA inaktiv ist, kommt es zu keiner Aktivierung der beiden Enzyme und keine intrazellulären FS werden lipolytisch mobilisiert. Bis dato wurde der lipolyse-inhibierende Effekt von NA nicht in lipase-defizienten Mäusen untersucht. In dieser Arbeit wurde die NA-Auswirkung auf Lipolyse in lipase-defizienten Mauslinien und Adipozytenmodellen untersucht.

NA reduzierte in gefasteten C57BL/6J-Mäusen die Plasma-FS, -Glycerol und -TG um 60%, 50% und 35%. Für die Untersuchung des NA-Effekts auf *in-vitro*-Lipolyse wurden 3T3-L1-, primäre Adipozyten und murine Fettgewebsexplantate verwendet. NA verringerte FS- oder Glycerol-Freisetzung in den Experimenten unter lipolyse-stimulierten Bedingungen nicht. In Untersuchungen *in-vivo* wurde NA in adipozyten-spezifische *ATGL-Knockout*-Mäuse, adipozyten-spezifische *HSL-Knockout*-Mäuse und adipozyten-spezifische *ATGL-HSL-Knockout*-Mäuse injiziert. NA senkte Plasmalipide in den lipase-defizienten Mausmodellen, wirkt also lipolyse-unabhängig.

Daraufhin wurden alternative NA-Wirkmechanismen untersucht: NA hatte keinen Einfluss auf FS-Reesterifizierung in Adipozyten oder auf FS-Aufnahme in Kardiomyozyten. Zunächst wurde das NA-Derivat Nikotinamidribosid (NR) untersucht. NR aktiviert Sirtuine via NAD⁺. NR senkt Plasma-FS, -Glycerol und -TG um 40%, 30% and 60% trotz fehlender Aktivierung des GPR109A, was auf eine rezeptorunabhängige Wirkung hinweist. In zukünftigen Untersuchungen wird der metabolische Zusammenhang zwischen NA und NR ausführlicher erforscht werden.

Inhalt

Danksagung.....	1
Abstract	4
Zusammenfassung.....	5
Inhalt	6
1. Einleitung	10
1.1. Metabolisches Syndrom.....	11
1.2. Insulin und Energiestoffwechsel	12
1.3. Lipidstoffwechsel.....	13
1.4. Regulation der Lipolyse.....	15
1.5. Modelle der Lipolyseforschung.....	17
1.6. Nikotinsäure (NA)	19
1.7. Ziel dieser Arbeit.....	23
1.8. Nikotinamidribosid (NR).....	23
2. Materialien	24
2.1. Tiere	25
2.2. Zellen.....	26
2.3. Gefäße	26
2.4. Chemikalien, Puffer und Lösungen	26
2.5. Materialien für Zellkulturarbeit.....	29
2.5.1. Medienzusammensetzung	29

2.6. Inhibitoren	31
2.7. Antikörper	32
3. Methoden.....	33
3.1. <i>In-vivo</i> -Studien	34
3.1.1. Zucht und Haltung	34
3.1.2. Injektion, Blutentnahme und Prozessierung.....	34
3.1.3. Gewebeentnahme mit terminaler Blutabnahme.....	35
3.1.4. Herstellung der Injektionslösungen	35
3.2. <i>In-vitro</i> -Versuche.....	36
3.2.1. Zellkultur allgemein	36
3.2.2. Arbeit mit Zelllinien	38
3.2.3. Arbeit mit Primärkulturen.....	39
3.2.4. Untersuchung der Lipolyse in Adipozyten	40
3.2.5. Titrationsexperiment mit einem β -Adrenozeptor-Agonisten	41
3.2.6. Reesterifizierungsexperiment	42
3.2.7. FS-Aufnahme in H9c2-Kardiomyozyten	44
3.3. <i>Ex-vivo</i> -Versuche.....	45
3.3.1. Lipidextraktion aus Geweben	45
3.3.2. Lipolysemessung in Fettgewebsexplantaten.....	46
3.4. Biochemische Analysen.....	47
3.4.1. Aufschluss	47
3.4.2. Proteinbestimmung	48
3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	50
3.4.4. Western-Blotting	51

3.4.5. Quantifizierung von Signalintensitäten	52
3.4.6. TG-Hydrolase-(TGH)-Assay	52
3.4.7. Quantitative Bestimmung von Plasmaparametern	54
3.5. Statistische Analyse.....	56
4. Ergebnisse	57
4.1. Untersuchung der Auswirkung von NA auf Lipolyse	58
4.1.1. Der NA-spezifische Rezeptor GPR109A ist in WAT Fütterungs-Fasten-reguliert	58
4.1.2. NA senkt Plasmawerte von FS, Glycerol und TG in C57BL/6J-Mäusen	58
4.1.3. NA verringert Plasmalipide bei neutralem pH-Wert.....	60
4.1.4. NA zeigt keine Auswirkung <i>in-vivo</i> auf Lipaseexpression in WAT	61
4.1.5. NA verändert die lipolytische Aktivität von Lipasen in WAT nicht	62
4.1.6. Der NA-spezifische Rezeptor GPR109A wird in Adipozytenzelllinien exprimiert.....	63
4.1.7. NA verursacht in Adipozyten keine Senkung von Lipolyseparametern.....	63
4.1.8. NA verursacht keine Veränderung der Lipaseexpression in Adipozytenzelllinien	67
4.1.9. NA verursacht keine Veränderung von Lipolyseparametern in Fettgewebsexplantaten	68
4.1.10. NA senkt Plasmawerte von FS, Glycerol und TG in lipase-defizienten Mäusen	70
4.2. Untersuchung von alternativen Wirkmechanismen von NA.....	76
4.2.1. NA hat keine Auswirkung auf die FS-Reesterifizierung in Adipozyten	76
4.2.2. NA verursacht eine Verringerung der Leber-TG.....	78
4.2.3. NA hat keine Auswirkung auf die FS-Aufnahme in Kardiomyozyten	79
4.3. Untersuchung der Auswirkung von NR auf Lipolyse	81
4.3.1. NR senkt Plasmawerte von FS, Glycerol und TG in C57BL/6J-Mäusen nach intraoperitonealer Injektion	81
4.3.2. NR verursacht keine Veränderung der Plasmawerte FS, Glycerol und TG in C57BL/6J- Mäusen nach intravenöser Injektion	83

4.3.3. NR verursacht keine Senkung von Lipolyseparametern in Adipozytenzelllinien	84
4.3.4. NR verursacht keine Veränderung der Lipaseexpression in Adipozytenzelllinien	85
4.3.5. NR verursacht eine Verringerung der Leber-TG.....	86
5. Diskussion	88
5.1. Über NA als Plasmalipidsenker und die Untersuchung des zugrundeliegenden Wirkmechanismus.....	89
5.2. Über NR als Plasmalipidsenker und die Untersuchung des zugrundeliegenden Wirkmechanismus.....	94
6. Abkürzungen	97
7. Referenzen.....	100

1. Einleitung

1.1. Metabolisches Syndrom

Was in den Vereinigten Staaten von Amerika entstanden ist, breitet sich in Form der *Western diet* auf der ganzen Welt aus (Carrera-Bastos et al., 2011). Auch in den sogenannten Entwicklungsländern setzt sich die ungesunde *Western diet* aufgrund der Wohlstandsentwicklung immer stärker durch. Diese Ernährung umfasst hochkalorische Nahrungsmittel mit hohem Fett- und Kohlenhydratanteil, prozessiertem Fleisch, vielen Milchprodukten, frittierten Lebensmitteln sowie industriell verarbeiteten Produkten, die große Mengen an stark gezuckerten Erzeugnissen und Geschmacksverstärkern enthalten. *Western diet* enthält jedoch wenig Obst, Gemüse, Vollkornprodukte, fettarmes Geflügel und Fisch. Diese ungesunde Ernährung geht oft mit einem Bewegungsmangel einher: die Energiezufuhr überwiegt den Energieverbrauch und es kommt zu einem energetischen Ungleichgewicht. Daraus resultiert Übergewicht, was in manchen Fällen zu einer krankhaften Fettleibigkeit (Adipositas) führen kann. Adipositas hat schwerwiegende Konsequenzen. Eine zentrale Auswirkung der Fettleibigkeit ist das metabolische Syndrom (Eckel et al., 2005). Diese Krankheit wird sowohl in Industrienationen, als auch in Entwicklungsländern zu einem immer größer werdenden gesundheitlichen Problem der Gesellschaft, und ist – neben Rauchen – der Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Eckel et al., 2005; Marquez-Sandoval et al., 2011; Moreira et al., 2014)

Das metabolische Syndrom resultiert aus einem Ungleichgewicht von Glukose- und Fettstoffwechsel (Abbildung 1.1). Aufgrund von kalorienreicher, nährstoffarmer Ernährung wird die langfristige Energiespeicherung in Form von Fett im Körper begünstigt. Dadurch entsteht abdominelle Fettleibigkeit, die erhöhte Werte an zirkulierenden freien Fettsäuren

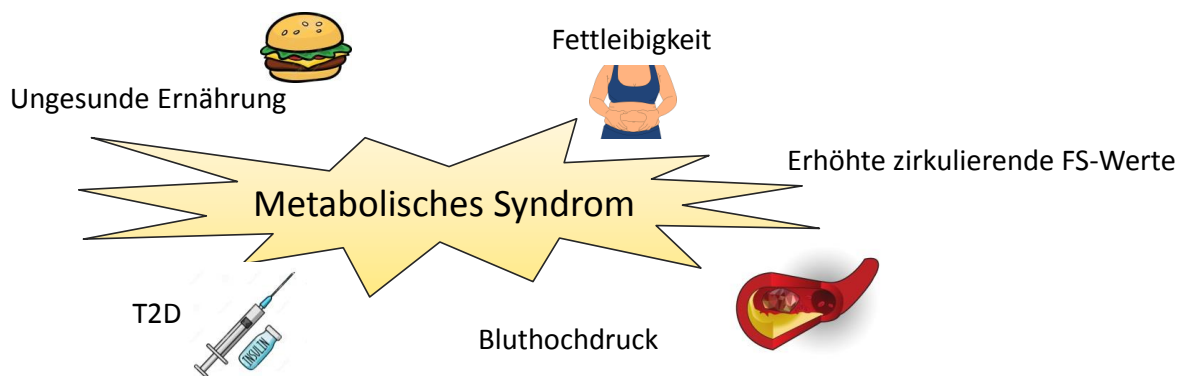


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Komponenten des metabolischen Syndroms. Das metabolische Syndrom resultiert aus einem Ungleichgewicht von Glukose- und Fettstoffwechsel. Dieses Syndrom setzt sich aus ungesunder Ernährung und damit verbundener Fettleibigkeit zusammen. Fettleibigkeit resultiert in erhöhten zirkulierenden FS-Werten, Bluthochdruck und T2D. Der Überbegriff dieser Symptome ist das metabolische Syndrom.

(FS), Hypertriglyzeridämie mit erniedrigtem HDL-Cholesterin, Bluthochdruck und Typ 2 Diabetes (T2D) zur Folge hat (Moreira et al., 2014). Ein Verbindungsglied dieser Krankheitssymptome des Glukose- und Fettstoffwechsels stellt das anabole Hormon Insulin dar. Durch die abdominelle Fettleibigkeit kommt es zu einer Beeinträchtigung der Signalübertragung durch Insulin im Fettgewebe und dadurch zu einem Ungleichgewicht des Energiestoffwechsels (Kahn & Flier, 2000).

1.2. Insulin und Energiestoffwechsel

Insulin reguliert eine große Anzahl von metabolischen Prozessen im Körper und ist ein wichtiger Regulator des Energiesubstratstoffwechsels. Im gesunden Organismus reguliert Insulin das Blutglukoseniveau (Kahn & Flier, 2000). Die Stabilität des Blutglukosewertes ist essentiell, da Hypoglykämie – also ein niedriger Blutglukosewert – zu Koma und Tod führen kann und Hyperglykämie – ein hoher Blutglukosewert – zu Gefäßschäden, Arteriosklerose und anderen Gewebsschäden führt (Ramachandran, 2014). Nach der Nahrungsaufnahme wird eine große Menge an Glukose ins Blut freigesetzt. Folglich kommt es zur Insulinausschüttung und weiters zur Förderung anaboler Prozesse. Insulin verstärkt den Glukosetransport zu den Zellen und die Synthese von Triazylglyzerolen (TG) aus FS. Darüber hinaus hemmt Insulin den TG-Abbau (Jung, 2018).

Bei krankhafter Fettleibigkeit kommt es durch die stark erhöhte Menge an eingelagerten Lipiden im Fettgewebe zu einem Ungleichgewicht der Energiehomöostase. Die insulin-gesteuerte Hemmung des TG-Abbaus, sowie der Glukosetransport und Glukosemetabolismus werden dadurch beeinträchtigt. Zusätzlich wird hepatische Glukose verstärkt in den Blutkreislauf abgegeben (Kahn & Flier, 2000). Dieses Ungleichgewicht führt zu einem erhöhten FS-, TG- und Glukose-Gehalt im Blut. Um die beeinträchtigte Koordination des Energiesubstratstoffwechsels bei steigender Fettleibigkeit zu kompensieren, werden im Körper große Mengen an Insulin gebildet. Folglich kommt es zu einer zellulären Desensibilisierung gegenüber Insulin und somit zu einer Insulinresistenz. Diese Symptome werden als Hyperlipidämie mit Insulinresistenz bezeichnet (Karpe et al., 2011). Diese beiden Faktoren sind Marker für eine sich entwickelnde T2D. Es besteht also ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen T2D, Insulin und dem Lipidstoffwechsel.

1.3. Lipidstoffwechsel

Lipide sind hydrophobe Moleküle, die dem Körper als Signalmoleküle, Strukturkomponenten oder Energiespeicher dienen. Sie sind ein elementarer Bestandteil der modernen, westlichen Ernährung. TG stellen den mengenmäßig größten Anteil der Nahrungslipide dar. TG sind Triester des dreiwertigen Alkohols Glycerol mit drei veresterten FS (Robert Zimmermann et al., 2004).

Nach der Nahrungsaufnahme unterlaufen die TG im Verdauungstrakt eine hydrolytische Spaltung und die entstandenen Produkte werden verpackt in Mizellen von Enterozyten der Darmschleimhaut aufgenommen (Abbildung 1.2). Dort werden sie reesterifiziert und als TG, zusammen mit Cholesterin und Apolipoproteinen der Klassen A, B, C und E zu reifen Chylomikronen assembliert (Nilsson-Ehle et al., 1980). Chylomikronen gehören zur Klasse der Lipoproteine. Lipoproteine sind Komplexe aus Proteinen und Lipiden, die zum Transport von hydrophoben Lipiden in hydrophilen Lösungen wie Wasser, Blut oder anderen extrazellulären Flüssigkeiten dienen. Über die Blutzirkulation gelangen reife Chylomikronen

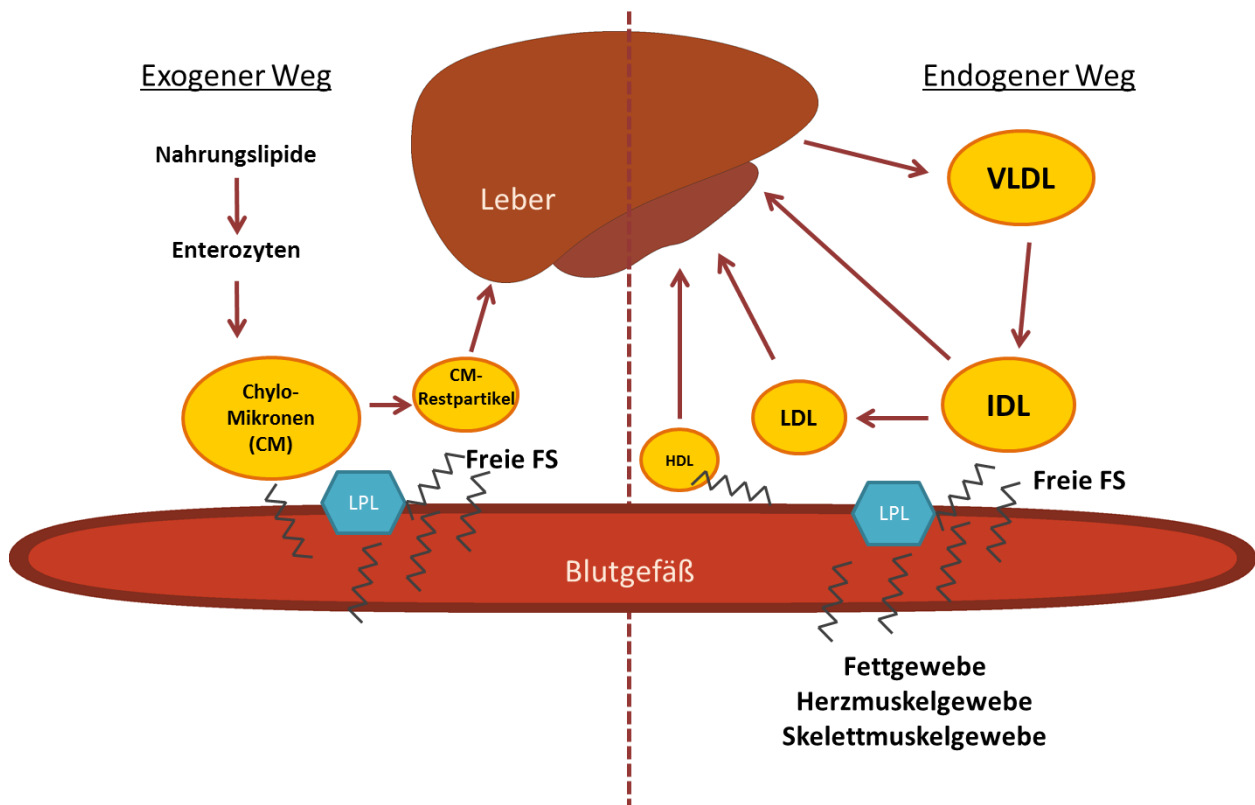


Abbildung 1.2: Überblick des Lipoprotein-Stoffwechsels. Nahrungslipide werden im Magen und Dünndarm hydrolytisch gespalten. Hydrolyseprodukte werden nach ihrer Aufnahme in den Enterozyten der Darmschleimhaut zu TG reesterifiziert. Diese TG werden mit Apolipoproteinen in Chylomikronen verpackt, welche in die Blutzirkulation gelangen (exogener Weg). Die LPL am Kapillarendothel hydrolysiert die TG-reichen Lipoproteine und freigesetzte FS werden in die Zielzellen aufgenommen. Die Restpartikel der Chylomikronen werden zur Leber transportiert. In der Leber werden VLDL (*very low density lipoproteins*) über den sogenannten endogenen Weg gebildet und die TG werden in der Blutzirkulation ebenfalls durch die LPL in Form von FS hydrolysiert. Die Restpartikel (IDL) werden zur Leber transportiert und dort abgebaut, oder weiter zu LDL (*low density lipoproteins*) hydrolysiert.

zur Lipoproteinlipase (LPL) (Olivecrona et al., 1993). Dabei handelt es sich um ein Enzym, das mit den Endothelzellen der Kapillaren des Fett-, Herzmuskel-, oder Skelettmuskelgewebes assoziiert ist. Dort katalysiert LPL die hydrolytische Spaltung von TG der Chylomikronen und die entstandenen FS gelangen über Transportproteine in die Zielgewebe (Abbildung 1.2). Das Cholesterin verbleibt in den Chylomikronen-Restpartikeln und wird zur Leber transportiert und dort endozytiert. Dieser Lipidtransportprozess wird als exogener Weg des Lipoproteinstoffwechsels bezeichnet. Eine andere Lipoproteinklasse, die sogenannten *high density lipoproteins* (HDL), führen den „reversen Cholesterintransport“ durch (Goldstein & Brown, 2016). HDL transportieren ebenfalls Cholesterin zur Leber, wo es teils zu Gallensäuren umgewandelt wird, in den Darm gelangt und ausgeschieden wird. Das restliche Cholesterin wird in der Leber zur Bildung einer weiteren Lipoproteinklasse, den *very low density lipoproteins* (VLDL), verwendet (Fukuda & Ontko, 1984). VLDL werden hauptsächlich aus hepatischem Cholesterin und TG zusammengesetzt. Die VLDL transportieren TG zu peripheren Geweben. Durch hydrolytische Spaltung der VLDL-TG durch die LPL verdichten sich die Lipoproteine. Es entstehen *intermediate density lipoproteins* (IDL) und *low density lipoproteins* (LDL). Durch diese Proteine werden periphere Gewebe mit FS, Cholesterin und Glycerol versorgt (Mayes & Topping, 1974). Diese sogenannten atherogenen Lipoproteinklassen transportieren die TG zur LPL, dort werden sie hydrolysiert und die entstandenen FS gelangen – wie oben beschrieben – in die Zielzellen. Dort werden sie zur langfristigen Speicherung zu TG reesterifiziert.

TG werden in Form von Lipidtropfen in allen Zelltypen gespeichert (Zechner et al., 2009). Lipidtropfen enthalten zusätzlich zu Lipiden strukturelle Proteine, lipidmodifizierende Enzyme und Proteine, die die Enzymaktivitäten regulieren (Brasaemle, 2007) und die Lipidtropfen zu dynamischen Organellen machen. Der größte Anteil der Lipidtropfen und der darin gespeicherten Lipide befindet sich in den Adipozyten des weißen Fettgewebes (*white adipose tissue*, WAT). WAT ist an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Es weist eine langfristige Lipidspeicherfähigkeit auf, versorgt andere Gewebe mit Energie in Form von FS und ist für die Sekretion von vielen Hormonen verantwortlich (Ahima & Lazar, 2008). Zusätzlich zum energiespeichernden, regulierenden WAT gibt es im menschlichen Körper braunes Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT). Dieses Fettgewebe kommt vor allem in Neugeborenen und Kindern vor, in kleineren Mengen ist es jedoch auch in Erwachsenen zu finden (Cypess et al., 2009). Im BAT werden Energiesubstrate, vor allem Lipide, oxidativ metabolisiert. Dieser Prozess führt zu Thermogenese, also zu Wärmeproduktion. Die beiden Fettgewebsarten WAT und BAT haben gemeinsam, dass sie FS umsetzen.

In Zeiten der Nahrungskarenz oder des erhöhten Energieverbrauchs dienen FS dem Körper als primäre Energiesubstrate. Die Oxidation von FS stellt Energie für die Zellen zur Verfügung. FS sind die gemeinsame „Energiewährung“ einer Vielzahl von metabolischen Prozessen im Fettgewebe und in vielen anderen Gewebs- und Zellarten. FS werden aus den Adipozyten freigesetzt, wenn TG mobilisiert werden (Kahn & Flier, 2000). Der Prozess der TG-Mobilisierung wird Lipolyse genannt (Robert Zimmermann et al., 2004). Der Abbau von TG wird durch drei Enzyme katalysiert. *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) hydrolysiert TG, wodurch Diazylglyzerol (DG) und eine freie FS entsteht. Im nächsten Schritt katalysiert *Hormone-sensitive Lipase* (HSL) die Hydrolyse von DG zu Monoazylglyzerol (MG) unter der Freisetzung einer weiteren FS und schließlich spaltet *Monoacylglycerol Lipase* (MGL) das MG in freies Glyzerol und eine dritte FS (Robert Zimmermann et al., 2004). FS werden nach der Freisetzung aus Adipozyten an das extrazelluläre Transportprotein Albumin gebunden (Karpe et al., 2011) und werden je nach Stoffwechselstatus unterschiedlich verwertet. FS können bei erhöhtem Energiebedarf in oxidative Gewebe wie Muskel oder braunes Fettgewebe wandern, wo sie zur Energiegewinnung verwendet werden. Wird im Körper keine Energiefreisetzung durch FS benötigt, können diese im WAT reesterifiziert und in Form von TG langfristig gespeichert werden (Edens et al., 1990). Ein weiterer metabolischer Weg der FS ist die Reesterifizierung zu TG in der Leber, wo sie ebenfalls gespeichert werden. Wenn aufgrund des Stoffwechselstatus Energie in Form von FS benötigt wird, werden die gespeicherten TG durch lipolytischen Abbau wieder zu FS hydrolysiert. Dieser Prozess muss sehr anpassungsfähig sein und fordert eine akkurate Regulation.

1.4. Regulation der Lipolyse

Der Prozess der Lipolyse findet hauptsächlich in den Adipozyten des WAT statt. Auf den Adipozyten befinden sich β -Adrenorezeptoren (β -AR). In Adipozyten der Maus werden drei Subtypen dieser Rezeptoren exprimiert (β_1 -AR, β_2 -AR, and β_3 -AR), wohingegen in humanen Adipozyten hauptsächlich zwei Subformen (β_1 -AR, β_2 -AR) Lipolyse induzieren (Lafontan & Berlan, 1993). Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren wird die lipolytische Mobilisierung von TG reguliert. Die Rezeptoren werden durch die Bindung von Katecholaminen aktiviert. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt in erster Linie zu einer cAMP-abhängigen Signalkaskade (Abbildung 1.3, Robidoux et al., 2006). Durch erhöhte intrazelluläre Mengen an cAMP wird Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. PKA phosphoryliert und aktiviert direkt die Lipase HSL und Perilipin 1A (PLIN 1A). Das phosphorylierte PLIN 1A aktiviert

ATGL indirekt, indem es die Interaktion des ATGL-Koaktivators *Comparative gene identification-58* (CGI-58) mit der Lipase ermöglicht (Granneman et al., 2009; Lass et al., 2006). Die beiden lipolysebestimmenden Enzyme HSL und ATGL werden so aktiviert und mobilisieren intrazelluläre TG, aus welchen DG, MG, Glycerol und FS entstehen.

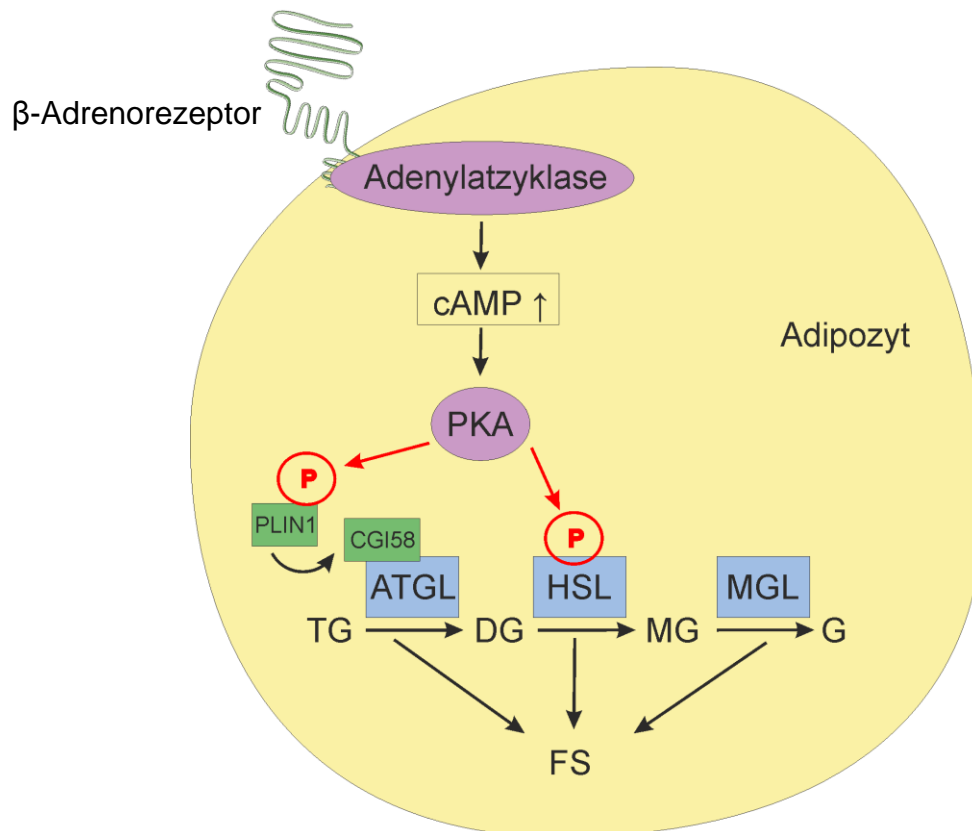


Abbildung 1.3: Regulation der Lipolyse über Proteinkinase A (PKA). Katecholamine binden und aktivieren β -adrenerge Rezeptoren an Adipozyten. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase. Folglich steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel an, wodurch die PKA aktiviert wird. PKA phosphoryliert die Lipase HSL, die dadurch aktiviert wird. Darüber hinaus wird PLIN1 von der PKA phosphoryliert, was zur Interaktion von CGI-58 mit ATGL führt. Dadurch wird die Lipase ATGL aktiv und TG werden zu DG, MG, Glycerol (G) und FS mobilisiert.

Ein weiterer Weg der Lipolysestimulierung ist der ERK-(MAPK)-Signalweg (Robidoux et al., 2006). Bei diesem Signalweg wird die Tyrosinkinase c-Src zum β_3 -Adrenorezeptor über die intrazelluläre Domäne des Rezeptors rekrutiert (Cao et al., 2000). Dadurch wird eine Kinasekaskade aktiviert, wodurch die mRNA-Expression von HSL stimuliert wird (Bergan et al., 2013), was folglich die intrazelluläre Lipolyse fördert.

Die Inaktivierung der Lipolyse wird hauptsächlich durch inhibitorische G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert (Holm et al., 2000). Diese Rezeptoren werden durch antilipolytische Faktoren, wie beispielsweise Katecholamine über α_2 -adrenerge Rezeptoren (Lafontan & Berlan, 1993) oder Nikotinsäure (engl.: *nicotinic acid*, NA) über den Rezeptor GPR109A stimuliert (Offermanns, 2006). Durch die Aktivierung der G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren

wird Adenylatzyklase inhibiert und das intrazelluläre cAMP-Niveau wird gesenkt (Holm et al., 2000).. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung der Proteinkinase A (PKA). Folglich werden die Lipase HSL und Perlipin 1A (PLIN 1A) nicht mehr phosphoryliert. Dadurch bleibt die direkte Aktivierung der HSL und indirekte Stimulierung der ATGL durch CGI-58 aus.

Diese komplexen Regulationsmechanismen der Lipolyse können in einem Organismus auch gestört sein. Kommt es beispielsweise zu Störungen der Lipolyseinhibierung, kommt es zu einer Zirkulation großer Mengen an FS im Blutkreislauf, was zu einer Akkumulation von reesterifizierten TG in den Adipozyten führt. Ist die Menge der zirkulierenden FS zu groß, werden sie auch in anderen Zellarten gespeichert (Schaffer, 2003). TG akkumulieren in Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Pankreaszellen oder Hepatozyten (Ahima & Lazar, 2008; Schaffer, 2003). Diese Zellen haben eine deutlich geringere Lipidspeicherkapazität als Adipozyten. Durch die exzessive Lipidakkumulation kommt es zu einer Dysfunktion dieser Zellen. Bei diesem Phänomen spricht man von Lipotoxizität (Schaffer, 2003). Exzessive Lipidakkumulation und Lipotoxizität sind Risikofaktoren für eine Vielzahl von metabolischen Erkrankungen, wie beispielsweise T2D, nichtalkoholische Fettleberkrankheit (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) und Atherosklerose.

Diese schwerwiegenden Auswirkungen eines Ungleichgewichts des Lipidstoffwechsels geben Anlass für die Erforschung von Störungen der Lipolyseregulation. Um die dahinterliegenden molekularen Wirkmechanismen zu studieren, sind geeignete Forschungsmodelle nötig.

1.5. Modelle der Lipolyseforschung

Für die Erforschung von biochemischen Wirkmechanismen gibt es unterschiedliche Modellorganismen. Die Ähnlichkeit des Stoffwechsels zum menschlichen Organismus steigt mit der Entwicklungsstufe der Modellorganismen: so ähnelt der Stoffwechsel einer Maus dem menschlichen Stoffwechsel eher als genetisch „einfachere“ Modellorganismen wie beispielsweise *Escherichia coli*. Trotz der großen Ähnlichkeit zwischen murinem und humanem Metabolismus gibt es auch Unterschiede. Beispielsweise weist der Lipoproteinstoffwechsel von *Mus musculus* Unterschiede zum humanen Lipoproteinprofil auf (Gordon et al., 2015). Nichtsdestotrotz ist die Maus das besterforschte und menschenähnlichste Modell für Studien der Lipolyse (Bock et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde mit Mausmodellen gearbeitet, die einen adipozyten-spezifischen *Knockout* (KO) der kodierenden Gene für die Lipasen ATGL, HSL oder für beide Enzyme aufweisen. Es wurden adipozyten-spezifische ATGL-KO-Mäuse (AAKO-Mäuse), adipozyten-spezifische HSL-KO-Mäuse (AHKO-Mäuse) und adipozyten-spezifische ATGL-HSL-Doppel-KO-Mäuse (DAKO-Mäuse) gezüchtet. Für die Zucht wurden Mäuse verwendet, die ein sogenanntes Adipoq-Cre-BAC-Transgen heterozygot exprimieren. Das bedeutet, dass sie das Enzym Cre-Rekombinase exprimieren. Dieses Enzym „schneidet“ spezifische DNA-Stücke aus Genen. Das Adipoq-Cre-BAC-Transgen ist auf die Promotorregion des Adiponectin-Genlokus in Adipozyten ausgerichtet (Eguchi et al., 2011). Dadurch wird die Cre-Rekombinase lediglich in Adipozyten des WAT und BAT der Mäuse exprimiert. Wenn diese Mäuse mit Mäusen gekreuzt werden, deren Zielgensequenz mit loxP-Stellen flankiert ist, wird das Lipasegen in Lipase-loxP- und Adipoq-Cre-positiven Nachkommen exziiert. Durch die Heterozygotie weisen nicht alle Geschwister einen adipozyten-spezifischen KO auf, dadurch werden Kontrollmäuse generiert, die denselben genetischen Hintergrund wie die KO-Mäuse aufweisen, ohne einen adipozyten-spezifischen Lipase-KO zu haben. Diese Tiere sind geeignete Kontrolltiere für die Untersuchungen mit den KO-Tieren.

Die AAKO-Mäuse weisen einen KO des ATGL-kodierenden Gens *Pnpla2* auf. Der daraus resultierende Mangel an ATGL in Adipozyten führt zu reduzierter Lipolyse in den Fettzellen (Schoiswohl et al., 2015). Dadurch kommt es zu einer Senkung der Plasmalipide und der systemischen Lipidoxidation. In den AHKO-Mäusen wird das HSL-kodierende Gen *Lipe* genetisch deletiert. Aufgrund der fehlenden Lipase HSL in den Adipozyten kommt es zu einer geringen FS-Oxidation, VLDL-Sekretion in den Mäusen (Xia et al., 2017). Der Lipidstoffwechsel der DAKO-Mäuse wurde bis dato nicht charakterisiert.

Durch die genetische Deletion der Lipasen ATGL und HSL wird ein Modell inhibierter Lipolyse geschaffen. Mithilfe der AAKOs, AHKOs und DAKOs können metabolische Abhängigkeiten von beiden lipolyse-bestimmenden Lipasen untersucht werden. Auch die Auswirkungen eines Lipasemangels werden in diesen Mausmodellen erforscht. Diese Mauslinien bieten außerdem die Möglichkeit, die weitreichenden Auswirkungen von gehemmter Lipolyse zu erforschen.

Simple Modelle stellen außerdem ein wichtiges „Werkzeug“ in der Lipolyseforschung dar, um der grundsätzlichen Frage nachzugehen, ob eine Hemmung der Lipolyse vorteilhaft für die metabolische Gesundheit ist. Eine Möglichkeit eines solchen Modells ist der Einsatz pharmakologischer Lipaseinhibitoren. Derzeit ist ein HSL-Inhibitor (Hi) bekannt, der die

HSL-Aktivität senkt und dadurch zu gesteigerter Insulinsensitivität führt (Girousse et al., 2013; Schweiger et al., 2006). Außerdem wurde ein ATGL-Inhibitor (Ai) namens Atglistatin® entwickelt, der die Lipase ATGL kompetitiv hemmt und die Lipolyse in Adipozyten inhibiert sowie Gewichtszunahme, Insulinresistenz und NAFLD in Mäusen verringert (Mayer et al., 2013; Schweiger et al., 2017). Schweiger et al., 2017 wiesen mit diesen niedermolekularen Inhibitoren auf eine Verbesserung der metabolischen Gesundheit durch Lipolysehemmung hin. Zusätzlich zu den künstlich hergestellten Inhibitoren gibt es auch natürliche pharmakologische Lipidsenker. Ein Kandidat, der Plasmalipide senkt, indem er auf Lipolyse abzielt und zur Plasmalipidsenkung in Menschen verwendet wurde, ist NA (Carlson, 2005).

1.6. Nikotinsäure (NA)

NA ist eine Pyridinkarbonsäure und gehört zum Vitamin-B3-Komplex. Bei der Erforschung des „wasserlöslichen Vitamin B“ wurde NA als hitzestabiler Bestandteil dieses Vitamins identifiziert (Lanska, 2012). Bald stellte sich heraus, dass es sich bei NA um ein essentielles Vitamin und um den „Anti-Pellagra-Faktor“ handelt (Lanska, 2012). Pellagra ist eine schwere Krankheit, die durch einen NA-Mangel ausgelöst wird. Diese Erkrankung war im frühen 20. Jahrhundert weit verbreitet und wurde aufgrund der Symptome auch die „Krankheit der vier D“ genannt: Dermatitis, Diarrhoe, Demenz und *Death* (Tod) (Badawy, 2014). Die Mangelerkrankung entsteht meist durch eine einseitige Ernährung, deren Hauptnahrungsquelle Mais oder Getreide ist, denn in diesen Nahrungsmitteln ist NA in der gebundenen Form Niacytin vorhanden, die im Körper nicht verwertet werden kann (Badawy, 2014; Rajakumar, 2000). Laut der *World Health Organization* (WHO) ist Pellagra in Entwicklungsländern aufgrund von Unterernährung noch heutzutage ein verbreitetes Gesundheitsproblem, das durch diätische Aufnahme von NA unterbunden werden kann.

NA wird endogen über den hepatischen Kynurenin-Weg aus der Aminosäure Tryptophan gebildet (Holman et al., 1950; Viljoen et al., 2015). Dabei wird Tryptophan über die Nahrung aufgenommen und via Indoleamin-2,3-dioxygenase zu Kynurenin und weiter durch Kynurenin-3-monooxygenase zu 3-Hydroxykynurenin umgewandelt (Abbildung 1.4). Hydroxykynurenin wird über weitere Zwischenschritte zu Chinolinsäure metabolisiert. Durch das Enzym Chinolinat-phosphoribosyl-transferase entstehen Nicotinamidadenin-dinukleotid (NAD⁺), Nikotinamid (NAM), NA und Nikotinamidribosid (NR), die ineinander konvertierbar sind. NAM, NA und NR bilden durch die Umwandlung zu NAD⁺ eine wichtige

Basis für zahlreiche Reduktions- und Oxidationsvorgänge im Körper. Durch die Oxidation von NAD^+ oder NADP^+ werden enzymatische Vorgänge eingeleitet, die für die Regeneration von Haut, Muskeln, Nerven und DNA essentiell sind (Ginsberg & Reyes-Soffer, 2013). Die genaue Wirkweise der NAD^+ -Vorläufer ist jedoch bis dato nicht geklärt.

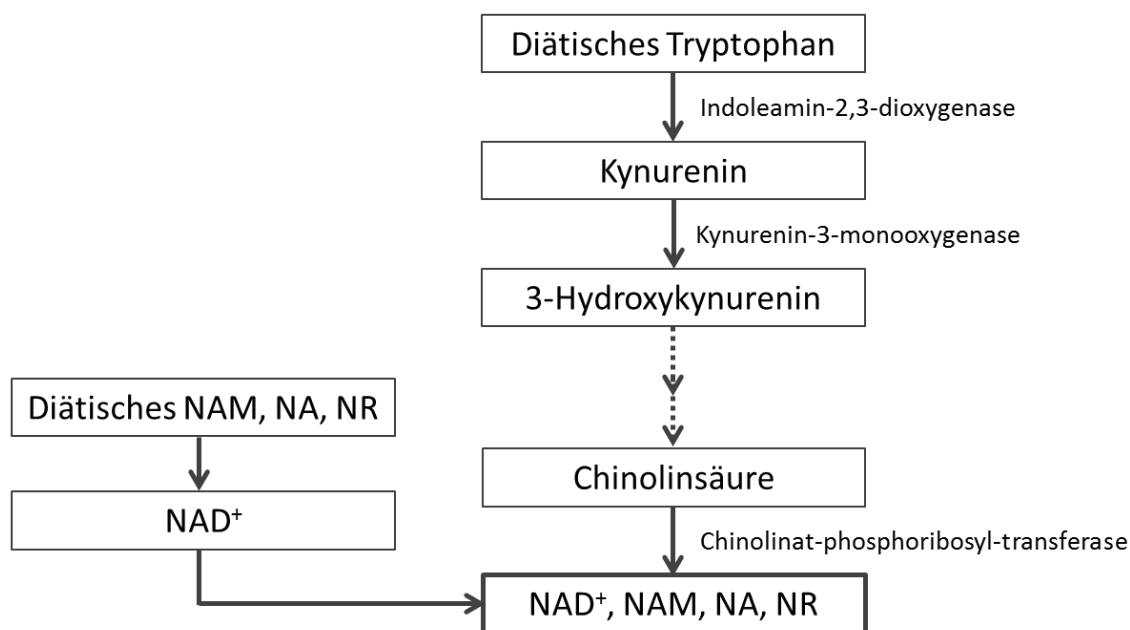


Abbildung 1.4: Der hepatische Kynurenin-Weg. Die Aminosäure Tryptophan wird durch Indoleamin-2,3-dioxygenase zu Kynurenin, über Kynurenin-3-monooxygenase zu 3-Hydroxykynurenin und über einige Zwischenschritte im Kynurenin-Weg zu Chinolinsäure umgewandelt. Daraus kann durch die Chinolinat-phosphoribosyl-transferase NAD^+ , NAM, NA und NR metabolisiert werden. Dieser Weg entspricht einer *de-novo*-Synthese von NA aus Tryptophan und ist die Alternative zur diätischen Aufnahme von NA. Das Schema wurde nach Viljoen et al. (2015) modifiziert.

Vor etwa 60 Jahren wurde entdeckt, dass NA eine zusätzliche vorteilhafte Eigenschaft aufweist: in hohen Grammbereich-Dosen senkt NA humanes Plasma-Cholesterin (Altschul et al., 1955). Durch weitere Forschung wurde bekannt, dass NA auch die Plasmawerte der atherogenen Lipoproteinklassen Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und Apolipoprotein A (Lp A) senkt. Zusätzlich erhöht NA den Plasmawert der schützenden Lipoproteinfraktionen HDL und HDL₂ und zählt zu den stärksten HDL-erhöhenden Wirkstoffen (Carlson, 2005). Mit diesen Eigenschaften kann das NA die Wirkung von cholesterinsenkenden Medikamenten, wie beispielsweise Statinen, verstärken und ist somit ein passender Kandidat für die Bekämpfung von Hyperlipidämie bei T2D und für die Bekämpfung des dem T2D übergeordneten metabolischen Syndroms. NA kann dieser Krankheit entgegenwirken, indem es Plasmalipidwerte senkt. NA wirkt sich günstig auf das Krankheitsbild von Patienten mit Hypercholesterinämie, niedrigen HDL-Cholesterinwerten und einem hohen Risiko für

kardiovaskuläre Erkrankungen aus (Brown, 2001; Taylor et al., 2004). Die genaue Wirkungsweise, wie NA die Plasmalipide senkt, ist jedoch noch nicht bekannt.

Schon seit der Erforschung der plasmalipidsenkenden Eigenschaft von NA wurde diese mit einer Inhibierung der Lipolyse erklärt (Carlson, 2005). Durch die Entdeckung des NA-Rezeptors GPR109A (Tunaru et al., 2003) wurde die gängige Erklärung der Lipolysehemmung durch NA bestärkt. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen inhibitorischen G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor, der sehr stark auf Adipozyten in WAT und BAT, in verschiedenen Immunzellen (Makrophagen, Langerhans-Zellen, Neutrophile) und in der Milz exprimiert ist (Soga et al., 2003). Es wird vermutet, dass NA über die Carboxylgruppe von GPR109A gebunden wird (Offermanns, 2006). NA und künstliche NA-Derivate, wie beispielsweise Acipimox und Niaspan, haben die Gemeinsamkeit einer Carboxylgruppe und alle drei Verbindungen aktivieren den GPR109A (Tunaru et al., 2005). Da der NA-Rezeptor GPR109A ein inhibitorischer G_i -Protein-gekoppelter Rezeptor (G_i -Rezeptor) ist, liegt nahe, dass NA einen lipolyse-inhibierenden Effekt in Zellen hat. Der G_i -Rezeptor GPR109A auf Adipozyten soll laut dieser Theorie von NA aktiviert werden (Abbildung 1.5). Dadurch wird die Adenylatzyklase inhibiert und das intrazelluläre cAMP-Niveau wird gesenkt (Offermanns, 2006). Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung der Proteinkinase A (PKA). Folglich werden die Lipase HSL und Perlipin 1A (PLIN 1A) nicht mehr phosphoryliert. Durch die fehlende Phosphorylierung bleibt HSL inaktiv (Holm et al., 2000). Das unphosphorylierte PLIN 1A kann die Assoziation von ATGL mit deren

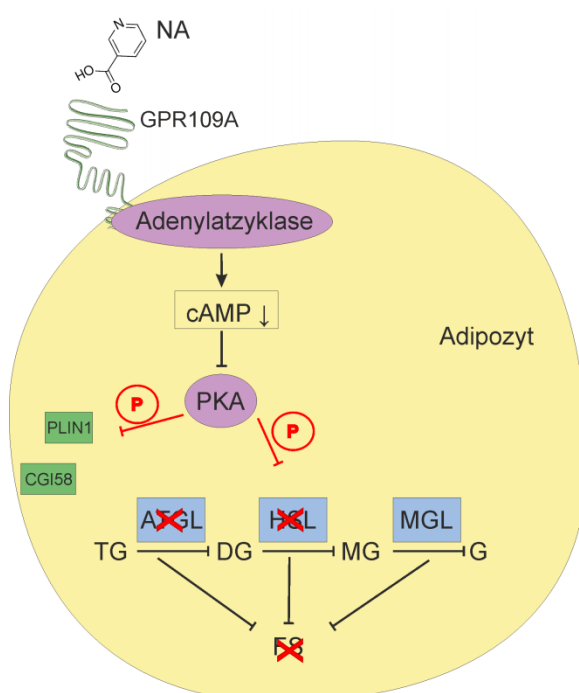


Abbildung 1.5: Schema der „NA-Wirkmechanismus-Hypothese“. NA bindet an den inhibitorischen GPR109A in Adipozyten, durch dessen Aktivierung wird die Adenylatzyklase gehemmt. Eine Verringerung des intrazellulären cAMP-Niveaus und Inaktivierung der Proteinkinase A (PKA) treten ein. Dadurch werden die Lipase *Hormone-sensitive Lipase* (HSL) und der Lipolysemediator Perilipin A (PLIN-A) nicht mehr phosphoryliert. HSL ist dadurch lipolytisch inaktiv. Außerdem kann PLIN-A den Koaktivator CGI-58 und dessen Lipase *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) nicht mehr zusammenführen. Dadurch kommt es zu einer Lipolysehemmung und Senkung der intrazellulären sowie zirkulierenden FS.

Koaktivatorprotein *Comparative gene identification-58* (CGI-58) nicht mehr stimulieren. Somit bleibt die hydrolytische TG-Spaltung nahezu vollständig aus (Lass et al., 2006).

Diese Theorie der Lipolyseinhibierung durch NA wurde bis dato in der Literatur sehr wenig erforscht. Bisher wurde eine leicht verringerte intrazelluläre cAMP-Konzentration als zellulärer Effekt von NA gezeigt (Tunaru et al., 2003, Baird, 1968). Eine tatsächliche Inhibierung der Lipolyse durch NA wurde jedoch nur durch Carlson (1963) veranschaulicht. Auch die Wirkungsweise des NA-Rezeptors konnte bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Unter anderem wurde der intrazelluläre Ligand des Rezeptors noch nicht identifiziert (Offermanns, 2006). Ferner wurde in einer Studie von Lauring et al. (2012) gezeigt, dass in GPR109A-defizienten Tieren nach NA-Verabreichung alle atherogenen Lipoproteinklassen und TG gesenkt und HDL-Werte im Plasma erhöht wurden. Der NA-Rezeptor ist infolgedessen nicht für die positive Veränderung des Lipoproteinprofils durch NA verantwortlich. Die einzige NA-Auswirkung, die durch die Abwesenheit des GPR109A ausblieb, war die Verringerung der Plasma-FS-Werte (Lauring et al., 2012). Diese Erkenntnis widerspricht der seit langem bestehenden „freien-FS-Hypothese“. Sie stellt eine Erklärung der NA-Wirksamkeit auf atherogene Lipoproteinklassen dar (Lauring et al., 2012), demnach hemmt NA die Lipolyse. Dadurch gelangen weniger Plasma-FS in die Zirkulation. Infolgedessen werden weniger FS von der Leber aufgenommen und eine geringere Menge an FS wird zu TG reesterifiziert. So kommt es zu einem reduzierten TG-Reservoir in der Leber. Je weniger hepatische TG produziert werden, desto weniger TG-reiche Lipoproteine der VLDL-Klasse werden aus der Leber freigesetzt. Je weniger VLDL in der Zirkulation sind, desto weniger dichte Lipoproteine LDL entstehen daraus. Eine weitere Auswirkung des reduzierten TG-Reservoirs in der Leber ist die reduzierte Expression der B-Ketten-ATP-Synthase in Hepatozyten. Diese ATP-Synthase ist ein mutmaßlicher HDL-Rezeptor. Kommt es zu einer verringerten Expression der ATP-Synthase, werden die HDL-Partikel langsamer aus der Zirkulation entfernt (Ginsberg & Reyes-Soffer, 2013; Kamanna et al., 2013). Die Auswirkung von NA auf die Plasmalipide und Plasmalipoproteine wird durch die „freie FS-Hypothese“ mit der Verringerung der zirkulierenden FS erklärt. Diese Erklärung wird jedoch durch die Ergebnisse der Studie von Lauring et al. (2012) mit GPR109A-defizienten Mäusen widerlegt, da die Senkung der atherogenen Lipoproteine laut dieser Studie weder vom GPR109A, noch von verringerten Plasma-FS-Werten abhängt.

1.7. Ziel dieser Arbeit

Da es wenige Beweise für den Zusammenhang der lipidsenkenden Eigenschaft von NA und einer Inhibierung der Lipolyse in Adipozyten gibt, ist das Ziel dieser Arbeit die Erforschung der Auswirkung von NA auf die Lipolyse. Der Effekt von NA auf Lipolyse wird *in-vitro* in verschiedenen Adipozytenzelllinien untersucht. Dazu wird die Lipolyse in murinen Adipozyten mithilfe des β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol stimuliert und die Auswirkung von NA auf die Lipolyse überprüft. Anschließend werden *ex-vivo*-Untersuchungen mit NA in murinem WAT durchgeführt, um zellverband-spezifische Effekte von NA aufzuzeigen. Dabei wird die Lipolyse in den Fettgewebsexplantaten mit Isoproterenol angeregt und anschließend der Effekt von NA auf die Lipolyse in den Explantaten überprüft. Zusätzlich werden Untersuchungen in lipase-defizienten Mausmodellen durchgeführt, um eine möglichen Lipaseunabhängigkeit des NA-Effekts zu überprüfen. Dazu werden AAKO-Mäuse, AHKO-Mäuse und DAKO-Mäuse mit NA behandelt. Die Erwartung ist, dass der plasmalipidsenkende Effekt von NA in diesen Mausmodellen beeinträchtigt ist, sofern NA die Lipolyse hemmt.

1.8. Nikotinamidribosid (NR)

NR ist ein weiteres NAD^+ -Vorläufermolekül, das über NAD^+ die Aktivität von einigen Sirtuinen (SIRT) begünstigt (Canto et al., 2012; Cettour-rose et al., 2013). Diese Enzyme können Histone, Transkriptionsregulatoren und metabolische Enzyme deazetylieren und sind daher Schlüsselregulatoren für den zellulären Energiemetabolismus. Zu ihnen gehören beispielsweise SIRT1 und SIRT3. Diese beiden Sirtuine haben die Fähigkeit, Lipidoxidation anzuregen und wirken somit metabolischen Erkrankungen wie T2D entgegen (Hirschey et al., 2013, Lagouge et al., 2006).

Die Auswirkung von NR auf die Lipolyse wurde bis dato nicht untersucht. Darüber hinaus bindet NR nicht an den GPR109A. Rezeptorspezifische Auswirkungen auf die Lipolyse können anhand einer Gegenüberstellung von NR und NA ermittelt werden. Deshalb stellt die Erforschung des NR-Effekts auf Lipolyse ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar. Die Experimente mit NR werden analog zu den NA-Versuchen durchgeführt. Die Untersuchung von NR kann Aufschluss darüber geben, ob NR ebenfalls Plasmalipide beeinflusst und ob dieser Vorgang über NAD^+ und SIRT geführt wird. Dadurch werden Ähnlichkeiten mit NA als NAD^+ -Vorläufer ersichtlich.

2. Materialien

2.1. Tiere

Die Haltung der Mäuse erfolgte bei einem regelmäßigen 14h-Licht/10h-Dunkelheit-Zyklus in thermostatisierten Räumen (21-23°C) in mit Sägespänen ausgelegten Kunststoffkäfigen. Die Tiere hatten uneingeschränkten *ad-libitum*-Zugang zu Wasser und kohlenhydratreicher *chow*-Diät (4,5% Fett, 34% Stärke, 5% Zucker und 22% Protein; Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland). Die C57BL/6J-Mäuse (Wildtyp) und Adiponectin-Cre^{+/}-Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) bezogen. Die ATGL^{flox/flox}-Mäuse wurden freundlicherweise vom Labor Erin Kershaw (Sitnick et al., 2013) zur Verfügung gestellt. Die HSL^{flox/flox}-Mäuse wurden von Günther Haemmerle am Institut für Molekulare Biowissenschaften an der Karl-Franzens-Universität Graz hergestellt (Haemmerle et al., 2002). Aus diesen Mauslinien wurden die adipozyten-spezifischen KO-Tiere AAKOs, AHKOs und DAKOs (Tabelle 2.1) am Institut für Molekulare Biowissenschaften an der Karl-Franzens-Universität Graz mithilfe des Rekombinationssystems Cre-loxP gezüchtet.

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Modellorganismen.

Modellorganismen			
Bezeichnung	Mauslinie	Quelle	Erkennung
C57BL/6J	C57BL/6J	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine	#000664
Adiponectin-Cre^{+/}	Adiponectin-Cre: B6; FVB- Tg(Adipoq-cre)1Evdr/J	(Eguchi et al., 2011), The Jackson Laboratory	#010803
ATGL^{flox/flox}	ATGL ^{flox/flox} : B6N.129S-Pnpla2tm1Eek/J	(Sitnick et al., 2013), The Jackson Laboratory	#024278
HSL^{flox/flox}	k.A.	(Haemmerle et al., 2002)	k.A.
AAKOs	ATGL ^{flox/flox} / Adiponectin-Cre ^{+/}	(Schoiswohl et al., 2015)	k.A.
AHKOs	HSL ^{flox/flox} / Adiponectin-Cre ^{+/}	Institut für molekulare Biowissenschaften, Graz	k.A.
DAKOs	ATGL ^{flox/flox} / HSL ^{flox/flox} / Adiponectin-Cre ^{+/}	Institut für molekulare Biowissenschaften, Graz	k.A.

Als Kontrolltiere wurden jeweils die Geschwister der KO-Tiere verwendet, die einen Wildtyp-Genotyp aufwiesen, dasselbe Alter und das gleiche Geschlecht wie die KO-Tiere hatten. In allen Experimenten wurden, sofern nicht anders angegeben, Tiere im Alter

zwischen 8-20 Wochen verwendet. Genaue Angaben sind den Abbildungsunterschriften zu entnehmen.

2.2. Zellen

Die Zellen wurden entweder von American Type Culture Collection (ATCC®) bezogen oder aus dem inguinalen WAT (ingWAT) von C57BL/6J-Mäusen isoliert.

- i. 3T3-L1-Fibroblasten (ATCC® CL-173™, Maus)
- ii. H9c2-Kardiomyoblasten (ATCC® CRL-1446™, Ratte)
- iii. Primäre Adipozyten der stromavaskulären Fraktion aus ingWAT von C57BL/6J-Mäusen.

2.3. Gefäße

Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml), sterile Falconröhrchen, Kulturplatten, sterile Stripetten, Pipettenspitzen, 96-Well-Mikrotiterplatten, Zellkulturflaschen sowie 24-Well-, 12-Well- und 6-Well-Platten wurden von der Firma Greiner (Kremsmünster, Österreich) und die Szintillationgefäße von der Firma Perkin Elmer (Boston, USA) bezogen. Alle Glasgefäße wurden von der Firma Lactan (Graz, Österreich) angeschafft.

2.4. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Die Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „p.A. - per Analysis“ verwendet. Die Substanzen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri), Merck (Whitehouse Station, USA), Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts), Bio-Rad Laboratories GesmbH (Hercules, Kalifornien), Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond, Virginia), Pierce® (Waltham, Massachusetts) Abcam Plc. (Cambridge, Großbritannien), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Fresenius Kabi (Graz, Österreich) bezogen. Organische Lösungsmittel stammen von der Firma Bartelt (Graz, Österreich). Die radioaktiv markierten Substanzen wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die Herstellung von Lösungen und Puffern erfolgte mit deionisiertem Wasser (dH₂O).

- i. Aufschlusspuffer I (HSL-Puffer): 0,25 M Saccharose, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.
- ii. Aufschlusspuffer II (RIPA-Puffer, *Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer*): 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 1% Triton-X-100, 1% Natriumdeoxycholat, 5 mM EDTA, pH 7,4.
- iii. 1,4-Dithiothreitol (DTT, #10197777001).
- iv. 0,3 N NaOH-0,1% SDS-Lyselösung.
- v. Chloroform (#CL00.0376).
- vi. Protease-Inhibitor-Stocklösung (1.000x in DMSO; 1 mg/ml Pepstatin, 2 mg/ml Antipain, 20 mg/ml Leupeptin).
- vii. Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2 und 3 (#P5726 und #P0044).
- viii. *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (#5000006). Dieses Konzentrat wurde in einem Verhältnis 1:5 mit dH₂O vermischt und als Arbeitsreagenz (AR) bezeichnet.
- ix. *Bovine Serum Albumine* (BSA, #A4612).
- x. BSA-Proteinstandardlösung (2 mg/ml, #23209).
- xi. *Free Glycerol Reagent* (#F6428).
- xii. *Glycerol Standard Solution* (0,26 mg/ml, #G7793).
- xiii. *Infinity™ Triglycerides Reagent* (#TR22421).
- xiv. *HR Series NEFA-HR* (#999-34691, #999-34891 und #999-35191).
- xv. Wako NEFA-Standard (1mg/ml, #270-77000).
- xvi. Wellion CALLA *light* Blutglukosemeter (MED TRUST Handelsges.m.b.H., Eisenstadt, Österreich).
- xvii. Nikotinsäure (#N4126).
- xviii. Nikotinamidribosid (Novalix Pharma, Illkirch, Frankreich).
- xix. Dimethylsulfoxid (DMSO, #D8418).
- xx. Isoproterenol (2,5 mg/ml in ddH₂O).
- xxi. Physiologische Kochsalzlösung (0,9%, wt/v).
- xxii. Injektions-Pufferlösung: 94 mM Tris-HCl in 0,54% physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4.
- xxiii. Stopplösung (*in-vitro*-TGH-Assay): Methanol/Chloroform/Heptan (10/9/7; v/v/v).

- xxiv. 0,1 M Kaliumphosphatpuffer für 10 ml: 385 µl KH₂PO₄ (1 M), 615 µl K₂HPO₄ (1 M), 9 ml ddH₂O, pH 7.
- xxv. Albumin Fraktion V (#8076.1).
- xxvi. Triolein (100 mg/ml).
- xxvii. Phosphatidylcholin/Phosphatidylinositol-Mix (20 mg/ml).
- xxviii. ¹⁴C-Ölsäure (#MC406250).
- xxix. ³H-Ölsäure (#MT9175).
- xxx. ³H-Triolein (#01995).
- xxxi. 0,1 M Kaliumkarbonatpuffer für 100 ml: 1,38 g K₂CO₃ in 98,6 ml ddH₂O, pH 10,5 (der pH-Wert wird mit Borsäure eingestellt).
- xxxii. SDS-Probenpuffer: Stocklösung (6x; 0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 10% β-Mercaptoethanol (v/v), 8% SDS, 40% Glyzerin, Spatelspitze Bromphenolblau).
- xxxiii. 10%-Trenngel für 30 ml: 12,3 ml ddH₂O, 7,5 ml *Lower Buffer* (pH 8,8), 9,9 ml Acrylamid, 300 µl 10%-SDS, 27 µl TEMED, 81 µl APS.
- xxxiv. 4,5%-Sammelgel für 3 ml: 1,77 ml ddH₂O, 0,75 ml *Upper Buffer* (pH 6,8), 0,45 ml Acrylamid, 30 µl 10%-SDS, 3,9 µl TEMED, 12 µl APS, 4,5 µl Bromphenolblau (0,5%).
- xxxv. SDS-PAGE-Laufpuffer (10x; 200 mM Tris-HCl, 1,6 M Glycin, 0,83% SDS).
- xxxvi. Proteinstandard: *Color Prestained Protein Standard, Broad Range* (11–245 kDa, #P7712L, NEB, Ipswich, Massachusetts).
- xxxvii. N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure-(CAPS)-Transfer-Puffer: 10 mM CAPS, 10% Methanol, pH 11,0.
- xxxviii. TST-Puffer: Stocklösung (10x; 1% Tween-20, 1,5 M Natriumchlorid, 500 mM Tris-HCl pH 7,4).
- xxxix. Blockierlösungen: 10%-iges Milchpulver in 1x-TST-Puffer oder 5%-iges BSA in 1x-TST-Puffer.
- xl. Substrat für *ChemiDoc™ Touch Imaging System: Luminol/Enhancer-Solution* und *Peroxide-Solution (Clarity™ Western ECL Substrate* und *Clarity Max™ Western ECL Substrate)* (#1705061 und #1705062).
- xli. Adipozyten-Isolierungspuffer: Collagenase D (1,5 mg/ml, 0,29 U/mg, #10 103 586 001, Roche Diagnostics GmbH, Wien, Österreich), 15 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 3,2 mM Kalziumchlorid, 0,025% BSA.
- xlii. Erythrozyten-Lysierungspuffer: 154 mM Ammoniumchlorid, 10 mM Kaliumhydrogenkarbonat, 0,1 mM EDTA, pH 7,4).

2.5. Materialien für Zellkulturarbeit

Die Materialien zur Zellanzucht wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Thermo Fisher Scientific, Abteilung Gibco-Invitrogen (Waltham, Massachusetts) und Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) bezogen.

- i. *Phosphate buffered saline* (PBS)-Puffer: (1x; 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 4,3 mM Natriumhydrogencarbonat, 1,4 mM Kaliumhydrogencarbonat, pH 7,4).
- ii. 0,5% - Trypsin + EDTA (#T3924).
- iii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).
- iv. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 1 g/l Glukose (#12320032).
- v. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/F-12, GlutaMAX™-Zusatz), 4,5 g/l Glukose (#10565018).
- vi. fötales Kälberserum (FCS, #12133C).
- vii. Dexamethason in Ethanol (#D4902).
- viii. 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, in DMSO, #I5879).
- ix. Insulin (in ddH₂O, human, rekombinant exprimiert in Hefe, #I2643).
- x. Antibiotikallösung (1x, Penicillin und Streptomycin, #P4333).
- xi. Primocin (500x, #ant-pm-1, Invivogen, San Diego, Kalifornien).
- xii. Rosiglitazon (in DMSO, #R2408).
- xiii. Retinsäure (Stock: 1 µM Retinsäure in 100% Ethanol), lichtgeschützt bei 20°C aufbewahren und nach Gebrauch mit Inertgas überschichten.
- xiv. Dimethylsulfoxid (DMSO, #D8418).

2.5.1. Medienzusammensetzung

Vollmedium

- i. 10% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).

Minimalmedium I

- i. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).

Minimalmedium II

- i. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 1 g/l Glukose (#12320032).

Induktionsmedium für 3T3-L1-Adipozyten

- i. 10% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).
- iii. Dexamethason (Endkonzentration (EK): 0,4 µg/ml in Ethanol, #D4902).
- iv. 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 500 µM in DMSO, #I5879).
- v. Insulin (EK: 10 µg/ml in ddH₂O, human, rekombinant exprimiert in Hefe, #I2643).

Wartungsmedium I für 3T3-L1-Adipozyten

- i. 10% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).
- iii. Insulin (EK: 10 µg/ml in ddH₂O, human, rekombinant exprimiert in Hefe, #I2643).

Wartungsmedium II für 3T3-L1-Adipozyten

- i. 10% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).
- iii. Insulin (EK: 0,2 µg/ml in ddH₂O, human, rekombinant exprimiert in Hefe, #I2643).

Induktionsmedium für Präadipozyten aus der stromavaskulären Fraktion

- i. 10% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/F-12, GlutaMAX™-Zusatz), 4,5 g/l Glukose (#10565018).
- iii. Antibiotikallösung (1x, Penicillin und Streptomycin, #P4333).
- iv. Primocin (#ant-pm-1, Invivogen, San Diego, Kalifornien).
- v. Dexamethason (1 µM in Ethanol, #D4902).
- vi. 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 500 µM in DMSO, #I5879).
- vii. Insulin (EK: 5 µg/ml in ddH₂O, human, rekombinant exprimiert in Hefe, #I2643).
- viii. Rosiglitazon (1 µM in DMSO, #R2408).

Wartungsmedium für Präadipozyten aus der stromavaskulären Fraktion

- i. 10% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/F-12, GlutaMAX™-Zusatz), 4,5 g/l Glukose (#10565018).
- iii. Antibiotikallösung (1x, Penicillin und Streptomycin, #P4333).
- iv. Primocin (#ant-pm-1, Invivogen).
- v. Insulin (EK: 2,5 µg/ml in ddH₂O, human, rekombinant exprimiert in Hefe, #I2643).

Differenzierungsmedium für H9c2-Kardiomyozyten

- i. 1% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).
- iii. 10 nM Retinsäure (Stock: 1 µM Retinsäure in 100% Ethanol), lichtgeschützt bei -20°C aufbewahren und nach Gebrauch mit Inertgas überschichten.

Experimentmedium für Adipozytenversuche (basal)

- i. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).
- ii. 2% BSA (#12133C).

Gefriermedium

- i. 10% fötales Kälberserum (#12133C).
- ii. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose (#11965084).
- iii. 20% Dimethylsulfoxid (DMSO, #D8418).

2.6. Inhibitoren

- i. ATGL-Inhibitor Atglistatin® (Mayer et al., 2013, „Ai“, 40 mM-Stock in DMSO, bereitgestellt von Rolf Breinbauer, TU Graz).
- ii. HSL-Inhibitor (Schweiger et al., 2006, „Hi“, 25 mM-Stock in DMSO, bereitgestellt von Novo Nordisk, Bagsværd, Dänemark).

2.7. Antikörper

Alle Antikörper wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Cell signaling (Milton, Cambridge), Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas) und Abcam Plc. bezogen.

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Protein	Bestellnr. #	Wirt	Molekular- gewicht	Verdünnung	Inkubation	Inkubations -temp.
GAPDH	2118	Kaninchen	35 kDa	1:10.000 in 5%-iger Milchlösung	2 h	RT
ATGL	2138S	Kaninchen	54 kDa	1:1.000 in 5%-iger Milchlösung	über Nacht	4°C
phospho- HSL-Ser⁶⁶⁰	4126	Kaninchen	81/83 kDa	1:1.000 in 5%-iger BSA-Lösung	2 h	RT
HSL	4107	Kaninchen	81/83 kDa	1:1.000 in 5%-iger BSA-Lösung	2 h	RT
phospho- ERK 1/2 (=phospho- p44/42 MAPK)	9101S	Kaninchen	44/42 kDa	1:1.000 in 5%-iger BSA-Lösung	über Nacht	4°C
ERK 1/2 (=p44/42 MAPK)	9102S	Kaninchen	44/42 kDa	1:1.000 in 5%-iger BSA-Lösung	über Nacht	4°C
HM74	sc-377292	Maus	35 kDa	1:1.000 in 5%-iger BSA-Lösung	über Nacht	4°C
Kaninchen +HRP- Markierung	7074	Ziege	sekundärer Antikörper	1:10.000 in 5%-iger Milchlösung	1 h	RT

3. Methoden

3.1. *In-vivo*-Studien

3.1.1. Zucht und Haltung

Alle Tiere wurden bei regulären Haltungstemperaturen (21-23°C) und 14h-Licht/10h-Dunkelheit-Zyklen gezüchtet und gepflegt. Für physiologische Fastenexperimente zur Induktion der Lipolyse wurden die C57BL/6J-Tiere über Nacht für 15 h von 18 Uhr des Vorabends bis 9 Uhr des nächsten Morgens gefastet. Lipase-defiziente Tiere (AAKO und AHKO) sowie deren Kontrolltiere wurden für 6 h von 8 Uhr bis 14 Uhr desselben Tages gefastet. Die Mäuse hatten in der Fastenzeit lediglich Zugang Wasser. DAKOs und deren Kontrolltiere wurden im *ad-libitum*-gefütterten Zustand untersucht. Für physiologische *refed*-Status-Experimente wurden die Tiere für 15 h von 18 Uhr des Vorabends bis 9 Uhr des nächsten Morgens gefastet und danach für 2 h gefüttert.

Für die Untersuchungen der Auswirkung von NA *in-vivo* wurden C57BL/6J-Mäuse und lipase-defiziente Mäuse verwendet (Tabelle 2.1). Zu den verwendeten lipase-defizienten Mäusen zählen AAKO-Mäuse des $ATGL^{flox/flox}/Adiponectin-Cre^{+/-}$ -Genotyps. Als Kontrolltiere wurden deren Geschwister, somit $ATGL^{flox/flox}$ -Mäuse verwendet, da diese denselben genetischen Hintergrund wie AAKO-Tiere ohne den genetischen KO aufweisen. Außerdem wurden AHKO-Mäuse des $HSL^{flox/flox}/Adiponectin-Cre^{+/-}$ -Genotyps und deren Geschwistertiere $HSL^{flox/flox}$ analog zu dem AAKO-Versuchsaufbau verwendet. Die DAKO-Tiere haben den Genotyp $ATGL^{flox/flox}/HSL^{flox/flox}/Adiponectin-Cre^{+/-}$. Als Kontrollen für diese Tiere wurden Mäuse desselben genetischen Hintergrundes ($ATGL^{flox/flox}/HSL^{flox/flox}$) verwendet, die jedoch keine Geschwister der DAKOs waren.

3.1.2. Injektion, Blutentnahme und Prozessierung

Die Behandlungen wurden direkt nach den Fastenzeiten (C57BL/6J: 9 Uhr, AAKOs/AHKOs: 14 Uhr, DAKOs: 9 Uhr) durchgeführt. Eine basale Blutabnahme wurde mit einer heparinisierten, EDTA-benetzten Kapillare über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Dann wurde NA in einer Dosis von 50 μ mol und 300 μ mol/kg Körpergewicht oder NR in einer Dosis von 300 und 900 μ mol/kg Körpergewicht entweder intraperitoneal oder intravenös verabreicht. Als Kontroll- beziehungsweise Verdünnungslösung für NA und NR diente in den frühen Experimenten 0,9%-ige physiologische Kochsalzlösung. In späteren Experimenten wurde Tris/HCl-Puffer in physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4) verwendet, um den pH-Wert der sauren NA-Lösung zu neutralisieren (Kapitel 3.1.4.).

Zum Zeitpunkt 0 min wurde die Kontroll-, NA- oder NR-Lösung injiziert. Nach 20, 60 und 120 min wurden Blutabnahmen mit heparinisierten, EDTA-benetzten Kapillaren über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Alle Blutproben wurden sofort auf Eis gelagert und nach Beendigung des Experimentes für 15 min bei 5.000 x rpm und 4°C zentrifugiert. So wurde das Blutplasma vom Blutkuchen abgetrennt, der die Blutzellen enthielt (Abbildung 3.1). Das Blutplasma wurde vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend für kolorimetrische FS-, Glycerol, TG-Messungen sowie für Glukosemessungen herangezogen (Kapitel 3.4.7.) oder bei -80°C gelagert.

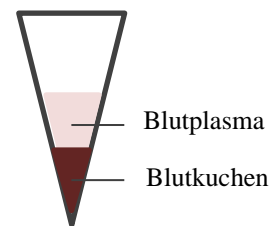


Abbildung 3.1: Trennung der Blutbestandteile nach Zentrifugation. Die Proben wurden bei 5.000 rpm, 4°C, für 15 min zentrifugiert. Das Blutplasma befand sich danach im Überstand.

3.1.3. Gewebeentnahme mit terminaler Blutabnahme

Für die Untersuchung der Auswirkung von NA auf einzelne Gewebe wurden diese 20 min nach der NA-Verabreichung entnommen, um den „*Status quo*“ der Wirkung von NA auf die Gewebe festzuhalten. Dazu wurde die Mäuse mit Isofluran (Baxter, Deerfield, Illinois) anästhesiert. Danach wurde eine terminale Blutabnahme mit einer heparinisierten, EDTA-benetzten Kapillare über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Das Blutplasma wurde, wie in Kapitel 3.1.2. beschrieben, vom Blutkuchen abgetrennt. Den Mäusen wurde durch eine zervikale Dislokation das Leben genommen und sie wurden anschließend seziiert. Unmittelbar danach wurden epididymales WAT (epiWAT), inguinales WAT (ingWAT) und BAT sowie Leber und Quadrizeps entnommen. Die einzelnen Gewebe wurden sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem N₂ schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden Blutplasma und die Gewebe bei -80°C gelagert.

3.1.4. Herstellung der Injektionslösungen

Die Injektionslösungen wurden für Untersuchungen mit NA in einer Dosis von 50 µmol/kg und 300 µmol/kg Körpergewicht und für Experimente mit NR in einer Dosis von 300 µmol/kg und 900 µmol/kg Körpergewicht hergestellt.

Formel 1: Berechnung der Molarität von NA- und NR-Lösungen. Die Molarität der Injektionslösungen wurde für eine Konzentration von 300 µmol/kg Körpergewicht und ein Injektionsvolumen von 200 µl berechnet. Das Körpergewicht einer Maus wurde dabei für 25 g angenommen.

300 µmol/kg Körpergewicht.....	7,5 µmol/Maus (25 g)
7,5 µmol in 200 µl Injektionsvolumen.....	37,5 µmol/ml $\hat{=}$ 37,5 mmol/l $\hat{=}$ 37,5 mM

NA oder NR wurden entweder in 0,9%-iger physiologischer Kochsalzlösung (Tabelle 3.1, ungepuffert) oder in Tris/HCl-Puffer (Tabelle 3.1; pH 8,0; gepuffert) gelöst, sodass sich eine Molarität von 100 mM ergab. Anschließend wurden diese Lösungen in physiologischer Kochsalzlösung auf die einzusetzenden Konzentrationen verdünnt, damit wurde ein pH-Wert von 7,4 erreicht (Tabelle 3.1). Die Dosis 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht entspricht einer Molarität von 37,5 mM der Injektionslösung für eine Maus mit dem Körpergewicht von 25 g und einem Injektionsvolumen von 200 μl (Formel 1).

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Injektionslösungen für *in-vivo*-Experimente. Die Lösungen wurden ungepuffert und gepuffert hergestellt. Die Stocklösungen (100 mM NA/NR-Lösung) wurden jeweils in 0,9%-iger physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um die 37,5 mM-NA/NR-Lösungen zu erhalten. Die Kontrolllösungen entsprachen der Zusammensetzung der NA/NR-Lösungen ohne Zusatz von NA/NR.

	Stocklösungen	NA/NR-Lösung	Kontrolllösung
un gepuffert	- 100 mM NA/NR-Lösung in 0,9% NaCl - 0,9% NaCl	37,5 mM in 0,9% NaCl, Verdünnung in 0,9% NaCl	0,9% NaCl
gepuffert	- 100 mM NA/NR-Lösung in 250 mM Tris/HCl-Puffer - 250 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0	37,5 mM in 94 mM Tris/HCl-Puffer, Verdünnung in 0,9% NaCl, pH 7,4	94 mM Tris/HCl-Puffer, Verdünnung in 0,9% NaCl, pH 7,4

3.2. *In-vitro*-Versuche

3.2.1. Zellkultur allgemein

Für die *in-vitro*-Experimente mit Zellen wurden hauptsächlich Adipozyten verwendet, da in dieser Arbeit die Auswirkung von NA und NR auf die Lipolyse untersucht wurde. Dafür kamen murine 3T3-L1-Adipozyten und primäre murine Adipozyten aus der stromavaskulären Fraktion zur Verwendung. Zusätzlich wurden H9c2-Kardiomyozyten für Analysen verwendet. Die *in-vitro*-Experimente mit den Metaboliten NA und NR wurden, sofern nicht anders angegeben, mit differenzierten Zellen durchgeführt.

Anzucht und Passagieren der Zellen

Die Zellen für die *in-vitro*-Versuche wurden in einer 175-cm²-Kulturflasche mit 17 ml Vollmedium gezüchtet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, bei kontrolliertem CO₂-Gehalt und Luftfeuchte (7% CO₂, 90% Luftfeuchte) inkubiert. Sobald die Zellen in Kultur eine etwa 30 bis 40%-ige Konfluenz aufwiesen, wurden sie durch einen Passagiervorgang verdünnt. Damit wurde ein weiteres Wachstum ermöglicht und eine Inhibierung der Differenzierung durch Zell-Zell-Kontakt verhindert. Dazu wurde das alte Medium entfernt und die Zellen einmal mit 1x-PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 37°C im Inkubator mit einem Volumen von 1,5 bis 2 ml 0,5%-Trypsin+EDTA inkubiert, sodass der Flaschenboden bedeckt war. Mithilfe des Trypsins wurden die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst. Durch Zugabe von fünffachem Überschuss an Vollmedium wurde der Trypsinverdau gestoppt. Die Zellsuspension wurde danach in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur (RT) und 1.200 x g für 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in Vollmedium vorsichtig resuspendiert. Danach wurden die resuspendierten Zellen in 175cm²-Zellkulturflaschen mit 17 ml Vollmedium überführt und bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Zweitagesrhythmus jeweils in einem 1:6-Passagiervorgang verdünnt.

Zellernte

Um die Zellen von den Kulturplatten zu ernten, wurde das Wachstumsmedium entfernt, danach wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit 1x-PBS-Puffer gewaschen und im Anschluss in je 300 µl (für 12-*Wells*) oder 500 µl (für 6-*Wells*) 1x-PBS-Puffer gelöst, mit einem Zellschaber vom *Well* geschabt und in Reaktionsgefäßen gesammelt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen für 10 min bei 1.200 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und die Zellpellets wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Eine andere Möglichkeit der Zellernte besteht darin, die Zellen zweimal mit 1x-PBS-Puffer zu waschen und danach direkt mit 30 µl 1x-SDS-Puffer zu ernten und zu denaturieren.

Kryokonservierung

Um einen Vorrat der Zellen anzulegen, wurde eine Kryokonservierung der Zellen in möglichst niedriger Passage durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils in der für eine 175 cm²-Kulturflasche passenden Menge eingefroren.

Dazu wurden 500 µl der in Vollmedium suspendierten Präadipozyten mit 500 µl Gefriermedium (20% DMSO) zügig in Kryoröhrchen pipettiert, da durch Verdünnung des Gefrierschutzes DMSO Reaktionswärme entsteht. DMSO wirkt außerdem zytotoxisch, deshalb musste bei der Kryokonservierung schnell gearbeitet werden. Bei der Mischung von Zellen und Gefriermedium wurde eine Endkonzentration von 10% DMSO erhalten. Außerdem wurden die Kryoröhrchen sofort in spezielle, vorgekühlte und mit Isopropanol gefüllte Gefrierboxen platziert und zunächst bei -80°C und dann in flüssigem Stickstoff gelagert, um eine hinreichende Konservierung sicherzustellen.

3.2.2. Arbeit mit Zelllinien

Auftauen der Zellen

Beim Auftauen der 3T3-L1- und H9c2-Zellen muss beachtet werden, dass dabei viele Zellen absterben. Nachdem die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff geholt wurden, wurden sie deshalb im Kryoröhrchen rasch aufgetaut, bis noch ein kleiner Anteil der Zellen gefroren war. So wurde eine Kühlung der Zellen sichergestellt. Die Zellsuspension wurde zügig in einen Falcon mit 11 ml Vollmedium pipettiert und für 3 min bei RT und 1.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet wurde in Vollmedium resuspendiert und in eine 175-cm²-Kulturflasche zur Kultivierung überführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, bei kontrolliertem CO₂-Gehalt und Luftfeuchte (7% CO₂, 90% Luftfeuchte) inkubiert.

Differenzierung der Zelllinien

Charakteristisch für die Zellkulturarbeit mit 3T3-L1-Adipozyten und H9c2-Kardiomyozyten ist die vorherige Differenzierung von Präadipozyten (Fibroblasten) beziehungsweise Kardiomyoblasten, sobald die Zellpopulation konfluent ist.

3T3-L1-Adipozyten

Die 3T3-L1-Zellen wurden für die Differenzierung zuallererst zu je 2*10⁵ Zellen/*Well* in 6-*Well*-Platten oder zu je 1*10⁵ Zellen/*Well* in 12-*Well*-Platten ausgesät und weiter kultiviert, bis sie eine 100%-ige Konfluenz erreichten. Dies geschah nach etwa 1 bis 2 Tagen. Der Zeitpunkt 0 der Differenzierung wurde am zweiten postkonfluenten Tag angesetzt. An diesem Tag wurde die Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten mit einem Standardprotokoll begonnen. Dafür wurden die Präadipozyten an Zeitpunkt 0 mit einem Induktionsmedium für 3T3-L1-Adipozyten modifiziert. Am dritten Tag wurde das Induktionsmedium gegen das

Wartungsmedium I zur Kultivierung der 3T3-L1-Zellen ausgetauscht. Ab Tag 5 wurde das Wartungsmedium II zur Kultivierung verwendet. Die Präadipozyten wurden bis Tag 8 zu Adipozyten differenziert.

H9c2-Kardiomyozyten

Die H9c2-Zellen wurden zuallererst zu je $2 \cdot 10^5$ Zellen/*Well* in 6-*Well*-Platten ausgesät und weiter kultiviert, bis sie eine 100%-ige Konfluenz erreichten. Dies geschah nach etwa 2 bis 3 Tagen. Die H9c2-Kardiomyoblasten wurden, wie bei Branco et al. (2015) beschrieben, differenziert. Dafür wurden die H9c2-Zellen für 6 Tage mit dem Differenzierungsmedium für H9c2-Kardiomyozyten modifiziert. Dieses enthält 1% fötales Kälberserum und 10 nM Retinsäure.

3.2.3. Arbeit mit Primärkulturen

Isolierung von Zellen aus murinem Fettgewebe

Die primären Adipozyten wurden in Form von Vorläuferzellen aus der stromavaskulären Fraktion des ingWAT von C57BL/6J-Mäusen isoliert. Dafür wurde ein Adipozyten-Isolierungspuffer hergestellt, der anschließend sterilfiltriert (0,45 μm , Nalgene™ Syringe Filter, #723-2545, Thermo Fisher Scientific) wurde. Das ingWAT einer Maus wurde mit 5 ml des Adipozyten-Isolierungspuffers für etwa 45-50 min bei 37°C und 110 x rpm im Schüttelinkubator verdaut. Die Verdaususpension wurde mit 30 ml Vollmedium versetzt, um die Collagenase D durch einen Proteinüberschuss zu inaktivieren. Danach wurde die Suspension durch einen 100 μm -*cell strainer* filtriert und bei RT für 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Daraufhin wurde der entstandene Überstand entfernt. Das am Gefäßboden befindliche Pellet wurde in 1 ml Erythrozyten-Lysierungspuffer resuspendiert. In einer zweiminütigen Inkubation wurden die Erythrozyten lysiert. Die Reaktion wurde mit 20 ml Vollmedium abgestoppt, danach wurde die Suspension durch einen 40 μm -*cell strainer* filtriert und nochmals für 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die Adipozytenvorläuferzellen, die anschließend in Vollmedium resuspendiert und ausgesät wurden (etwa ein 100 mm-*dish* mit 10 ml Vollmedium für 2 ingWAT-Depots).

Differenzierung von primären Adipozyten

Die Präadipozyten wurden für die Differenzierung zuallererst in 12-*Well*-Platten ausgesät. Dabei genügte ein ingWAT-Depot für die Aussaat von etwa 7 12-*Wells*. Danach wurden die

Zellen kultiviert, bis sie eine 100%-ige Konfluenz erreichten. Dies geschah nach etwa 1 bis 2 Tagen. Der Zeitpunkt 0 der Differenzierung wurde am zweiten postkonfluenten Tag angesetzt. An diesem Tag wurde die Differenzierung der Präadipozyten aus der stromavaskulären Fraktion zu Adipozyten begonnen. Dafür wurden die Präadipozyten an Zeitpunkt 0 mit einem Induktionsmedium für Präadipozyten aus der stromavaskulären Fraktion modifiziert. Ab dem zweiten Tag wurde das Wartungsmedium verwendet. An Tag 5 und 7 wurde jeweils das Wartungsmedium erneuert. Die Präadipozyten wurden bis Tag 8 zu primären Adipozyten differenziert.

3.2.4. Untersuchung der Lipolyse in Adipozyten

Um die zellautonome Auswirkung von NA oder NR auf die intrazelluläre Lipolyse in Adipozyten zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Lipolyseexperimente durchgeführt. Für die Untersuchung wurden differenzierte 3T3-L1-Adipozyten oder murine primäre Adipozyten verwendet. Als Positivkontrolle einer Lipolysehemmung wurden die beiden Inhibitoren Atglistatin® (Ai, Mayer et al., 2013) und HSL-Inhibitor (Hi, Schweiger et al., 2006) eingesetzt.

Zuerst wurde eine einstündige Vorinkubation I mit den beiden Inhibitoren Ai und Hi (40 μ M und 10 μ M Endkonzentration) in Minimalmedium I durchgeführt. Anschließend wurde eine 30-minütige Vorinkubation II mit 10 μ M Isoproterenol in Experimentmedium zur Stimulierung der Lipolyse durchgeführt, als Positivkontrollen einer Lipolyseinhibierung wurden die Inhibitoren Ai und Hi dazugegeben. Danach fand eine Hauptinkubation für 1 h analog zur Ausführung wie Vorinkubation II und zusätzlich in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von NA oder NR statt (Tabelle 3.2).

Das Experimentmedium wurde anschließend abgehoben, darin wurden die freien FS und Glycerol als Lipolyseparameter bestimmt (Kapitel 3.4.7.). Die behandelten Zellen wurden dreimal mit 1xPBS-Puffer gewaschen und für 4 h in einer 0,3 N NaOH-0,1% SDS-Lyselösung lysiert. Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurden mittels Pierce® BCA-Protein-Assay gemessen (Kapitel 3.4.2.), um die FS- und Glycerolwerte auf die Proteinkonzentrationen beziehen zu können [nmol/mg Protein]. Die erhaltenen Werte dienen als Parameter der Lipolyse.

Tabelle 3.2: Inkubationsschema der *in-vitro*-Lipolyseexperimente mit NA und NR. Die Adipozyten wurden in Vorinkubation I mit Minimalmedium I und den Inhibitoren Ai (40 μ M) oder Hi (10 μ M) inkubiert. In Vorinkubation II wurden die Zellen in Experimentmedium mit Inhibitoren und mit dem Lipolysestimulant Isoproterenol (10 μ M) inkubiert (Ausnahme: Basale Inkubation ohne Isoproterenol). In der Hauptinkubation wurden dieselben Bedingungen wie in Vorinkubation II angewandt, zusätzlich wurde NA oder NR (je 0,05; 0,1; 0,5; 1 mM) hinzugefügt. Alle Inkubationen wurden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt.

	Basal	Stimuliert	Kontrollen	NA/NR
Vorinkubation I (1 h)	Minimalmedium I ohne BSA			
	-	-	+ Ai oder Hi	-
Vorinkubation II (30 min)	Experimentmedium			
	- Isoproterenol	+ Isoproterenol	+ Isoproterenol + Ai oder Hi	+ Isoproterenol
Hauptinkubation (1 h)	Experimentmedium			
	-	+ Isoproterenol	+ Isoproterenol	+ Isoproterenol
	-	-	+ Ai oder Hi	+ NA oder NR (0,05; 0,1; 0,5; 1 mM)

3.2.5. Titrationsexperiment mit einem β -Adrenozeptor-Agonisten

Das Titrationsexperiment wurde durchgeführt, um das Stimulationsmaximum der Lipolyse durch den β -Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol zu ermitteln. Für den Versuch wurden differenzierte 3T3-L1-Adipozyten verwendet. Die Adipozyten wurden in einer Vorinkubation für 30 min in Experimentmedium mit acht unterschiedlichen Konzentrationen an Isoproterenol (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 μ M) inkubiert. Anschließend wurde die Hauptinkubation in derselben Medienzusammensetzung für 60 min durchgeführt. Das Experimentmedium wurde anschließend abgehoben, darin wurden die freien FS und Glyzerol als Lipolyseparameter bestimmt (Kapitel 3.4.7.). Die Adipozyten wurden dreimal mit 1xPBS-Puffer gewaschen und für 4 h in einer 0,3 N NaOH-0,1% SDS-Lyselösung lysiert. Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurden mittels Pierce® BCA-Protein-Assay (Kapitel 3.4.2.) gemessen. Folglich wurden die FS- und Glyzerolwerte auf die Proteinkonzentrationen normalisiert [nmol/mg Protein]. Die erhaltenen Werte dienten als Parameter der Lipolyse.

Tabelle 3.3: Inkubationsschema des Titrationsexperiments mit Isoproterenol. Die Adipozyten wurden für Vorinkubation mit Experimentmedium und 2% BSA sowie mit acht Konzentrationen Isoproterenol inkubiert (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 μM). In der Hauptinkubation wurden dieselben Bedingungen wie in der Vorinkubation angewandt. Alle Inkubationen wurden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt.

	Basal	Stimuliert
Vorinkubation (30 min)	Experimentmedium	
	-	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 μM Isoproterenol
Hauptinkubation (1 h)	Experimentmedium	
	-	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 μM Isoproterenol

3.2.6. Reesterifizierungsexperiment

FS werden im Körper zu MG, DG und TG reesterifiziert, um das endoplasmatische Retikulum (ER) vor lipotoxischem Stress zu schützen. Diese Reesterifizierung wird in Adipozyten unter lipolyse-stimulierten Bedingungen von Diazylglyzeroltransferase 1 (DGAT1) durchgeführt (Chitraju et al., 2017). Um die Auswirkung von NA und NR auf die Reesterifizierung zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Reesterifizierungsexperimente mit ^{14}C -markierter Ölsäure als *Tracer* durchgeführt. Für die Experimente wurden differenzierte 3T3-L1- und primäre Adipozyten verwendet.

Zuerst wurde eine zweistündige Vorinkubation I der Zellen in Vollmedium durchgeführt (Tabelle 3.4). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS-Puffer gewaschen, um Reste des Vollmediums vollständig zu entfernen und die Zellen von FS-bindenden FCS-Resten zu befreien. Danach wurde eine 30-minütige Vorinkubation II mit 10 μM Isoproterenol in Minimalmedium I mit Inhibitoren (Kontrolle) oder DMSO (alle restlichen Zellen) zur Stimulierung der Lipolyse durchgeführt. Anschließend fand eine 90-minütige Hauptinkubation in derselben Ausführung wie die Vorinkubation II statt, zusätzlich wurden ^{14}C -markierte Ölsäure (0,2 $\mu\text{Ci/Well}$) als *Tracer* und vier verschiedene Konzentrationen von NA und NR hinzugefügt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Inkubationsschema der Reesterifizierungsexperimente mit NA und NR. Die differenzierten 3T3-L1- oder primären Adipozyten wurden in Vorinkubation I mit Vollmedium und DMSO inkubiert. In Vorinkubation II wurden die Zellen in Minimalmedium I mit DMSO und mit dem Lipolysestimulant Isoproterenol (10 μ M) inkubiert. In der Hauptinkubation wurden dieselben Bedingungen wie in Vorinkubation II angewandt, zusätzlich wurden 14 C-markierte Ölsäure (0,2 μ Ci/*Well*) und NA oder NR (je 0,1; 0,5; 1; 2 mM) hinzugefügt. Alle Inkubationen wurden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt.

	Basal	Stimuliert	NA/NR
Vorinkubation I (2 h)	Vollmedium mit DMSO		
Vorinkubation II (30 min)	Minimalmedium I mit DMSO		
	-	+ Isoproterenol	+ Isoproterenol
Hauptinkubation (90 min)	Minimalmedium I mit DMSO		
	+ 14 C- Ölsäure	+ 14 C- Ölsäure	+ 14 C- Ölsäure + NA oder NR (0,1; 0,5; 1, 2 mM)

Danach wurde das Medium der Hauptinkubation abgehoben und die Zellen wurden dreimal mit 1xPBS-Puffer gewaschen, um Reste des Inkubationsmediums vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Lipide mit einem Gemisch aus Hexan und Isopropanol (3:2, v/v, 300 μ l) unter Schütteln zweimal für 10 min aus den Zellen extrahiert. Der Alkohol Isopropanol fixierte dabei die Zellen an der Plastikoberfläche der Kultivierungsplatte. Die Extraktionslösungen wurden vereint, durch N₂-Begasung getrocknet und entweder eingefroren oder sofort über eine Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Für die DC wurden die getrockneten Lipidextraktionen in 300 μ l Chloroform gelöst, davon wurden 150 μ l aliquotiert und erneut durch N₂-Begasung getrocknet, um die DC nicht zu überladen. Danach wurden die Lipidproben in 50 μ l mit Ölsäure, MG, DG und TG versetztem Chloroform gelöst und tropfenweise auf eine Silicagel-Plastikplatte (#1057480001, Merck) aufgetragen. Um eine möglichst quantitative Auftragung zu erzielen, wurden die Extraktionsgefäße nochmals mit 20 μ l Chloroform gespült und diese Spülung wurde analog zum ersten Probenschema aufgetragen. Als zusätzliche Referenz zum Lipid-versetzten Lösungsmittel wurde ein Lipidstandard (10 μ g/Lipidspezies) mit MG, DG, TG und Cholesterinestern aufgetragen.

Mithilfe der DC können verschiedene Lipidspezies getrennt werden. Die Radioaktivität, die mit den Lipidspezies migriert, kann quantitativ bestimmt und damit der Einbau der ^{14}C -Ölsäure in MG, DG oder TG festgestellt werden.

Die DC wurde mit der mobilen Phase Hexan/Diethylether/Eisessig (70/29/1, v/v/v) in einer vorgesättigten Chromatographiekammer für ungefähr 1 h entwickelt. Danach wurde die DC-Platte kurz getrocknet und dann in eine mit Jod gesättigte Kammer überführt. Da sich das Jod elektrophil an die Doppelbindungen von Lipiden addiert, ist es möglich, diese anzufärben. So wurden die verschiedenen Lipidspezies sichtbar gemacht. Durch das Lipid-versetzte Lösungsmittel konnten die Lipidspezies FS, MG, DG und TG ermittelt und markiert werden. Danach wurden die Platten für mehrere Stunden bei RT liegen gelassen, um das Jod vollständig abzdampfen. Damit wurde ein Farbquench während der Radioaktivitätsmessung verhindert. Die Lipidbanden wurden über Nacht auf *Phosphoscreens* aufgelegt und im Typhoon Phosphorimager 9400 (GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) analysiert. Die Radioaktivität der Lipidpunkte wurde auf den *Phosphoscreens* abgebildet und mittels *Image-Lab-Software* analysiert. Eine zweite Möglichkeit der Auswertung beinhaltet das Ausschneiden der Lipidpunkte und die anschließende Vermessung der Radioaktivität [cpm] in 8 ml Szintillationscocktail im β -Counter.

Die fixierten Zellen wurden in 300 μl 0,3 N NaOH-0,1% SDS-Lyselösung pro 12-Well für circa 4 h bei RT auf einem Horizontalschüttler lysiert. Der Proteingehalt im Lysat wurde dann durch den Pierce® BCA-Protein-Assay bestimmt (Kapitel 3.4.2.). Dadurch konnten die β -Counts der Lipide (=cpm) auf die eingesetzte Proteinmenge normalisiert werden (=cpm/mg Protein).

3.2.7. FS-Aufnahme in H9c2-Kardiomyozyten

Ein FS-Aufnahmeexperiment wurde durchgeführt, um den FS-Einbau in oxidativen Zellen in Gegenwart von NA zu studieren. Für diesen Versuch wurden H9c2-Kardiomyozyten in einem Gemisch aus unmarkierter Ölsäure und ^3H -markierter Ölsäure, die als *Tracer* fungierte, beladen. Zur Analyse wurde die Radioaktivität der aufgenommenen ^3H -markierten Ölsäuremoleküle in Zelllysaten vermessen. Durch Zugabe von NA in das Inkubationsmedium der Zellen konnte ein möglicher Einfluss von NA auf die FS-Aufnahme von oxidativen Zellen untersucht werden.

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Ab dem Zeitpunkt der Konfluenz wurden die H9c2-Kardiomyoblasten von Tag 0 bis Tag 3 differenziert. An Differenzierungstag 3 wurden die Zellen zuerst für 4 h gefastet, also mit Minimalmedium II inkubiert. Danach wurden sie mit Minimalmedium II für 2, 5, 10 und 20 min inkubiert. Dieses Versuchsmedium beinhaltete außerdem 400 μM BSA-komplexierte Ölsäure und 1 μCi ^3H -markierte Ölsäure als *Tracer*. Als Bedingungen wurden die Zugabe von 500 μM NA und die Zugabe gleichen Volumens an 0,9%-iger physiologischer Kochsalzlösung als basale Kontrolle gewählt. Danach wurden die H9c2-Kardiomyozyten einmal mit Minimalmedium II +2% BSA gewaschen, um Ölsäurerückstände außerhalb der Zellen zu entfernen. Danach wurde dreimal mit 1x-PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,3 N NaOH-0,1% SDS-Lyselösung für 4 h lysiert. Daraufhin wurden 500 μl der lysierten Zellen mit 8 ml Szintillationscocktail gut vermischt und die Radioaktivität im β -Counter vermessen. Die Proteinkonzentration der lysierten Zellen wurde außerdem mittels Pierce® BCA-Protein-Assay bestimmt (Kapitel 3.4.2.). So konnten die β -Counts (*counts per minute*, cpm) auf die Proteinmenge normalisiert werden (=cpm/mg Protein).

3.3. *Ex-vivo*-Versuche

3.3.1. Lipidextraktion aus Geweben

In dieser Arbeit wurden Analysen von Lipidextrakten aus Lebergewebe durchgeführt. Dafür wurden 150-200 mg der Leberstücke abgewogen und zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebstücke in 1 ml eiskaltem HSL-Puffer (ohne DTT-Zugabe, mit Proteaseinhibitor) mechanisch mit dem Ultra-Turrax® aufgeschlossen und mit 5 ml eiskalter Chloroform-Methanol-Mischung (2:1, v/v) versetzt, um die Lipide zu extrahieren. Danach wurde die Suspension für 2 h bei RT im Rollinkubator bei 15 x rpm inkubiert und anschließend für 10 min bei RT und 3.500 x rpm zentrifugiert. Die Plastikröhrchen wurden dann vorsichtig mit einer erhitzten Nadel aufgestochen, so konnte die organische Phase gesammelt werden, welche die Lipide enthielt. Die Proteinphase verblieb im Röhrchen. Von der organischen Phase wurden 200 μl in ein Eppendorfgefäß aliquotiert, um für alle Proben einheitliche Mengen zu vermessen. Die Proben wurden durch N_2 -Begasung getrocknet und danach in 1 ml 2%-Triton-X-100 gelöst. Die Lipide wurden durch Ultraschalleinwirkung mittels Sonicator zweimal für 5 sek bei einer Amplitude von 15% wieder in Lösung gebracht. Während der Beschallung mit Ultraschall wurden die Proben auf Eis gehalten, um eine Erhitzung zu

vermeiden. Danach konnte die Konzentration der TG mithilfe des *Infinity™ Triglycerides Liquid Stable Reagent* (Kapitel 3.4.7.) ermittelt werden.

Die Proteinphase wurde über Nacht bei 60°C im Inkubator getrocknet, um am nächsten Tag mit 1 ml einer 0,3 N NaOH-0,1% SDS-Lyselösung lysiert zu werden. Dieser Lyseprozess wurde für 3 h im Thermomixer bei 1.400 x rpm und 55°C durchgeführt. Danach konnte die Proteinmenge der Leberproben mit dem Pierce® BCA-Protein-Assay bestimmt werden (Kapitel 3.4.2.). Die TG-Konzentration wurde anschließend auf die Proteinmenge der Proben normalisiert [nmol/mg Protein].

3.3.2. Lipolysemessung in Fettgewebsexplantaten

Um die Auswirkung von NA auf die Lipolyse in Adipozyten im natürlichen Zellverband zu untersuchen, wurden Lipolysemessungen *ex-vivo* in Fettgewebsexplantaten durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden analog zu den *in-vitro*-Lipolysemessungen durchgeführt (Kapitel 3.2.4.). Dadurch konnte überprüft werden, ob der lipidsenkende Effekt von NA fettgewebs-spezifisch ist.

Zuerst wurde epiWAT aus Mäusen isoliert. Dazu wurden die Mäuse mit Isofluran (Baxter) anästhesiert, eine zervikale Dislokation der Mäuse wurde durchgeführt und sie wurden anschließend sezirt. Die Fettgewebsstücke wurden zu etwa 1 mm-großen Stücken geschnitten. Die Stücke wurden zuerst in einer zweistündigen basalen Vorinkubation I mit Experimentmedium im Brutschrank bei 37°C gehalten (Tabelle 3.5). Danach wurde das Medium abgenommen und für die quantitative Bestimmung der freien FS und des freien Glycerols als Lipolyseparameter herangezogen (Kapitel 3.4.7.). So konnten die Parameter der basalen, unstimulierten Lipolyse gemessen werden. Anschließend wurden dieselben Fettgewebsstücke in Vorinkubation II für 30 min in Experimentmedium und 10 µM Isoproterenol inkubiert. In diesem Schritt wurde die Lipolyse in den Fettgeweben stimuliert, die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C. Danach wurde eine einstündige Hauptinkubation im Experimentmedium mit Isoproterenol und NA (0,05; 0,1; 0,5; 1 mM), sowie mit demselben Volumen an ddH₂O als Kontrolle im Brutschrank bei 37°C bewerkstelligt. Dieses Medium wurde anschließend für die quantitative Bestimmung der freien FS und des freien Glycerols unter lipolyse-stimulierten Bedingungen herangezogen. Die Fettgewebsstücke wurden in 400 µl Chloroform überführt und für 2 h bei RT im Thermomixer bei 300 x rpm inkubiert, um die Lipide zu extrahieren. Danach wurden die Gewebsstücke in 400 µl einer 0,3 N NaOH-0,1% SDS-Lyselösung über Nacht bei 65°C im

Thermomixer bei 1.000 x rpm inkubiert. Durch die Lyse der Fettgewebstücke konnte anschließend die Proteinkonzentration in den Gewebstücken mittels Pierce® BCA-Protein-Assay gemessen werden (Kapitel 3.4.2.). Die FS- und Glycerol-Ergebnisse wurden auf die Proteinmenge der Fettgewebstücke normalisiert [nmol/mg Protein] und dienen als Parameter der Lipolyse.

Tabelle 3.5: Inkubationsschema der Lipolysemessungen in Fettgewebsexplantaten mit NA und NR. Die Fettgewebstücke wurden in Vorinkubation I mit Experimentmedium inkubiert. In Vorinkubation II wurden die Zellen in Experimentmedium mit 10 µM Isoproterenol inkubiert. In der Hauptinkubation wurden dieselben Bedingungen wie in Vorinkubation II angewandt, zusätzlich wurden NA oder NR (je 0,05; 0,1; 0,5; 1 mM) hinzugefügt. Alle Inkubationen wurden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt.

	Basal	Stimuliert	NA/NR
Vorinkubation I (2 h)		Experimentmedium	
Vorinkubation II (30 min)		Experimentmedium	
	-	+ Isoproterenol	+ Isoproterenol
Hauptinkubation (1 h)		Experimentmedium	
	-	-	+ NA oder NR (0,05; 0,1; 0,5; 1 mM)

3.4. Biochemische Analysen

3.4.1. Aufschluss

Zellen

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben, geerntet und pelletiert. Das Zellpellet eines Wells einer 6-Well-Zellkulturschale wurde, sofern nicht anders angegeben, in 500 µl eiskaltem Aufschlusspuffer I oder II (jeweils mit Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor) durch eine Pipette resuspendiert. Danach wurde das Zellhomogenat bei 1.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, um Zelltrümmer und Zellkerne abzutrennen. Das Zelllysats befand sich bei dieser Methode anschließend im „fettarmen Zwischenstand“, die Lipide gelangten durch

den Zentrifugationsschritt an die Oberfläche und der Zwischenstand konnte mit einer Injektionsnadel vorsichtig aufgezogen werden.

Gewebe

Die Gewebe wurden in Aufschlusspuffer I unter mechanischer Einwirkung mithilfe eines Ultra-Turrax® (Ika®, Staufen, Deutschland) aufgeschlossen. Daraus entstand das Totalhomogenat, das auf verschiedene Arten weiterverarbeitet wurde:

- i. Das Totalhomogenat wurde anschließend bei 16.100 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert; danach wurde der „fettarme Zwischenstand“ (Proteinlysat des Gewebes) mit einer Injektionsnadel aufgezogen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diese Aufschlussmethode wird bei TGH-Assays verwendet.
- ii. Eine Acetonfällung des Totalhomogenates wurde durchgeführt. Dazu wurde das Homogenat mit fünffachem Überschuss an eiskaltem Aceton bei -20°C über Nacht gefällt. Danach wurde die Suspension bei 16.100 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben. Das entstandene Pellet wurde in Aufschlusspuffer I gelöst. Wenn bereits bekannt ist, dass die Proben sehr fetthaltig sind, wird das Pellet optional mit eiskaltem Chloroform gewaschen und danach in Aufschlusspuffer I gelöst. Damit kann eine zweite Fällung verhindert werden. Diese Aufschlussmethode wird bei SDS-PAGE verwendet, da hierbei Lipide die Auftrennung der Proteine stören würden.

3.4.2. Proteinbestimmung

Biorad-Protein-Assay

Die Messung des Biorad-Protein-Assay beruht auf einem Farbumschlag des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250. Dieser bildet in saurer Lösung mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe, wodurch es zu einem Farbumschlag und einer Zunahme der Absorption bei 595 nm kommt.

Für die Biorad-Protein-Assay-Konzentrationsbestimmung wurden von den Proteinproben passende Verdünnungen mit dem verwendeten Aufschlusspuffer hergestellt, sodass sich die Proben im linearen Konzentrationsbereich der Kalibrationsgerade der Proteinbestimmung befinden. Für die Kalibrationsgerade wurde ein BSA-Proteinstandard (Pierce®, 2 mg/ml) verwendet (Tabelle 3.6).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 20 µl Standard- oder Probenvolumen mit 200 µl *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (1:5-Verdünnung mit ddH₂O) in 96-Well-Platten pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Auslesung der Absorption bei 595 nm im Plattenlesegerät. Mit den erhaltenen Absorptionswerten des Standards wurde eine Kalibrationsgerade angefertigt. Daraus konnte die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

Der Biorad-Protein-Assay ist mit einigen Substanzen in hohen Konzentrationen (SDS > 0,1%, DTT > 1 M, EDTA > 0,1 M) inkompatibel. Sind diese Komponenten im Puffer der Probe enthalten, wird als Alternative der Pierce® BCA-Protein-Assay zur Proteinbestimmung herangezogen.

Tabelle 3.6: Verdünnungsreihe des BSA-Proteinstandard (Pierce®, 2 mg/ml) zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden. Die Verdünnungen wurden jeweils mit BSA-Proteinstandard und dem jeweiligen Aufschlusspuffer vorbereitet.

BSA-Konzentration [µg/ml]	V _(x) in µl	V _(Puffer) in µl
200	20 _(Proteinstandard BSA, 2mg/ml)	180
150	75 ₍₂₀₀₎	25
100	50 ₍₂₀₀₎	50
50	50 ₍₁₀₀₎	50
25	50 ₍₅₀₎	50
0	0	50

Pierce® BCA-Protein-Assay

Die Messung des Pierce® BCA-Protein-Assay beruht darauf, dass Bicinchoninsäure (BCA) zusammen mit einwertigen Kupferionen einen violetten Farbstoff bildet, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die einwertigen Kupferionen entstehen durch die Reaktion zweiwertiger Kupferionen mit Proteinen. Der Pierce® BCA-Protein-Assay wird verwendet, wenn eine mangelnde Kompatibilität der Puffersubstanzen mit dem Biorad-Protein-Assay besteht.

Vergleichbar zur Konzentrationsbestimmung mittels Biorad-Protein-Assay wurden auch für die BCA-Proteinbestimmung passende Verdünnungen von den Proteinproben sowie eine Kalibrationsgerade mit BSA als Proteinstandard (Pierce®, 2 mg/ml) hergestellt (Tabelle 3.7). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 25 µl Standard- oder Probenvolumen mit 200 µl Arbeitsreagenz (AR) in 96-Well-Multititerplatten pipettiert. Das AR besteht aus dem BCA-Reagenz A und dem BCA-Reagenz B. Letzteres wurde in einem Verhältnis 1:50

im Reagenz A verdünnt. Die Proben wurden anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Auslesung der Absorption bei 562 nm im Plattenlesegerät. Mit den erhaltenen Absorptionswerten des Standards wurde eine Kalibrationsgerade angefertigt, daraus wurden die Proteinkonzentrationen der Proteinproben berechnet.

Tabelle 3.7: Standard-Verdünnungsreihe mit BSA-Proteinstandard (Pierce®, 2 mg/ml) zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden. Die Verdünnungen wurden jeweils mit BSA-Proteinstandard und Aufschlusspuffer vorbereitet.

BSA-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	$V_{(X)}$ in μl	$V_{(\text{Puffer})}$ in μl
1000	60 _(Proteinstandard BSA, 2mg/ml)	60
750	22,5 _(Proteinstandard)	37,5
500	60 ₍₁₀₀₀₎	60
250	60 ₍₅₀₀₎	60
125	60 ₍₂₅₀₎	60
25	20 ₍₁₂₅₎	80
0	0	60

3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein diskontinuierliches Elektrophoresesystem mit einem Sammelgel (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8), bei dem durch die Anlagerung von SDS die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Dadurch erhalten diese eine negative Ladung und die Trennung erfolgt somit aufgrund ihres Molekulargewichtes.

Zuallererst wurde das Trenngel in Gießkammern gegossen. Dieses wurde zur vertikalen Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht verwendet. Dabei ist das Rezept abhängig von der gewünschten Porengröße (Kapitel 2.4.). Je höher der Acrylamidanteil ist, desto kleiner werden die Gelporen: Somit kann die Porengröße dem Größenspektrum der Proteine angepasst werden.

Nach der Fertigstellung wurde das Gel zur gleichmäßigen Beschwerung mit Butanol überschichtet, um eine einheitliche Lauflinie der Proteine zu schaffen. Danach musste das Butanol sorgfältig entfernt und abgewaschen werden, um Wechselwirkungen in der SDS-PAGE zu vermeiden. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen, das zur Sammlung der Proteine an einer Linie dient, damit alle Proteine denselben Startpunkt der Lauflinie in der SDS-PAGE haben. In das Sammelgel wurden Probenkämme gesteckt, um anschließend definierte Probestaschen für die Proteinproben und Standards zu erhalten.

Für die SDS-PAGE wurden die zuvor berechneten Volumina der Zelllysate entsprechend für 10 µg, 20 µg oder 50 µg aufgetragene Proteinmenge mit geeigneten Volumina eines 6x-SDS-Puffers versetzt, um eine einfache Konzentration des Puffers zu erhalten. Danach wurden die Proben im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 10 min bei 300 x rpm und 95°C denaturiert. Daraufhin wurden die Gelkammern mit SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt und die Proben sowie der Proteinstandard (*Color Prestained Protein Standard, Broad Range*, 11–245 kDa) aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde bei 20-25 mA/Gel und variabler Spannung durchgeführt, bis die Lauflinie am Gel den unteren Rand berührte. Um eine starke Erwärmung der Gelkammern zu vermeiden, wurden sie durch kalten Wasserfluss gekühlt.

3.4.4. Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden die Proteine vom Trenngel der SDS-PAGE durch Elektrophorese auf eine Membran übertragen. Auf dieser Membran können anschließend Immunmarkierungen einzelner Proteine durchgeführt werden.

Die Übertragung der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF; Porengröße: 0,45 µm, Carl Roth) wurde mithilfe einer Blottingkammer durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde zuerst mit Methanol aktiviert. Anschließend wurde ein Western-Blotting-Sandwich bestehend aus Schwamm, Filter, Gel, Membran, Filter und Schwamm zusammengebaut und in die mit CAPS-Puffer gefüllte Blottingkammer überführt, sodass die negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anode wandern. Der Proteintransfer wurde unter Wasserkühlung bei 200 mA und variabler Spannung für ungefähr 1 h durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran mit einer Blockierlösung (5% Milch oder 5% BSA) für 2 h bei RT inkubiert, um freie Bindestellen zu sättigen. Die Art dieser Blockierlösung ist abhängig von den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen des verwendeten Primärantikörpers. Nach dem Blockierschritt wurde die Membran dreimal mit 1x-TST-Puffer gewaschen und zu vorgegebenen Zeit- und Temperaturbedingungen mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert, der zuvor laut Herstellerangabe verdünnt wurde (Kapitel 2.7.). Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1x-TST-Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran nochmals dreimal für 10 min mit 1x-TST-Puffer gewaschen, um unspezifische Signale zu minimieren.

Um antigen-spezifische Signale über den *Horse-radish-peroxidase*-(HRP)-markierten Zweitantikörper zu detektieren, wurden die beiden Substratbestandteile *Luminol/Enhancer Solution* und *Peroxide Solution (Clarity™ Western ECL Substrate)* in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und gleichmäßig über die gesamte Membran verteilt. Die antigen-spezifischen Signalintensitäten wurden mit dem „*ChemiDoc™ Touch Imaging System*“ (Bio-Rad-Laboratories) detektiert.

3.4.5. Quantifizierung von Signalintensitäten

Um die im Western-Blot detektierten Proteinexpressionen vergleichen zu können, wurden die Signalintensitäten der Proteine auf eine Ladekontrolle normalisiert. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1. Dafür wurde die Signalintensität eines konstitutiv exprimierten Proteins, wie beispielsweise Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ermittelt (Kapitel 2.7.). Anschließend wurden die antigen-spezifischen Signalintensitäten aller detektierten Proteine auf die Signalintensität von GAPDH derselben Proben Spur normalisiert. Auf diese Weise werden Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge ausgeglichen.

3.4.6. TG-Hydrolase-(TGH)-Assay

Der TGH-Assay wurde durchgeführt, um die Auswirkung von NA auf die lipolytische Aktivität *in-vitro* im Proteinlysate von epiWAT aus C57BL/6J-Mäusen zu charakterisieren. Da der inhibitorische Effekt von NA auf die Lipolyse in Fettgewebslysaten überprüft wurde, wurden als Positivkontrolle einer Lipolyseinhibierung die Lipaseinhibitoren Ai (40 µM) und Hi (10 µM) eingesetzt.

Zuerst wurden den Mäusen entweder Kontrolllösung oder 300 µmol/kg Körpergewicht NA injiziert. Das Fettgewebe wurde 20 min nach der Injektion entnommen und aufgeschlossen (Kapitel 3.4.1.). Das Proteinlysate wurde für den TGH-Assay verwendet, um den Einfluss von NA auf die TG-Mobilisierung in den Fettgewebslysaten zu beobachten. Das mit Tritium (³H) markierte TG fungierte dabei als molekularer Tracer in einem Gemisch mit unmarkiertem TG. Zur Bestimmung der *in-vitro*-TGH-Aktivität wurde zunächst ein Substrat mit ³H-markiertem Triolein, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol und unmarkiertem Triolein hergestellt (Tabelle 3.8). Das Lipidgemisch wurde mit Stickstoff begast, bis kein Lösungsmittel mehr zurückblieb. Danach wurde eiskalter 0,1 M Kaliumphosphatpuffer hinzugefügt und es kam durch Ultraschalleinwirkung in einem einminütigen Intervall des Sonicator-Geräts (Virtis

Virsonic, Amplitude: 15-20%) zur Mizellenbildung des Trioleins mit Phosphatidylcholin/Phosphatidylinositol. Die Herstellung des Substrates erfolgte unter Kühlung im Eiswasserbad. Danach wurde 1:10 des Gesamtvolumens an 20%-igem FS-freien BSA als FS-Akzeptor hinzugefügt (Tabelle 3.8). Die Konzentration des Substrates ist abhängig vom eingesetzten organischen Material: das Vollsubstrat wird bei Gewebeproben verwendet, das Zellsubstrat bei der Verwendung von Zellproben (Tabelle 3.8).

Das Substrat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das fertig gestellte Substrat (25 μ l) wurde dann zusammen mit dem Proteinlysate der beiden Bedingungen (Kontrolle und NA) und mit jeweiligen Kontrollen DMSO, Ai oder Hi in einem Gesamtvolumen von 50 μ l für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 650 μ l der Stopplösung und 200 μ l 0,1 M Kaliumkarbonat (pH 10,5) gestoppt. Dadurch wurde der pH-Wert der wässrigen Phase in den alkalischen Bereich verschoben. Somit war der aktuelle pH-Wert weit vom pKa-Wert der freigesetzten FS entfernt und die FS konnten in die wässrige Phase extrahiert werden. Um eine Phasentrennung zu erreichen, wurde das Substrat/Probe/Extraktionsgemisch für 10 min bei RT und 2.400 x rpm zentrifugiert.

Tabelle 3.8: Substratzusammensetzung für 1 ml Substrat. Das Substrat setzt sich aus Trioleat, ^3H - Trioleat, Phosphatidylcholin/Phosphatidyl-inositol in Toluol, Kaliumphosphatpuffer (KPP) und BSA zusammen. Die Konzentration des Substrates ist abhängig vom eingesetzten organischen Material; die Zusammensetzungen sind für Vollsubstrat (bei Arbeiten mit Gewebe, 1,67 mM) oder Zellsubstrat (bei Arbeiten mit Zellen, 0,33 mM) angegeben.

	Stocklösung	Vollsubstrat (für 1 ml)	Zellsubstrat (1 ml)
Trioleat	100 mg/ml (113 mM)	14,75 μ l	2,66 μ l (0,3 mM)
Phosphatidylcholin/Phosphatidyl- inositol in Toluol	20 mg/ml (26 mM)	7,5 μ l	1,754 μ l (45 μ M)
^3H- Trioleat	0,5 μ Ci/ μ l	25 μ l (12,5 μ Ci)	12,5 μ l (6,25 μ Ci)
Kaliumphosphatpuffer (KPP)	0,1 M	857,45 μ l	884,7 μ l
BSA	20% in KPP	95,3 μ l	98,3 μ l

Für die quantitative Bestimmung der freigesetzten ^3H -markierten FS wurden 200 μl aus der oberen wässrigen Phase entnommen und mit 2 ml Szintillationscocktail (Rotiszint® eco plus, Carl Roth) in 7 ml-Szintillationsvials überführt. Die Radioaktivität in den einzelnen Proben wurde im β -Counter (Tri-Carb2100TR, Packard Instrument) bestimmt. Als Leerwert wurde lediglich Aufschlusspuffer vermessen. Weiters wurde ein Aliquot des Substrats (25 μl) vermessen, um die spezifische Substrataktivität berechnen zu können (*counts per minute* (cpm) pro μmol FS). Um die TGH-Aktivitäten für jede Probe zu erhalten, wurde eine Proteinbestimmung aller Probenansätze durchgeführt. Damit wurde das Verhältnis von cpm/mg Protein und cpm/nmol freien FS berechnet. So wurden die TGH-Aktivitäten bei einer einstündigen Inkubation in der Einheit „nmol freien FS pro h pro mg Protein“ erhalten (nmol/h/mg Protein, Formel 2).

Formel 2: Berechnung der TGH-Aktivitäten im TGH-Assay bei einer einstündigen Inkubation.

$$\left(\frac{\text{cpm}}{\text{mg Protein}}\right) / \left(\frac{\text{cpm}}{\text{nmol freie FS}}\right) = \text{nmol/h/mg Protein}$$

3.4.7. Quantitative Bestimmung von Plasmaparametern

Zur Analyse der NA-Wirkung auf Plasmalipidparameter wurden jeweils die freien FS, die TG und freies Glycerol im Blutplasma vermessen. Das Wako NEFA-Assay-Kit® wurde für die Messung der freien Plasma-FS herangezogen, mittels *Infinity™ Triglycerides Glycerol Kit* wurden Plasma-TG vermessen und das *Free-Glycerol- Reagent-Kit* wurde für die Messung des freien Glycerols im Plasma verwendet. Die für die Messung eingesetzten Probenvolumina waren von der Zusammensetzung der Probe abhängig, dies gilt für die Bestimmung der FS, TG und des Glycerols im Plasma, Medium und Lipidextrakt:

- i. Blutplasmaproben: Für die Messung wurden 5 μl der Blutplasmaproben sowie des Standards in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert, der jeweilige Standard wurde in ddH₂O verdünnt (Ausnahme: Blutplasmaproben der DAKOs, dabei wurden 10 μl der Proben und Standards verwendet).
- ii. Inkubationsmedium: Bei Arbeiten mit Zellen wurden vom Inkubationsmedium 20 μl bei lipolyse-stimulierten Bedingungen und 40 μl bei unstimulierten Bedingungen eingesetzt, der jeweilige Standard wurde in gleicher Menge im Inkubationsmedium verdünnt.

- iii. Lipidextrakt aus Gewebeproben: Für die Messung wurden 5 µl der in 2%-Triton-X-100 gelösten Lipidproben in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Der jeweilige Standard wurde in 2%-Triton-X-100 verdünnt.

Bei *in-vitro*- und *ex-vivo*-Versuchen wurde die Anzahl der freien FS, TG oder des freien Glycerols [nmol] auf die Proteinmenge [mg] normalisiert.

Bestimmung der freien FS

Die quantitative Bestimmung der freien FS (=non-esterified-fatty-acids, NEFA) im Plasma oder Medium beruht auf der enzymatischen Reaktion von freien FS mit ATP und Coenzym A über die Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA.

Für die Messung wurde eine Kalibrationsgerade mit dem Wako-NEFA-Standard (1mM) und ddH₂O bei Plasmaproben beziehungsweise Medium bei *in-vitro*- und *ex-vivo*-Versuchen erstellt. Der Wako NEFA Standard wurde in 1:2-Schritten verdünnt. Danach wurden die Verdünnungen der Kalibrationsgerade und der zu bestimmenden Proben in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Die Proben wurden mit 100 µl NEFA-Reagent A versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit 50 µl NEFA-Reagent B versetzt und erneut für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Farbumschlag, also die Zunahme der Absorption im Photometer, bei 562 nm gemessen. Mithilfe der Kalibrationsgeraden wurde die Konzentration der FS [mM] berechnet.

In dieser Arbeit ist die Freisetzung von freien FS gleichzusetzen mit der gemessenen NEFA-Freisetzung.

Bestimmung der TG

Die quantitative Bestimmung des TG im Plasma oder Medium beruht auf dem enzymatischen Abbau zu Glycerol und FS und der darauffolgenden Reaktion von Glycerol und ATP zu Glycerol-3-phosphat. Deshalb wurde eine Kalibrationsgerade mit der *Glycerol Standard Solution* (2,83 mM) und ddH₂O oder Medium erstellt. Die *Glycerol Standard Solution* wurde in 1:2-Schritten verdünnt. Danach wurden die Verdünnungen der Kalibrationsgerade und die zu bestimmenden Proben in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Die Proben wurden mit 100 µl *Infinity™ Triglycerides Liquid Stable Reagent* versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Farbumschlag, also die Zunahme der Absorption im Photometer, bei 492 nm gemessen.

Mithilfe der Kalibrationsgerade konnte die Konzentration der TG [mM] berechnet werden. Um den Wert der TG zu erhalten, wurde danach die freie Glycerolkonzentration [mM] von der TG-Konzentration [mM] abgezogen, da bei beiden Messungen Glycerol vermessen wird.

Bestimmung des freien Glycerols

Die quantitative Bestimmung des freien Glycerols beruht auf der Reaktion von Glycerol und ATP zu Glycerol-1-phosphat, welche durch die Glycerolkinase initiiert wird.

Für die Messung wurde eine Kalibrationsgerade mit der *Glycerol Standard Solution* (2,83 mM) und ddH₂O oder Medium erstellt. Die *Glycerol Standard Solution* wurde in 1:2-Schritten verdünnt. Danach wurden die Verdünnungen der Kalibrationsgerade und die zu bestimmenden Proben in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Die Proben wurden mit 100 µl *Free-Glycerol-Reagent* versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde der Farbumschlag, also die Zunahme der Absorption im Photometer, bei 562 nm gemessen. Mithilfe der Kalibrationsgerade wurde die Konzentration des freien Glycerols [mM] berechnet.

Bestimmung der Plasmaglukose

Der Glukosegehalt im Plasma wurde mit einem Glukosimeter (Wellion CALLA *light* Blutglukosemeter) bestimmt. Dafür wurde 1 µl Blutplasma auf den Messstreifen aufgetragen. Die Messwerte wurden in [mg/dl] angegeben.

3.5. Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (*standard deviation*, S.D.) angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mittels ungepaartem oder gepaartem, zweiseitigen Student's *t*-Test bestimmt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der Auswirkung von NA auf Lipolyse

NA gilt als Lipolysehemmer, da dieser Metabolit alle Klassen von atherogenen Lipoproteinen (VLDL, IDL, LDL, Chylomikronen) sowie FS senkt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch nicht völlig geklärt, auf welche Weise NA die Plasmalipide senkt. Der molekulare Wirkmechanismus, der einer Hemmung der Lipolyse durch die Inhibierung der Lipasen HSL oder ATGL unterliegt, wurde bisher nicht klar gezeigt. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Untersuchung des Effekts von NA auf die Lipolyse durchgeführt.

4.1.1. Der NA-spezifische Rezeptor GPR109A ist in WAT Fütterungs-Fasten-reguliert

Um die über den G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor GPR109A geregelte Lipolyseinhibierung durch NA zu studieren, wurde die Proteinexpression des GPR109A im epiWAT von C57BL/6J-Mäusen überprüft. Für die Analyse der Proteinexpression wurde epiWAT im *refed*-Zustand und im gefasteten Zustand aus C57BL/6J-Mäusen entnommen. Daraus wurden Totalhomogenate gewonnen. Diese zeigten eine Verdreifachung der GPR109A-Proteinexpression im gefasteten Zustand im Vergleich zum *refed*-Zustand der Fettgewebe (Abbildung 4.1). Die Proteinexpression von GPR109A wird also bei Nahrungskarenz aktiviert. Da bei Nahrungskarenz ebenfalls eine Hochregulation der Lipolyse stattfindet, weist eine verstärkte GPR109A-Proteinexpression auf eine Lipolyseinhibierung durch NA hin.

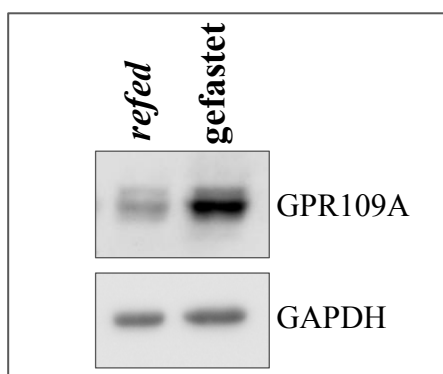


Abbildung 4.1: Proteinexpression des NA-Rezeptors GPR109A in epiWAT. Die Gewebe wurden im *refed*-Zustand und gefasteten Zustand entnommen. Die daraus gewonnenen Totalhomogenate (20 μ g Protein) wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurde Anti-HM74 (1:1.000, entspricht GPR109A) sowie Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP) (1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1.

4.1.2. NA senkt Plasmawerte von FS, Glycerol und TG in C57BL/6J-Mäusen

Zunächst wurde die Auswirkung von NA in C57BL/6J-Mäusen *in-vivo* untersucht. Die Mäuse wurden für die Untersuchung über Nacht gefastet, da die Proteinexpression des NA-Rezeptors

GPR109A bei Nahrungskarenz aktiviert wird. Veröffentlichte Daten zeigen, dass NA im Menschen und in der Maus die Plasmawerte von FS, Glycerol und TG senkt (Carlson, 2005; Watt et al., 2004). Dieser Effekt tritt nach wenigen Minuten auf, es gibt jedoch einen *Rebound*-Effekt nach etwa 1 bis 2 h, bei dem die Plasmalipidwerte wieder auf das basale Niveau steigen.

Die C57BL/6J-Mäuse wurden für 15 h über Nacht gefastet. Dann wurde eine basale Blutabnahme bei Zeitpunkt 0 min über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Danach wurde als Kontrolle physiologische Kochsalzlösung injiziert. Für die Behandlung mit NA wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen intraperitoneal injiziert (50 und 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NA, in physiologischer Kochsalzlösung). Weiters wurden retroorbitale Blutabnahmen 20, 60 und 120 min nach der Injektion durchgeführt. Aus dem Blutplasma wurden die Plasmalipide bestimmt. In Abbildung 4.2 wird ersichtlich, dass die Kontrollbehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung keine Auswirkung auf FS-, Glycerol-, TG- und Glukosewerte im Plasma hervorrief. In der niedrigdosierten Kohorte

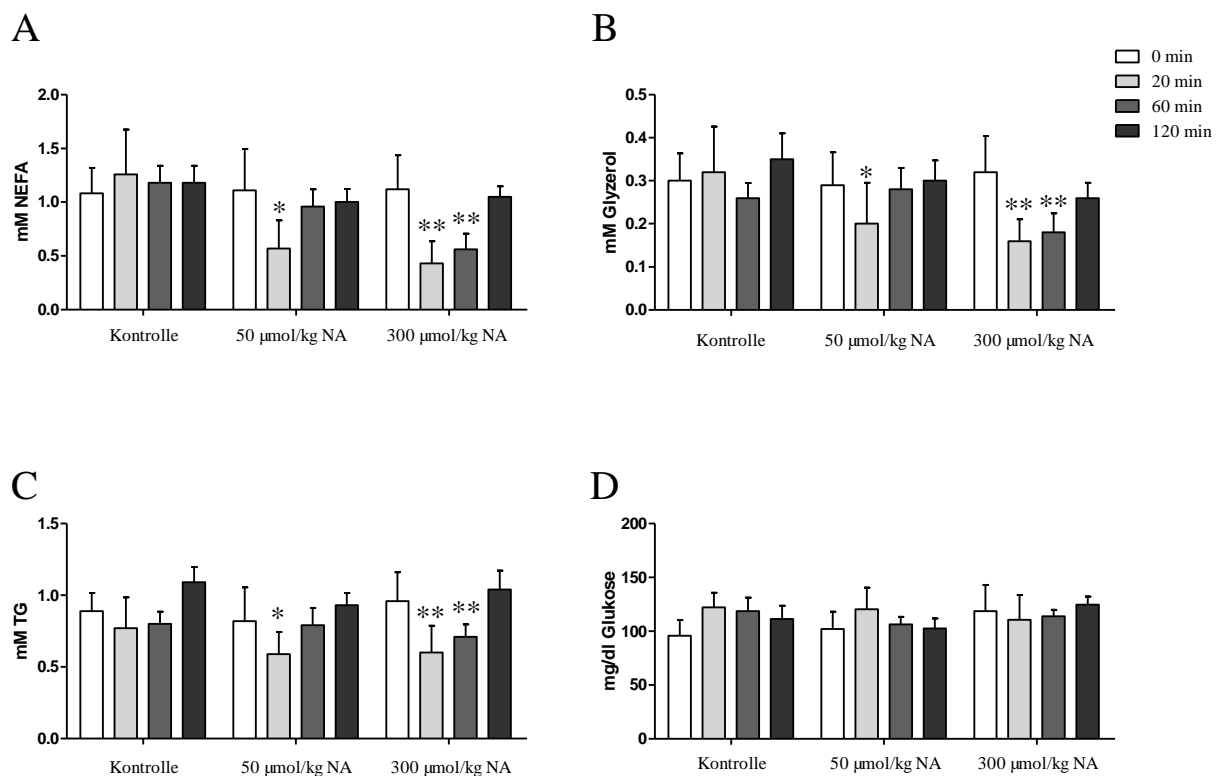


Abbildung 4.2: *in-vivo*-Auswirkung von NA auf gefastete C57BL/6J-Mäuse. Die C57BL/6J-Mäuse wurden für 15 h von 18 bis 9 Uhr gefastet. Bei Zeitpunkt 0 min wurde eine basale Blutabnahme über den retroorbitalen Sinus und anschließend eine intraperitoneale NA-Injektion durchgeführt (Kontrolle: physiologische Kochsalzlösung; NA: 50 μmol und 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht). Nach 20, 60 und 120 min wurden weitere Blutabnahmen durchgeführt. Aus den Plasmaproben wurden Lipidparameter mit kolorimetrischen Tests und Glukose mit Glukosestreifen bestimmt: (A) zeigt NEFA, (B) zeigt Glycerol, (C) zeigt TG und (D) zeigt Glukosewerte. Die Mäuse waren männlich und 8 Wochen alt. $n=5$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

sanken die Plasmawerte von FS, Glycerol und TG 20 min nach der NA-Behandlung um 50%, 35% und 25% ab. In der hochdosierten Kohorte waren die Plasmawerte von FS, Glycerol und TG um 60%, 50% und 35% verringert. Nach 120 min trat ein *Rebound*-Effekt aller gemessenen Plasmalipidwerte in den Kohorten beider NA-Konzentrationen auf. Die Plasmalipidwerte stiegen also wieder auf die basalen Konzentrationen vor NA-Injektion an. Die Plasmaglukosewerte blieben nach Kontroll- sowie NA-Injektion stets unverändert.

Mit diesem Experiment wurde ersichtlich, dass die Senkung der Plasmawerte von FS, Glycerol und TG durch NA ein kurzzeitiger Effekt ist, der binnen weniger Minuten stattfindet. Damit wurden veröffentlichte Daten bestätigt. Außerdem ist der Effekt von NA dosisabhängig: Die Senkung der FS-, Glycerol- und TG-Werte im Plasma war in der hochdosierten Kohorte stärker und längerfristig ausgeprägt als in der niedrigdosierten Kohorte. Deshalb wurde in den nachfolgenden *in-vivo*-Experimenten immer 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NA verwendet.

4.1.3. NA verringert Plasmalipide bei neutralem pH-Wert

Da NA den pH-Wert der Injektionslösungen in den sauren Bereich verschiebt (pH 3,5-4), wurden die Lösungen in späteren Experimenten durch einen Puffer neutralisiert. Bei der Herstellung der Injektionslösungen wurde die physiologische Kochsalzlösung durch einen 94

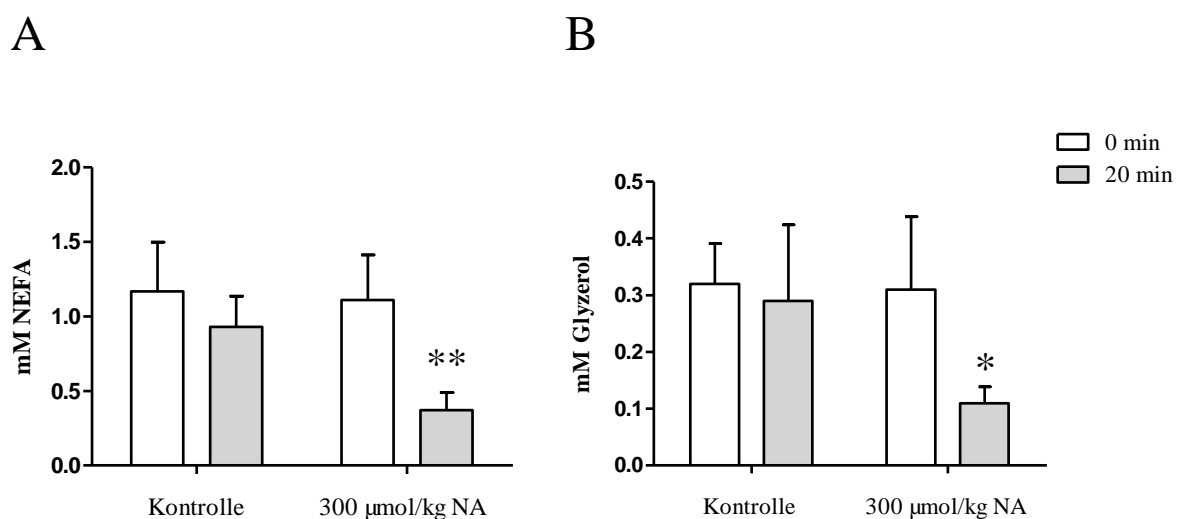


Abbildung 4.3: *in-vivo*-Auswirkung von NA auf gefastete C57BL/6J-Mäuse mit gepufferten Injektionslösungen. Die C57BL/6J-Mäuse wurden für 15 h von 18 bis 9 Uhr gefastet. Bei Zeitpunkt 0 min wurde eine basale Blutabnahme über den retroorbitalen Sinus und anschließend eine intraperitoneale NA-Injektion durchgeführt (Kontrolle: 94 mM Tris/HCl-Puffer in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4; NA: 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht im selben Puffer wie Kontrolle). Nach 20 min wurde eine weitere Blutprobe entnommen. Aus den Plasmaproben wurden Lipidparameter mit kolorimetrischen Tests bestimmt: **(A)** zeigt NEFA, **(B)** zeigt Glycerol. Die Mäuse waren weiblich und 17 Wochen alt. $n=5$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) ersetzt. So konnte der Effekt von NA auch unter neutralen Bedingungen überprüft werden. Die Untersuchung mit neutralen Lösungen wurde analog zu dem Experiment in Kapitel 4.1.2. durchgeführt: Die C57BL/6J-Mäuse wurden über Nacht gefastet, anschließend folgte eine basale Blutabnahme über den retroorbitalen Sinus und intraperitoneale Injektion der Kontroll-Pufferlösung und der 300 $\mu\text{mol/kg}$ NA-Lösung. Nach 20 min wurde erneut Blut entnommen. Aus dem Blutplasma wurden die Plasmalipide bestimmt. Die gepufferte Kontrolllösung hatte keinen Effekt auf Plasmalipidwerte, wohingegen die gepufferte NA-Lösung eine Reduktion von Plasma-FS und Plasma-Glycerol um 60% auslöste (Abbildung 4.3). Somit waren die Plasmawerte von FS und Glycerol nach gepufferter Kontroll- sowie NA-Behandlung völlig vergleichbar zu den früheren Experimenten (Abbildung 4.2). Das war die Voraussetzung für den durchgängigen Wechsel zu gepufferten Injektionslösungen in den anschließenden *in-vivo*-Experimenten.

4.1.4. NA zeigt keine Auswirkung *in-vivo* auf Lipaseexpression in WAT

Nachdem die Auswirkung von NA auf Plasmalipidwerte bestätigt worden war, wurde die Proteinexpression von Lipasen im epiWAT von NA-behandelten C57BL/6J-Mäusen überprüft. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um eine Veränderung der Proteinexpression der Lipasen in WAT in Gegenwart von NA zu überprüfen.

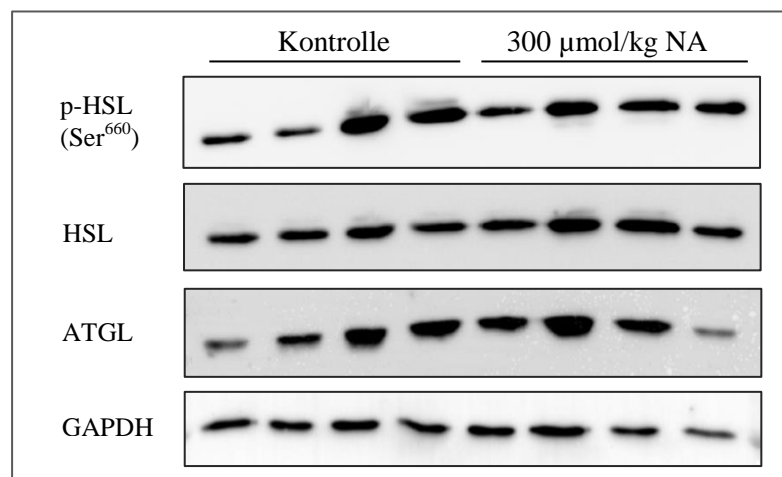


Abbildung 4.4: Proteinexpression in epiWAT nach Kontroll- oder NA-Behandlung von C57BL/6J-Mäusen. Die Totalhomogenate von WAT (20 μg Protein) wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurden Anti-ATGL (1:1.000, ATGL), Anti-phosphorylierte HSL (1:1.000, Phosphorylierung an Serin⁶⁶⁰, p-HSL (Ser⁶⁶⁰)), Anti-HSL (1:1.000, HSL), sowie Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000, GAPDH) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP, 1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die quantitative Analyse wurde mittels Image Lab™ 5.2.1 durchgeführt.

Für die Proteinexpressionsanalyse wurde den C57BL/6J-Mäusen Kontrolllösung (physiologische Kochsalzlösung) oder 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NA intraperitoneal

injiziert. Nach 20 min wurde das epiWAT entnommen. Die Gewebe wurden in Aufschlusspuffer I aufgeschlossen und mittels Western-Bot analysiert. In Abbildung 4.4 wird ersichtlich, dass NA keine Veränderung des Expressionsprofils der phosphorylierten, aktivierten Form von HSL, also p-HSL (Ser⁶⁶⁰), und der Gesamtexpression von HSL hervorruft. Auch die Proteinexpression von ATGL wurde durch die Anwesenheit von NA nicht beeinflusst. Intraperitoneale Verabreichung von NA hat also keine unmittelbare Auswirkung auf die Proteinexpression oder Phosphorylierung von Lipasen im WAT.

4.1.5. NA verändert die lipolytische Aktivität von Lipasen in WAT nicht

In weiterer Folge wurde die Auswirkung von NA auf die lipolytische TGH-Aktivität im WAT mittels TGH-Assay untersucht. Dafür wurden entweder Tris/HCl-Kontrolllösung oder 300 µmol/kg NA intraperitoneal in C57BL/6J-Mäuse injiziert. Das epiWAT wurde 20 min nach der Injektion isoliert. Das Proteinlysate des epiWAT der C57BL/6J-Mäuse wurde mit ³H-markiertem TG für 1 h inkubiert. Mithilfe der lipolytisch freigesetzten, radioaktiv-markierten FS wurde die TGH-Aktivität bestimmt. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle und in Gegenwart der etablierten Lipase-Inhibitoren Atglistatin® (Ai, 40 µM) und HSL-Inhibitor (Hi, 10 µM) war die TGH-Aktivität in WAT-Proben um 35% beziehungsweise um 85% reduziert. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den WAT-Proteinlysaten der

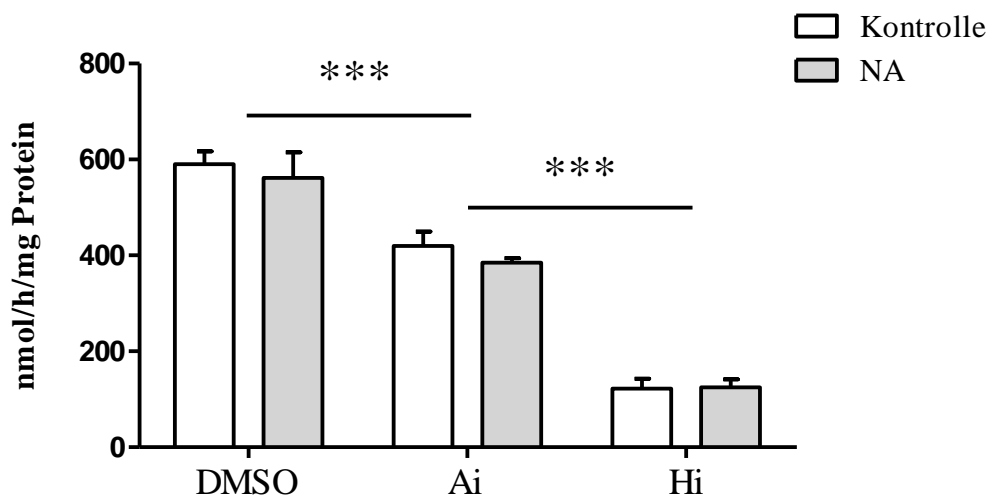


Abbildung 4.5: TGH-Assay mit Kontrolllösungs- oder NA-behandelten Fettgewebslysaten von C57BL/6J-Mäusen. Die TGH-Aktivität wurde *in-vitro* im Proteinlysate (10 µg/Ansatz) aus epiWAT von Kontrolllösung-behandelten und NA-Lösung-behandelten C57BL/6J-Mäusen mit DMSO, Ai, (40 µM) oder (Hi (10 µM) mithilfe eines ³H-markierten Trioleinsubstrates bestimmt. Die freigesetzten FS wurden extrahiert und deren Radioaktivität wurde bestimmt. Die Messungen der Enzymaktivität wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt und sind in „nmol /h/mg Protein“ angegeben. Die Daten sind in Mittelwerten ± S.D. angegeben. n=5. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,001$ (***)

Kontrolllösungs-behandelten Mäuse und der NA-behandelten Mäuse festgestellt (Abbildung 4.5). NA hat keine Auswirkung auf die TGH-Aktivität der Lipasen.

Die Analyse des Effekts von NA auf intrazelluläre Lipolyse wurde anschließend in differenzierten 3T3-L1- und primären Adipozyten weitergeführt. In diesen Modellen wurde überprüft, ob der plasmalipidsenkende Effekt von NA *in vivo* (Abbildung 4.2) durch eine Inhibierung der Lipolyse *in-vitro* in Gegenwart von NA verifiziert werden kann.

4.1.6. Der NA-spezifische Rezeptor GPR109A wird in Adipozytenzelllinien exprimiert

Da im murinen WAT der NA-spezifische Rezeptor GPR109A exprimiert wird (Abbildung 4.1), wurde dessen Proteinexpression auch in den verwendeten Adipozytenzelllinien überprüft. Die Western-Blot-Analyse der Zellhomogenate von differenzierten 3T3-L1-Adipozyten und differenzierten murinen primären Adipozyten zeigte, dass das Rezeptorprotein GPR109A in beiden Adipozytenzelllinien exprimiert wird (Abbildung 4.6). Die Quantifizierung der Proteinbanden mithilfe der Ladekontrolle GAPDH ergab, dass die GPR109A-Expression in primären Adipozyten um 30% höher als in den 3T3-L1-Adipozyten ist. Diese Analyse bestätigte die Rezeptorexpression in den 3T3-L1- und primären Adipozyten. Damit wurde sichergestellt, dass die Auswirkung von NA über GPR109A in den verwendeten Adipozytenzelllinien untersucht werden kann.

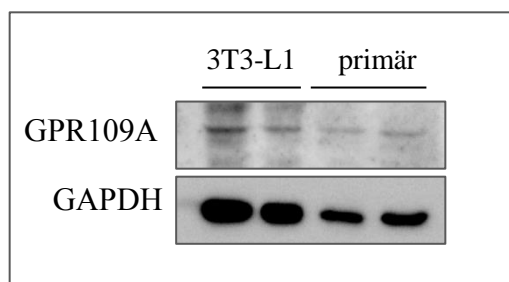


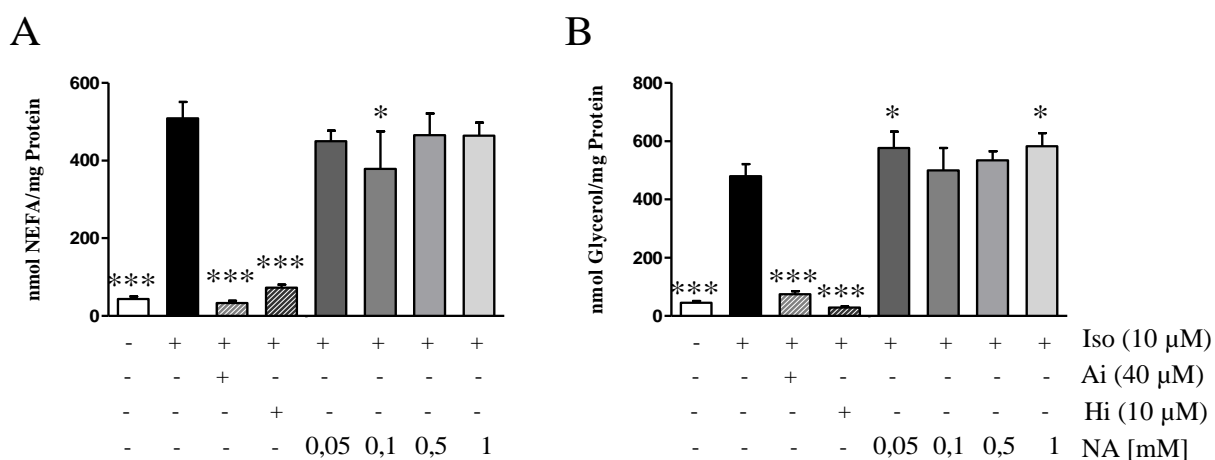
Abbildung 4.6: Proteinexpression des NA-Rezeptors GPR109A in Adipozytenzelllinien. Die Zellhomogenate (50 µg Protein) von differenzierten 3T3-L1-Adipozyten und differenzierten primären Adipozyten wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurde Anti-HM74 (1:1.000, entspricht GPR109A) sowie Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP, 1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1.

4.1.7. NA verursacht in Adipozyten keine Senkung von Lipolyseparametern

Um die Auswirkung von NA auf die intrazelluläre Lipolyse zu überprüfen, wurden Lipolyseexperimente *in-vitro* in Adipozytenzelllinien durchgeführt. So konnten adipozyten-spezifische Wirkmechanismen von NA auf Lipolyse studiert werden. Für das Experiment wurden (i) differenzierte 3T3-L1-Adipozyten und (ii) differenzierte murine primäre Adipozyten aus der stromavaskulären Fraktion von ingWAT unter lipolyse-stimulierten Bedingungen mit 10 µM Isoproterenol sowie in Gegenwart von vier Konzentrationen an NA

für 1 h inkubiert. Als Positivkontrolle für eine Lipolyseinhibierung wurden die etablierten Lipaseinhibitoren Ai und Hi eingesetzt. Als Parameter für die Lipolyse wurden freie FS- und Glycerol-Freisetzung aus den Adipozyten in das Experimentmedium gemessen. Wie erwartet, verringerten die Inhibitoren die FS- und Glycerolfreisetzung in den 3T3-L1-Adipozyten unter lipolyse-stimulierten Bedingungen auf das basale Niveau (Senkung um 80-90%, Abbildung 4.7 A und B). In Gegenwart von 0,1 mM NA wurde eine verringerte FS-Freisetzung in den 3T3-L1-Adipozyten gemessen, weitere Konzentrationen an NA lösten keine signifikante Verringerung der FS-Freisetzung aus. Die Glycerolfreisetzung in den 3T3-L1-Adipozyten

3T3-L1-Adipozyten



primäre Adipozyten

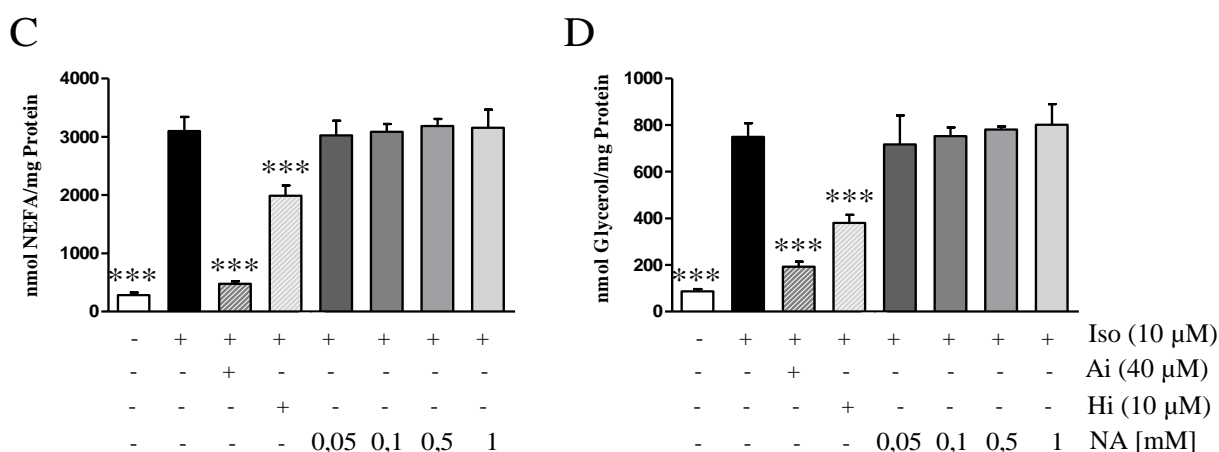


Abbildung 4.7: *in-vitro*-NA-Auswirkung auf kultivierte Adipozyten. (A) zeigt NEFA-, (B) zeigt Glycerolfreisetzung aus differenzierten 3T3-L1-Adipozyten, (C) veranschaulicht NEFA-, (D) veranschaulicht Glycerolfreisetzung aus differenzierten murinen primären Adipozyten. Aus den Adipozyten wurde die Freisetzung von FS und Glycerol in Gegenwart von NA als Lipolyseparameter gemessen. Die Lipolyse der Zellen wurde mit 10 µM Isoproterenol stimuliert, als Positivkontrolle für eine Lipolyseinhibierung wurden die Lipaseinhibitoren Atglistatin® (Ai) und HSL-Inhibitor (Hi) eingesetzt. Außerdem wurden die Zellen mit vier Konzentrationen NA unter lipolyse-stimulierten Bedingungen für 1 h inkubiert (0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM). NEFA- und Glycerolmessungen wurden mit kolorimetrischen Tests im Experimentmedium durchgeführt. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. n=4. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,001$ (***)

wurde in Gegenwart von 0,05 mM und 1 mM NA erhöht (Abbildung 4.7 B). Ähnliche Resultate wurden im Experiment mit den primären Adipozyten erzielt. In den primären Adipozyten verringerte Ai die FS- und Glycerolfreisetzung um 35% beziehungsweise 50% (Abbildung 4.7 C und D). Die unvollständige Inhibierung der HSL in den primären Adipozyten durch Hi liegt an einer zu geringen Konzentration des Inhibitors (Abbildung 4.7 C und D). In Gegenwart von NA wurde keine signifikante Veränderung in der FS- und Glycerolfreisetzung aus den primären Adipozyten gemessen (Abbildung 4.7 C und D). Diese Ergebnisse in 3T3-L1- und primären Adipozyten widersprechen der Hypothese einer Lipolyseinhibierung durch NA.

Zunächst wurde überprüft, ob die supraphysiologische Lipolysestimulierung durch den β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol mit einer Konzentration von 10 μ M zu stark ist und einen Effekt von NA auf die Lipolyse *in-vitro* womöglich überdeckt. Zu diesem Zweck wurde eine Titration mit acht Isoproterenol-Konzentrationen für 1 h durchgeführt (Abbildung 4.8). Die Glycerolfreisetzung in das Experimentmedium stieg mit steigenden Isoproterenol-Konzentrationen. Mit 5 μ M Isoproterenol wurde die höchste Stimulierung der Glycerolfreisetzung aus den 3T3-L1-Adipozyten beobachtet. Mithilfe dieses Experiments konnten geeignete Isoproterenolkonzentrationen für folgende Untersuchungen gewählt werden, um den Effekt von NA auf schwach stimulierte Lipolyse zu beobachten. Für das

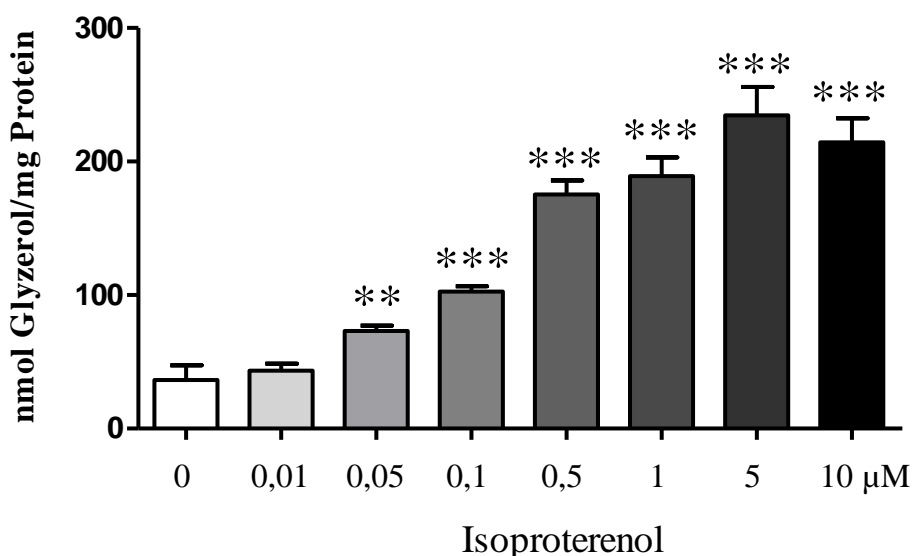
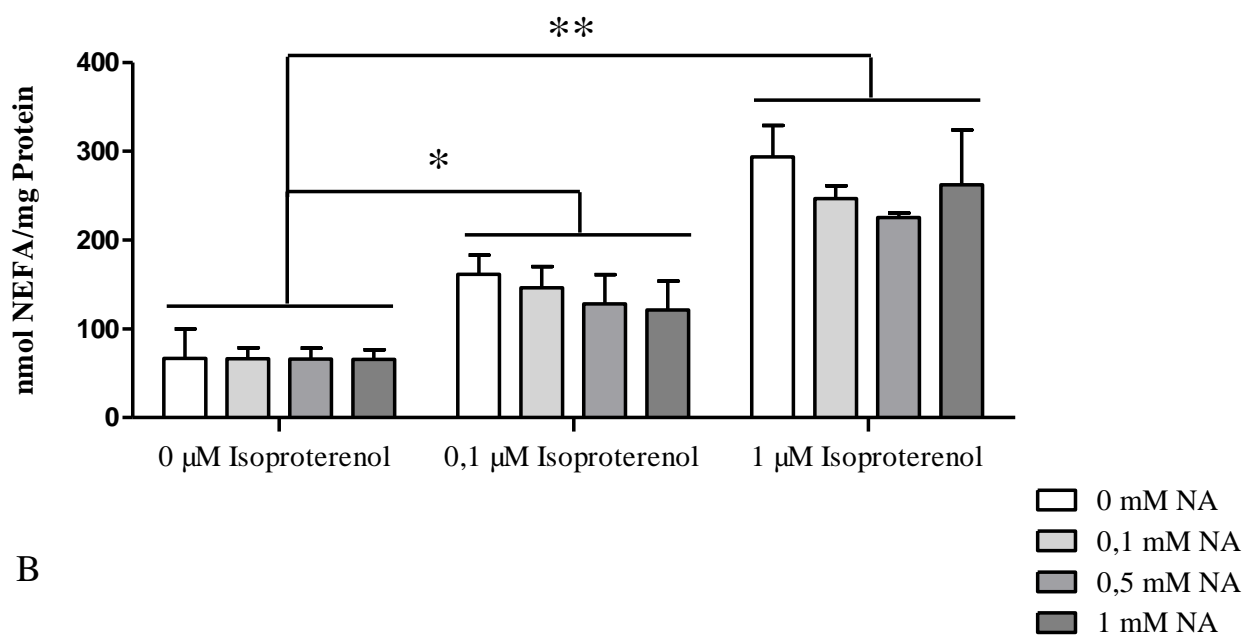


Abbildung 4.8: *in-vitro*-Titration des β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol in kultivierten 3T3-L1-Adipozyten. Differenzierte 3T3-L1-Adipozyten wurden mit 8 Konzentrationen Isoproterenol (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; und 10 μ M) im Medium für 60 min inkubiert. Lipolytische Glycerolfreisetzung aus dem Experimentmedium wurde mittels kolorimetrischem Test gemessen. $n=3$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

folgende Experiment wurde im Zuge der Titration eine 1 μM Isoproterenol-Konzentration gewählt, um einen Wert nahe an der Vollstimulierung zu verwenden. Zusätzlich wurde 0,1 μM Isoproterenol ausgewählt, um eine schwache Stimulierung der intrazellulären Lipolyse zu erzielen.

Zunächst wurde ein Experiment gemäß des *in-vitro*-Experiments mit NA in Abbildung 4.7 mit verringerten Isoproterenol-Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurden drei „Inkubations-Gruppen“ von 3T3-L1-Adipozyten untersucht. Als basale Kontrolle wurde Experimentmedium mit 0 μM Isoproterenol verwendet, außerdem wurden 0,1 μM

A



B

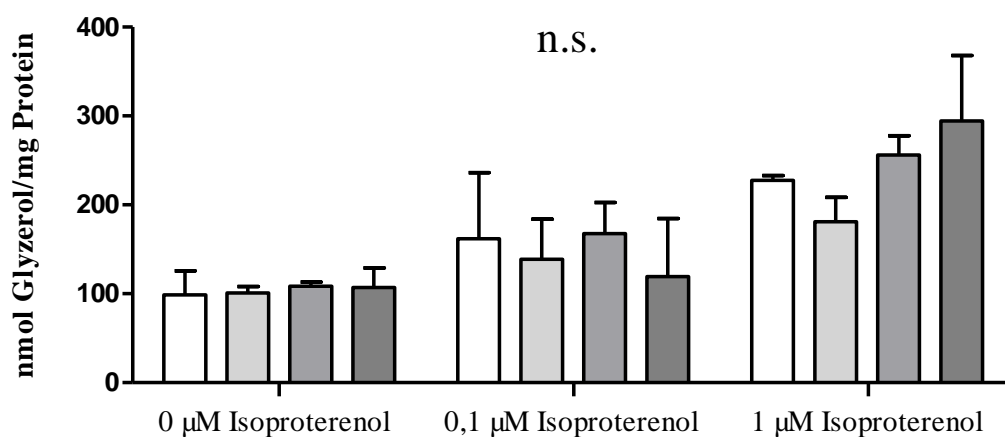


Abbildung 4.9: *in-vitro*-Auswirkung von NA auf kultivierte 3T3-L1-Adipozyten bei unterschiedlich stark stimulierten Lipolysebedingungen. Differenzierte 3T3-L1-Adipozyten wurden auf die Freisetzung von Lipolyseparametern (FS und Glycerol) nach NA-Behandlung überprüft. Die Lipolyse der Zellen wurde mit Isoproterenol (0 μM , 0,1 μM oder 1 μM) stimuliert. Außerdem wurden die Zellen mit vier verschiedenen Konzentrationen NA für 1 h inkubiert (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM NA). FS- und Glycerolmessungen aus dem Experimentmedium wurden mit kolorimetrischen Tests durchgeführt. (A) zeigt NEFA, (B) zeigt Glycerol. n.s.= nicht signifikant. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. n=3. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Isoproterenol und 1 μM Isoproterenol eingesetzt (Abbildung 4.9). In jeder Gruppe wurden vier NA-Konzentrationen in einer einstündigen Inkubation ausgetestet. In Abbildung 4.9 A wird ersichtlich, dass die FS-Freisetzung im Vergleich zur basalen Kontrolle mit 0,1 μM und 1 μM Isoproterenol stimuliert wurde. Die FS- und Glycerolfreisetzung wurde durch NA in keiner der Inkubationsgruppen gehemmt (Abbildung 4.9 A und B). In diesem Experiment wurde keine Inhibierung von schwach stimulierter Lipolyse durch NA in Adipozyten gezeigt. Außerdem wurde ersichtlich, dass der NA-Effekt in Adipozyten nicht durch die β -adrenerge Lipolysestimulierung mit Isoproterenol überdeckt wird.

4.1.8. NA verursacht keine Veränderung der Lipaseexpression in Adipozytenzelllinien

Nachdem keine Hemmung der intrazellulären Lipolyse in Adipozyten durch NA ersichtlich wurde, wurde die Proteinexpression der Lipasen HSL (phosphorylierte, aktivierte Form, p-HSL (Ser⁶⁶⁰) und Gesamtproteinexpression HSL) und ATGL nach NA-Behandlung in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten (Abbildung 4.10 A) und in differenzierten murinen primären Adipozyten (Abbildung 4.10 B) mittels Western-Blot überprüft. Dafür wurde die Lipolyse in den Adipozytenzelllinien mit 10 μM Isoproterenol stimuliert und zusätzlich mit vier Konzentrationen NA für 1 h inkubiert. Danach wurden die Zellhomogenate gewonnen

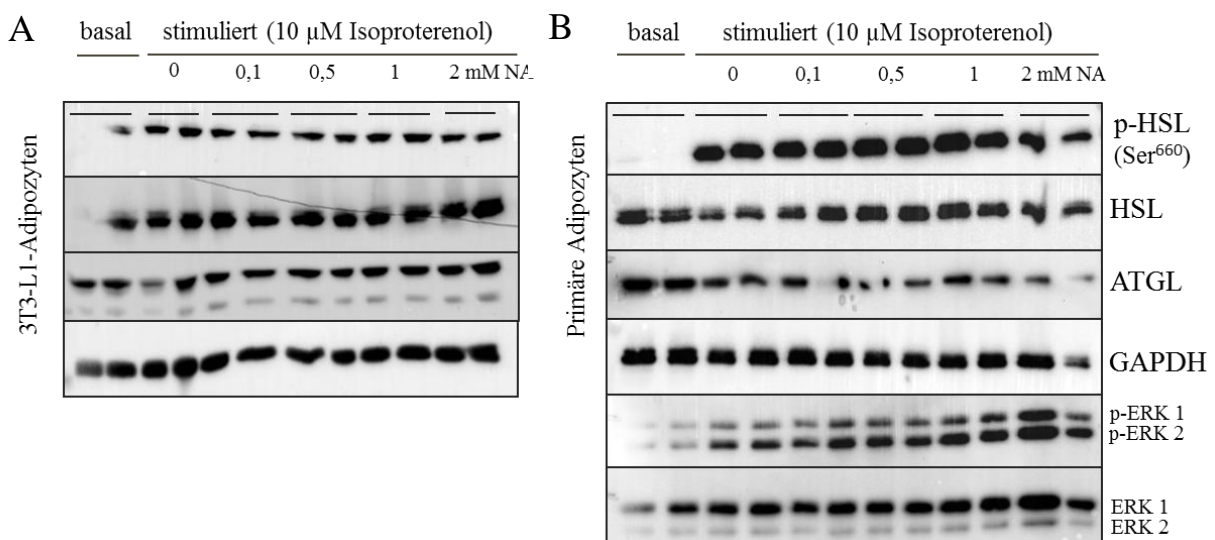


Abbildung 4.10: Proteinexpression von Lipasen und *extracellular signal-regulated kinase 1 und 2* (ERK 1 und 2) in Adipozytenzelllinien nach NA-Behandlung. Die Adipozyten wurden für 1 h unter basaler und lipolyse-stimulierter Bedingung mit 10 μM Isoproterenol und fünf unterschiedlichen NA-Konzentrationen (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM NA) inkubiert. Die Zellhomogenate (20 μg Protein) wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurden phosphorylierte HSL (1:1.000, Phosphorylierung an Serin⁶⁶⁰, p-HSL (Ser⁶⁶⁰)), Gesamt-HSL (1:1.000, HSL), ATGL (1:1.000, ATGL), Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000, GAPDH), phosphoryliertes ERK 1 und 2 (1:1.000, p-ERK) sowie Gesamt-ERK 1 und 2 (1:1.000, ERK), verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP) (1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1.

und analysiert. Im Vergleich der basalen mit den stimulierten p-HSL-Proteinbanden wird anhand der Phosphorylierung der HSL ersichtlich, dass die Lipolyse in beiden Zelllinien stimuliert wurde (Abbildung 4.10). Die p-HSL-Expression und somit HSL-Aktivierung veränderte sich in keiner der Adipozytenzelllinien nach NA-Behandlung in Gegenüberstellung zu den Isoproterenol-stimulierten Proteinbanden. Auch die Proteinexpression von HSL und ATGL blieb in Gegenwart von NA unverändert (Abbildung 4.10).

Zusätzlich wurde in den primären Adipozytenhomogenaten die Proteinexpression von *extracellular signal-regulated kinases 1 und 2* (ERK 1 und ERK 2) überprüft, um den Effekt von NA auf den MAPK-ERK-Signaltransduktionsweg zu studieren. ERK sind Kinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und die Lipolyse durch weitere Phosphorylierungen stimulieren (Wang et al., 2008). Wenn NA eine Herabregulation von p-ERK 1/2 oder auch Gesamt-ERK 1/2 verursacht, wird intrazelluläre Lipolyse inhibiert. Dementgegen blieb die Proteinexpression von Gesamt-ERK 1/2 in Gegenwart von NA unverändert und die Proteinexpression der phosphorylierten ERK 1/2 nahm sogar mit steigenden NA-Konzentrationen zu (Abbildung 4.10 B). NA hat also keine hemmende Auswirkung auf die Proteinexpression und Phosphorylierung von Lipasen und Lipolyseregulatoren in den verwendeten Adipozytenzelllinien.

4.1.9. NA verursacht keine Veränderung von Lipolyseparametern in Fettgewebsexplantaten

Zunächst wurde die Wirkung von NA auf WAT-Explantate überprüft, um einen möglichen Einfluss des Fettgewebsverbandes auf die Auswirkung von NA auf Lipolyse zu erforschen. Die Fettgewebsstücke wurden aus dem epiWAT von C57BL/6J-Mäusen entnommen und anschließend unter basalen Bedingungen für 2 h und unter lipolyse-stimulierten Bedingungen mit 10 μ M Isoproterenol für 1 h sowie mit jeweils fünf Konzentrationen an NA inkubiert.

Als Lipolyseparameter wurden FS- und Glycerolfreisetzung aus den Fettgewebsstücken in das Medium gemessen. In Abbildung 4.11 A und B wird ersichtlich, dass die FS- und Glycerolfreisetzung durch Isoproterenol stimuliert wurde.

NA löste im Vergleich zu der basalen Kontrolle (0 mM NA) weder in den basalen, mit Experimentmedium inkubierten noch in den mit 10 μ M Isoproterenol lipolyse-stimulierten Fettgewebstücken eine Verringerung der FS-Freisetzung aus. Die Freisetzung von Glycerol wurde in Gegenwart von 1 mM NA verringert (Abbildung 4.11). Diese Daten weisen darauf hin, dass NA die intrazelluläre Lipolyse im Fettgewebsverband nicht hemmt.

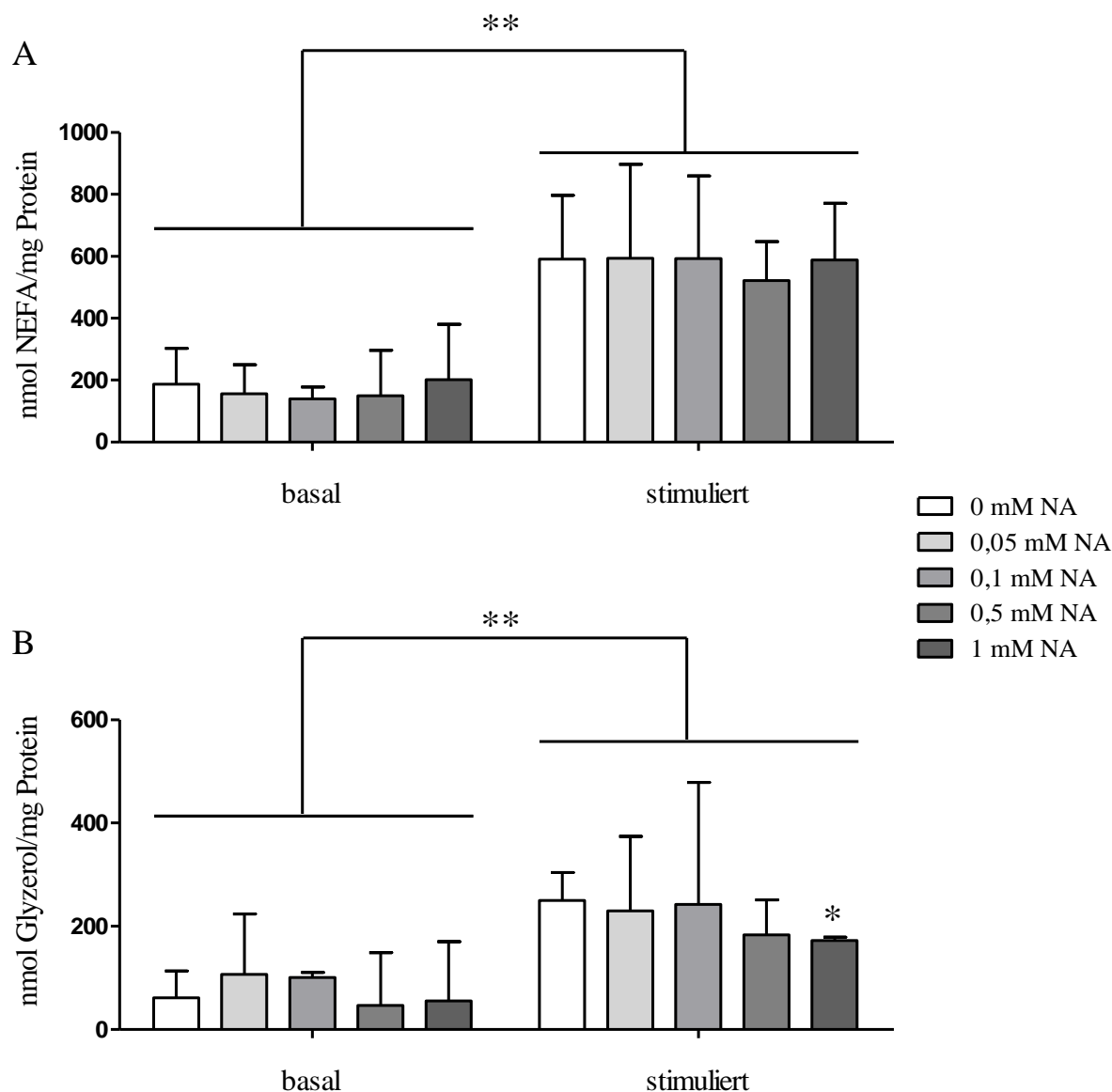


Abbildung 4.11: Auswirkung von NA auf Gewebsexplantate aus WAT *ex-vivo* unter basalen und lipolyse-stimulierten Bedingungen. Gewebsexplantate aus WAT wurden aus *ad-libitum*-gefütterten C57BL/6J-Mäusen entnommen und auf die Freisetzung von Lipolyseparametern (FS und Glycerol) nach NA-Behandlung überprüft. Die Explantate wurden unter basaler Lipolyse (Inkubation für 2 h, in Experimentmedium) und mit Isoproterenolstimulierung (Inkubation für 1 h, 10 μ M Isoproterenol) inkubiert. Außerdem wurden die Fettgewebe mit fünf Konzentrationen an NA inkubiert (0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM NA). FS- und Glycerolmessungen aus dem Experimentmedium wurden mit kolorimetrischen Tests durchgeführt. **(A)** zeigt NEFA, **(B)** zeigt Glycerol. $n=5$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

4.1.10. NA senkt Plasmawerte von FS, Glycerol und TG in lipase-defizienten Mäusen

Die bisher generierten *in-vitro*-Daten der 3T3-L1- und primären Adipozyten sowie der *ex-vivo*-Fettgewebsexplantate zeigten keine Hemmung der intrazellulären Lipolyse durch NA. Um den inhibitorischen Effekt von NA auf die Lipolyse *in-vivo* zu studieren, wurden lipase-defiziente Mäuse verwendet, deren Lipasen HSL und ATGL auf genetischer Ebene adipozyten-spezifisch ausgeschaltet sind. Mithilfe der adipozyten-spezifischen ATGL-KO-Mäuse (AAKO), adipozyten-spezifischen HSL-KO-Mäuse (AHKO) und adipozyten-spezifischen ATGL-HSL-Doppel-KO-Mäuse (DAKO) konnte die Auswirkung von NA auf die intrazellulären Lipasen *in-vivo* untersucht werden. Bei einer Lipolysehemmung durch NA wird folglich ein Ausbleiben der Plasmalipidsenkung in lipase-defizienten Mäusen erwartet, da in diesen Mäusen die Lipasen als Target von NA fehlen.

NA-Auswirkung auf Plasmalipide in AAKO-Mäusen

Um möglichst vergleichbare *in-vivo*-Experimente mit den lipase-defizienten Mausmodellen durchzuführen, wurden die Untersuchungen über die Auswirkung von NA auf die AAKOs an die Experimente mit den C57BL/6J-Mäusen angelehnt (Abbildung 4.2). Anstatt einer nächtlichen Fastenperiode wurden die AAKO- und die Kontrolltiere (ATGL^{flox/flox}) für 6 h gefastet, da die AAKOs durch die ATGL-Defizienz im Fettgewebe kaum FS als Energiesubstrat mobilisieren können und vom Nahrungsentzug durch das entstehende Energiedefizit lethargisch werden. Aufgrund des veränderten Stoffwechsels sinkt ihre Körpertemperatur im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen ab (Kontrollen: $37,2 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$; AAKO; $36,1 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$; $p=0,00011$).

Nach der Fastenperiode wurde eine basale Blutabnahme zum Zeitpunkt 0 min über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Anschließend wurden den Kontroll- und AAKO-Tieren 300 $\mu\text{mol/kg}$ NA in Tris/HCl-Puffer intraperitoneal verabreicht. Weiters wurde eine retroorbitale Blutabnahme 20 min nach der Injektion durchgeführt. Die Plasmaparameter wurden aus dem Blutplasma bestimmt. Im Vergleich zu den Plasma-FS und Plasma-Glycerolwerten der Kontrolltiere waren die Plasmawerte der AAKO-Mäuse bereits nach der sechsständigen Fastenperiode an Zeitpunkt 0 min um 60% verringert (Abbildung 4.12).

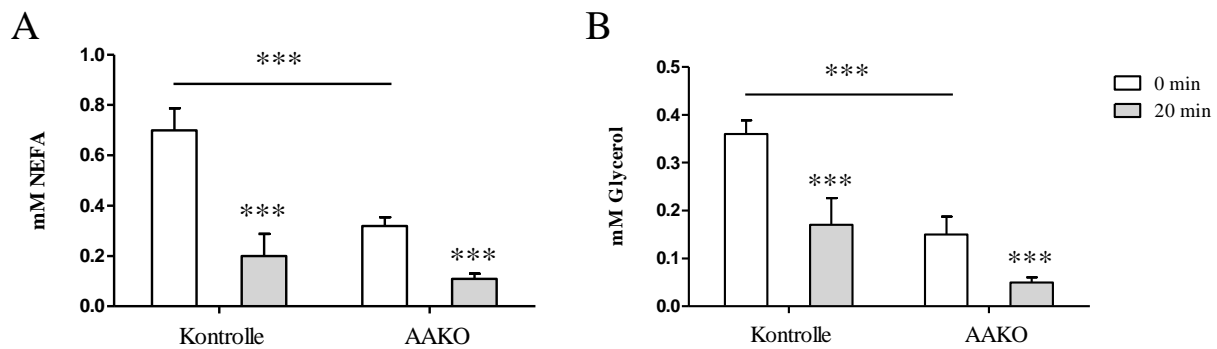


Abbildung 4.12: *in-vivo*-Auswirkung von NA auf gefastete Kontroll- und AAKO-Mäuse. Die Mäuse wurden für 6 h, von 8 bis 14 Uhr, gefastet. Anschließend wurde basales Blut über den retroorbitalen Sinus entnommen, danach wurden 300 $\mu\text{mol/kg}$ NA in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) intraperitoneal injiziert. Nach 20 min wurde eine weitere Blutabnahme durchgeführt. Aus den Plasmaproben wurden Lipidparameter mithilfe kolorimetrischer Tests bestimmt: **(A)** zeigt NEFA, **(B)** zeigt Glycerol. Die Mäuse waren weiblich und 19-20 Wochen alt. $n=6$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiseitigen Student's t -test ermittelt. $p < 0,001$ (***)

Dieser Unterschied weist auf eine beeinträchtigte Lipolyse durch die genetische ATGL-Defizienz in den AAKO-Mäusen hin. Im Vergleich von Zeitpunkt 0 und 20 min des jeweiligen Genotyps waren die Plasma-FS in Kontrolltieren um 70% und in AAKO-Tieren um 65% reduziert (Abbildung 4.12 A). Die Plasmaglycerol-Werte waren in den Kontrollmäusen um 50% und in den AAKO-Mäusen um 66% reduziert (Abbildung 4.12 B). Mit diesem Experiment wurde ersichtlich, dass die Senkung der Plasmalipidwerte durch NA unabhängig von der Lipase ATGL in Adipozyten ist.

Zunächst wurde die Lipaseexpression in den AAKO-Tieren untersucht, um den genetischen KO zu verifizieren und um die verbleibende Restexpression der zweiten reaktionsbestimmenden Lipase HSL in den AAKOs zu überprüfen. Dazu wurde in Western-Blots die Lipaseexpression in Totalhomogenaten des epiWAT von AAKO-Mäusen und Kontrollmäusen überprüft. In Abbildung 4.13 wird im Vergleich zu den ident

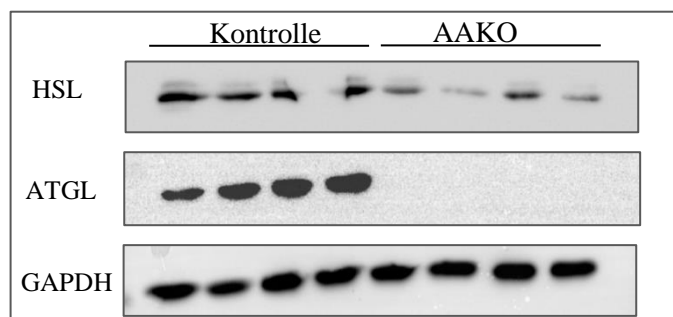


Abbildung 4.13: Proteinexpression von Lipasen im WAT von Kontroll- und AAKO-Mäusen. Die Homogenate (20 μg Protein) wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurden Anti-HSL (1:1.000), Anti-ATGL (1:1.000), sowie Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP) (1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1.

Kontrolltier-WAT eine völlige ATGL-Defizienz im AAKO-WAT ersichtlich. Auch die Proteinexpression der Lipase HSL ist in den AAKO-Homogenaten im Vergleich zu Kontrolltier-Homogenaten um 55% verringert (Abbildung 4.13). Die AAKO-Tiere weisen also eine völlige ATGL-Defizienz und ebenfalls eine Reduktion der HSL-Proteinexpression im WAT auf.

NA-Auswirkung auf Plasmalipide in AHKO-Mäusen

Die *in-vivo*-Experimente mit den AHKO-Mäusen wurden analog zu den AAKOs (Abbildung 4.12) durchgeführt. Die AHKO-Mäuse und die Kontrolltiere (HSL^{flox/flox}) wurden für 6 h gefastet, da der Stoffwechsel durch die mangelnde HSL-betriebene Lipolyse im Fettgewebe bei Nahrungsentzug aufgrund eines Energiedefizits beeinträchtigt ist. Dieser Effekt ist bei AHKO-Mäusen jedoch nicht so ausgeprägt wie bei AAKO-Mäusen. Das liegt daran, dass ATGL die reaktionslimitierende Lipase in der TG-Mobilisierung ist. Die Körpertemperatur der AHKO-Mäuse ist im Bereich der Kontrollmäuse, was ebenfalls auf einen geringfügig beeinträchtigten Stoffwechsel durch den HSL-KO hinweist (Dr. Gabriele Schoiswohl, unveröffentlichte Daten).

Um die Experimente einheitlich durchzuführen, wurde auch für AHKOs und den zugehörigen Kontrolltieren eine Fastenperiode von 6 h gewählt. Danach wurde eine basale Blutabnahme zu Zeitpunkt 0 min über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Nach der Blutabnahme wurde 300 µmol/kg NA in Tris/HCl-Puffer intraperitoneal in die Mäuse injiziert. Eine weitere retroorbitale Blutabnahme wurde 20 min nach der Injektion durchgeführt. Der Plasma-FS-Wert zum Zeitpunkt 0 min zeigte bei den AHKO-Mäusen keine signifikante Verringerung gegenüber den Kontrollmäusen (Abbildung 4.15 A). Im Vergleich von Zeitpunkt 0 und 20 nach der NA-Behandlung waren die Plasma-FS in Kontrolltieren um 45% und in AHKO-Tieren um 60% reduziert (Abbildung 4.15 A). Plasma-Glyzerol war in AHKO-Mäusen zum Zeitpunkt 0, nach einer sechsständigen Fastenperiode, im Vergleich zu den Kontrollen, um 50% verringert (Abbildung 4.15 B). In Gegenüberstellung von Zeitpunkt 0 und 20 min des jeweiligen Genotyps waren die Plasmaglyzerol-Werte in den Kontrollmäusen um 35% und in den AHKO-Mäusen um 15% (nicht signifikant) reduziert. Die Plasma-TG und Plasma-Glukose blieben nach NA-Verabreichung in beiden Genotypen konstant (Abbildung 4.15 C und D). Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Senkung der Plasmalipidwerte durch NA unabhängig von der Lipase HSL in Adipozyten ist.

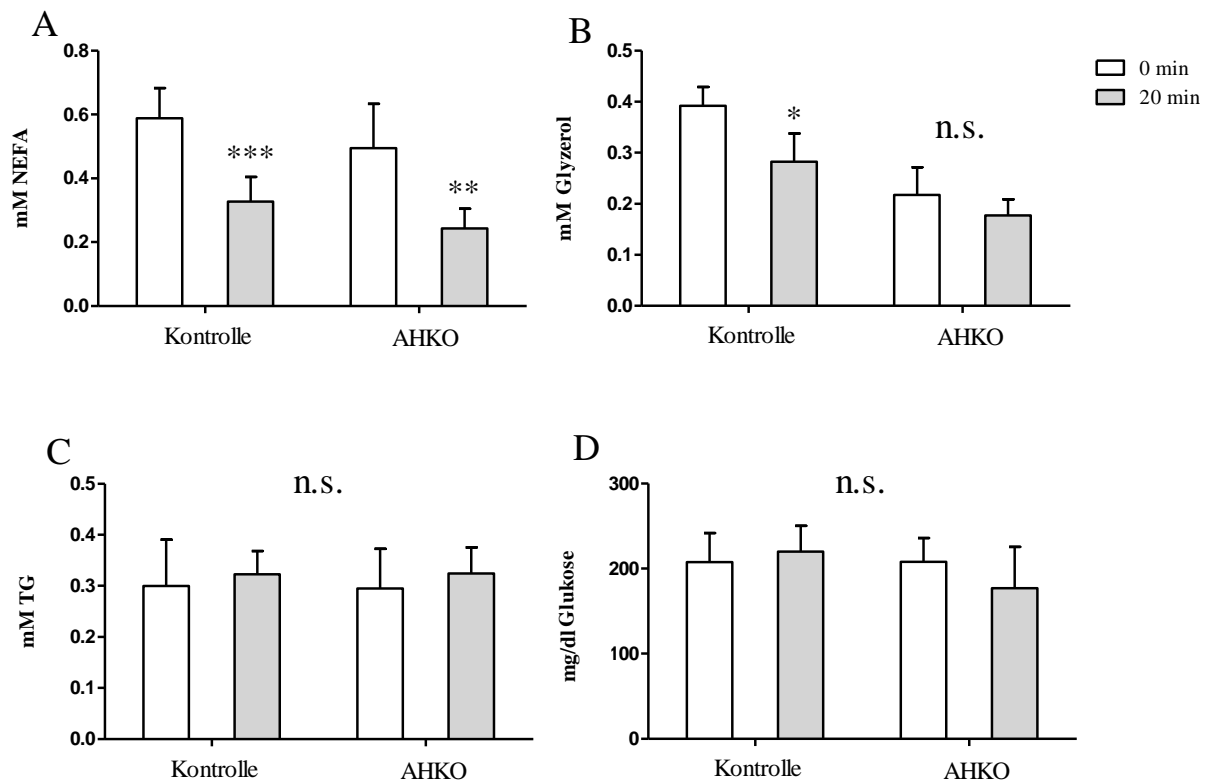


Abbildung 4.15: *in-vivo*-Auswirkung von NA auf gefastete Kontroll- und AHKO-Mäuse. Die Mäuse wurden für 6 h, von 8 bis 14 Uhr gefastet. Über den retroorbitalen Sinus wurde eine basale Blutabnahme durchgeführt, anschließend wurden 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NA in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) intraperitoneal injiziert. Eine weitere Blutabnahme wurde nach 20 min durchgeführt. Aus den Plasmaproben wurden Lipidparameter mittels kolorimetrischer Tests und Glukose mit Glukosestreifen bestimmt: (A) zeigt NEFA, (B) zeigt Glycerol, (C) zeigt TG, (D) zeigt Glukose. Die Mäuse waren männlich und 10-11 Wochen alt. $n=5$. n.s.= nicht signifikant. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Zunächst wurde die HSL-Defizienz in den AHKO-Mäusen untersucht, um den genetischen HSL-KO zu verifizieren und um die verbleibende Restexpression der zweiten reaktionsbestimmenden Lipase ATGL in den AHKOs zu überprüfen. Dazu wurde die Lipaseexpression in Western-Blots in Totalhomogenaten des epiWAT aus AHKO-Mäusen

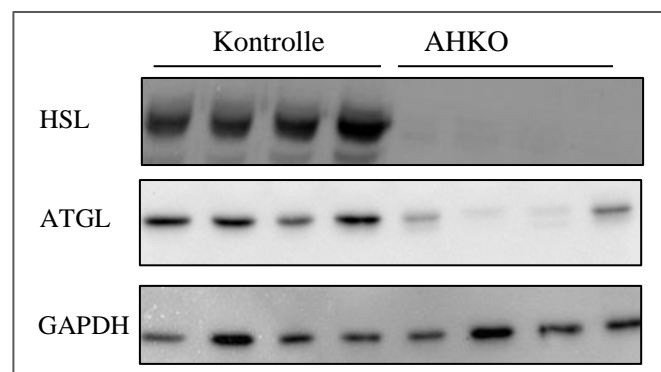


Abbildung 4.14: Proteinexpression von Lipasen im WAT von Kontroll- und AHKO-Mäusen. Die Totalhomogenate (20 μg Protein) wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurden Anti-HSL (1:1.000), Anti-ATGL (1:1.000), sowie Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP) (1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die Analyse der Signalintensitäten erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1.

und Kontrollmäusen überprüft. Im Vergleich zu den ident verarbeiteten Kontrolltier-WAT ist die HSL-Proteinexpression in AHKO-WAT vollkommen ausgeschaltet. Auch die Proteinexpression der Lipase ATGL im AHKO-WAT ist im Vergleich zur Kontrolle um 80% reduziert (Abbildung 4.14). Die AHKO-Tiere weisen also eine völlige HSL-Defizienz und ebenfalls eine Reduktion der ATGL-Proteinexpression im Fettgewebe auf.

NA-Auswirkung auf Plasmalipide in DAKO-Mäusen

Die vorausgegangenen Untersuchungen in den lipase-defizienten Mauslinien AAKOs und AHKOs zeigten eine jeweils von ATGL oder HSL unabhängige NA-Wirkung. Aus den Western-Blot-Analysen wurde aber ersichtlich, dass beide Einzel-KO-Modelle AAKOs und AHKOs eine Restexpression der jeweils anderen Lipase und daher eine verbleibende Lipolyseaktivität aufweisen (Abbildung 4.13, Abbildung 4.14). Deshalb wurde die Untersuchung einer möglichen lipolyse-unabhängigen Wirkung von NA in DAKO-Mäusen fortgeführt. Im Gegensatz zu den separaten adipozyten-spezifischen AAKO- und AHKO-Mäusen weisen die DAKO-Mäuse eine genetische adipozyten-spezifische Defizienz beider lipolyse-bestimmenden Lipasen ATGL und HSL auf.

Da den DAKO-Mäusen ATGL und HSL in Adipozyten fehlen, können sie keine FS als Energiereservoir mobilisieren. Deshalb reagieren sie sehr schnell und empfindlich auf Nahrungsentzug, was sich in einem eingeschränkten Stoffwechsel mit rapidem Abfall der Körpertemperatur und völliger Lethargie innerhalb weniger Stunden äußert. Daher wurden die Experimente mit *ad-libitum*-gefütterten DAKO-Mäusen und *ad-libitum*-gefütterten Kontrollmäusen durchgeführt.

Den Kontroll- und DAKO-Tieren wurde zuerst basales Blut über den retroorbitalen Sinus abgenommen. Anschließend wurde 300 $\mu\text{mol/kg}$ NA in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) intraperitoneal in die Kontrolltiere und DAKOs und injiziert. Nach 20 min wurde den Tieren erneut eine Blutprobe über den retroorbitalen Sinus abgenommen. Aus dem Blutplasma wurden die Plasmalipidparameter bestimmt. Die Plasmawerte von FS, Glyzerol und TG in den Kontrolltieren waren 20 min nach der NA-Injektion um 25%, 40% beziehungsweise 35% reduziert (Abbildung 4.16 A, B und C). Die Plasmawerte von FS, Glyzerol und TG der DAKO-Mäuse waren bei einer *ad-libitum*-Fütterung zum Zeitpunkt 0 min im Vergleich zu den Kontrolltieren um 50%, 60% beziehungsweise 45% reduziert (Abbildung 4.16 A, B und C). Plasma-FS und Plasma-Glyzerol der DAKO-Mäuse waren 20 min nach NA-Verabreichung um 50% (Abbildung 4.16 A) beziehungsweise 25% (nicht signifikant)

(Abbildung 4.16 B) reduziert, die Plasma-TG blieben unverändert (Abbildung 4.16 C). Plasma-Glukose blieb in Kontroll- und DAKO-Tieren konstant (Abbildung 4.16 D). Diese Daten zeigen, dass die Senkung der Plasmalipidwerte durch NA unabhängig von den Lipasen ATGL und HSL in Adipozyten ist.

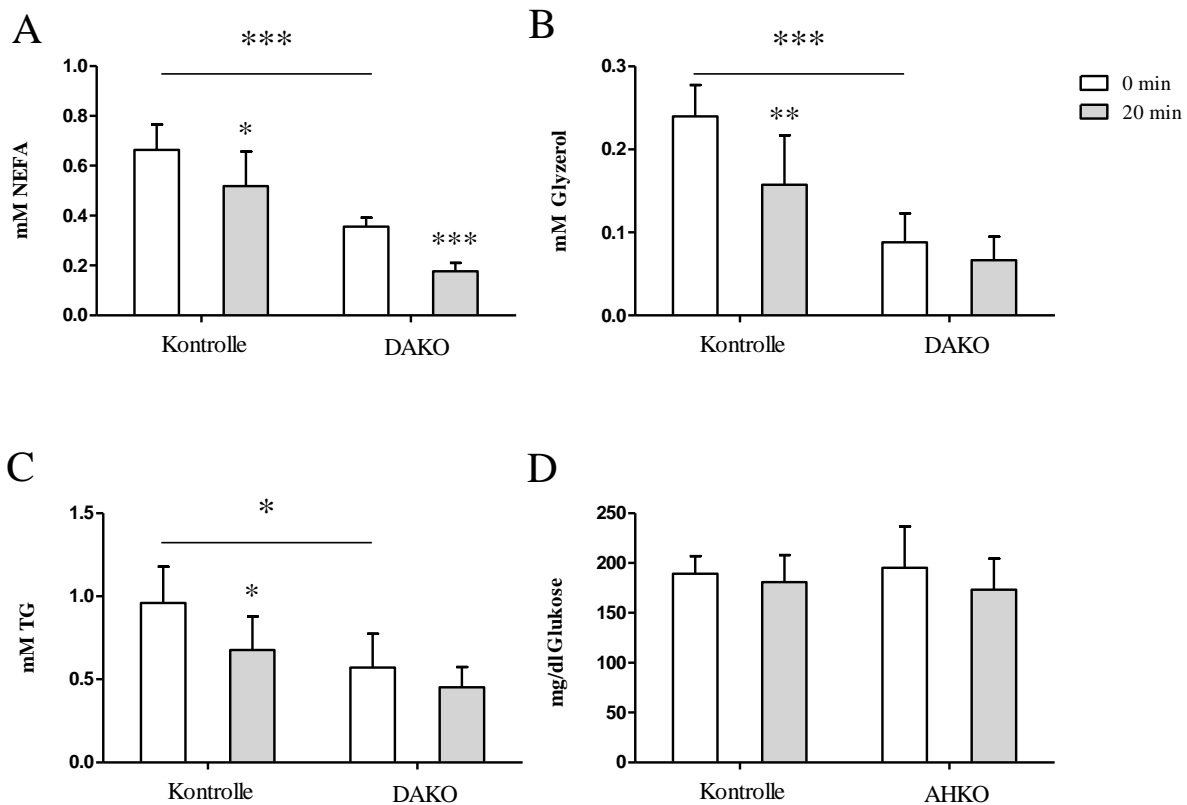


Abbildung 4.16: *in-vivo*-Auswirkung von NA auf gefütterte Kontroll- und DAKO-Mäuse. Die Mäuse wurden *ad libitum*-gefüttert. Zuerst wurde eine basale Blutabnahme über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Anschließend wurden 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NA in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) intraperitoneal injiziert. Eine weitere Blutprobe wurde nach 20 min entnommen. Aus den Plasmaproben wurden Lipidparameter mithilfe kolorimetrischer Tests und Plasmaglukose mit Glukosestreifen bestimmt. (A) zeigt NEFA, (B) zeigt Glycerol, (C) zeigt TG, (D) zeigt Glukose. Die Mäuse waren männlich (n=4), weiblich (n=2) und 14-15 Wochen alt. n=6. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt.

Zunächst wurde die ATGL- und HSL-Defizienz in den DAKO-Mäusen untersucht, um den genetischen ATGL- und HSL-KO zu verifizieren. Western-Blot-Analysen des Totalhomogenats aus epiWAT von DAKO-Mäusen zeigten im Vergleich zu den ident verarbeiteten Kontrolltier-WAT (ATGL^{flox/flox}/HSL^{flox/flox}) eine völlige ATGL- und HSL-Defizienz (Abbildung 4.17).

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit in *in-vitro*- sowie in *ex-vivo*-Versuchsansätzen keine Lipolysehemmung durch NA festgestellt. Auch die Ergebnisse der *in-vivo*-Versuchsansätze mit drei lipase-defizienten Mausmodellen deuten auf eine lipase-unabhängige Wirksamkeit von NA auf Plasmalipide hin.

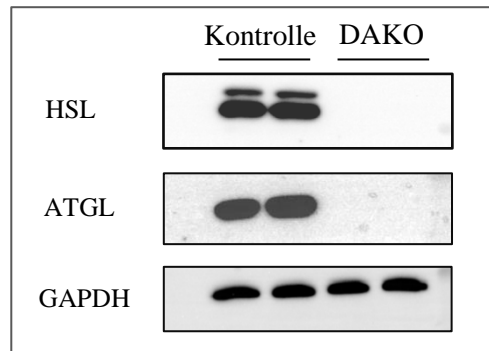


Abbildung 4.17: Proteinexpression von Lipasen im WAT von Kontroll- und DAKO-Mäusen. Die Totalhomogenate von epiWAT (20 µg Protein) wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurden Anti-HSL (1:1.000), Anti-ATGL (1:1.000), sowie Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP) (1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die Analyse der Signalintensitäten erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1.

4.2. Untersuchung von alternativen Wirkmechanismen von NA

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass NA Plasma-FS, Plasma-TG und Plasma-Glyzerol senkt. Die Hypothese einer Lipolyseinhibierung durch NA wurde jedoch nicht bestätigt. Aus diesem Grund wurden alternative Hypothesen über den Wirkmechanismus von NA studiert, die zu einer Plasmalipidsenkung führen können. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass NA zu einer verstärkten Reesterifizierung von FS in Adipozyten führt. Durch eine erhöhte Reesterifizierungsaktivität in den Adipozyten werden die FS aus der Zirkulation in die Fettzellen aufgenommen und es kommt zu einer Verringerung der Plasma-FS. Eine andere Hypothese ist eine verstärkte FS-Oxidation in der Leber in Gegenwart von NA. Dieser Vorgang würde die verringerten Plasma-FS und Plasma-TG erklären, da durch einen Mangel an Plasma-FS folglich geringere TG-Mengen in der Leber reesterifiziert und wieder in die Zirkulation entlassen werden. Ein dritter hypothetischer Wirkungsweg von NA ist die verstärkte FS-Aufnahme in oxidative Gewebe, wie beispielsweise Herzmuskel, Skelettmuskel- oder BAT-Zellen, wo FS zur Energiegewinnung benötigt werden. Diese alternativen Wirkmechanismen von NA werden im folgenden Kapitel bearbeitet.

4.2.1. NA hat keine Auswirkung auf die FS-Reesterifizierung in Adipozyten

Das Enzym DGAT1 katalysiert die Reesterifizierung von FS zu TG in Adipozyten, dieser Prozess ist unter lipolyse-stimulierten Bedingungen besonders aktiv (Chitraju et al., 2017). Da auch die Proteinexpression des NA-spezifischen Rezeptors GPR109A unter lipolyse-stimulierten Bedingungen hochreguliert ist, besteht die Möglichkeit, dass NA die FS-

Reesterifizierung durch DGAT1 in Adipozyten verstärkt. Mithilfe von ^{14}C -markierten FS wurde die FS-Reesterifizierung in Form von TG in murinen primären Adipozyten in Gegenwart von NA analysiert.

Die murinen primären Adipozyten wurden für 90 min in Minimalmedium I unter Lipolysestimulierung mit 10 μM Isoproterenol und mit ^{14}C -markierten FS (1 $\mu\text{Ci}/\text{Well}$) inkubiert. Zusätzlich wurden vier Konzentrationen an NA eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Lipidextrakte aus den primären Adipozyten gewonnen. Die Lipidextrakte wurden in einer DC analysiert, indem sie nach Lipidspezies aufgetrennt wurden (Abbildung 4.18 A). Durch die radioaktive Markierung der FS konnte die FS-Reesterifizierung in Form einer Inkorporation der FS in TG verfolgt werden. In der DC wird ersichtlich, dass im Vergleich zur basalen Kontrolle eine Lipolysestimulierung durch Isoproterenol stattgefunden hat, da im Gegensatz zur basalen Kontrolle die TG unter Isoproterenol-Stimulierung mobilisiert wurden

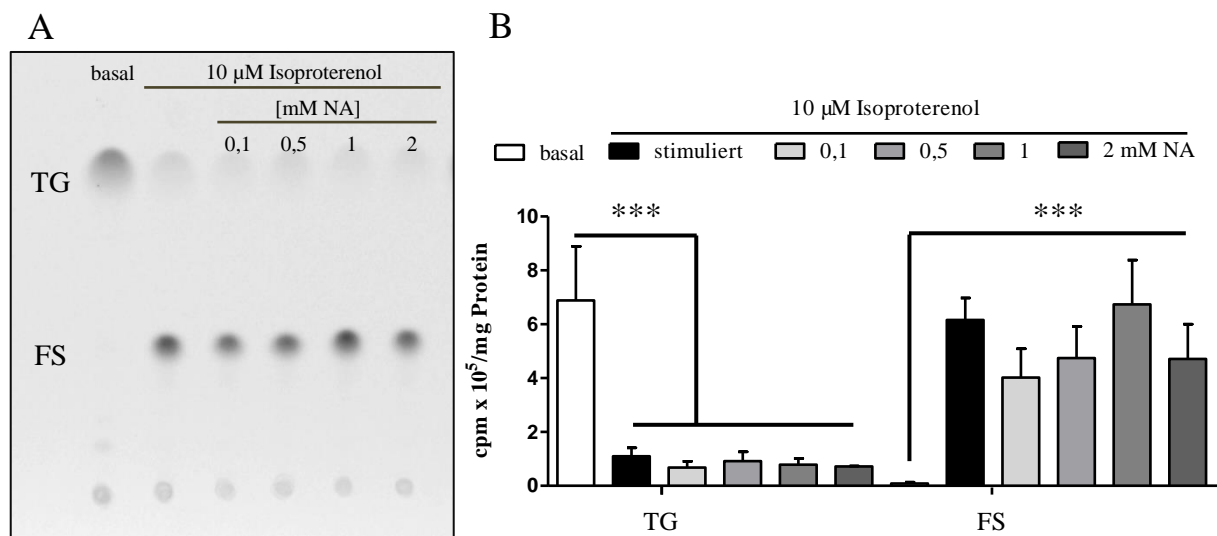


Abbildung 4.18: Reesterifizierungsanalyse mit NA unter basalen und lipolyse-stimulierten Bedingungen in primären Adipozyten. Die differenzierten primären Adipozyten wurden unter basalen (Minimalmedium I) und lipolyse-stimulierten Bedingungen (Minimalmedium I mit 10 μM Isoproterenol) für 90 min mit ^{14}C -markierten FS (1 $\mu\text{Ci}/\text{Well}$) inkubiert. Für die NA-Analyse wurden diesem Medium vier unterschiedliche Konzentrationen an NA (0,1; 0,5; 1; 2 mM) beigefügt. Die Reesterifizierung der FS zu TG wurde mithilfe der ^{14}C -markierten FS in den Lipidextrakten der Adipozyten in einer (A) Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Die Intensitäten der TG und FS wurden in (B) einer Szintillationsanalyse im β -counter quantifiziert. $n=3$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's t -test ermittelt. $p < 0,001$ (***)

und FS freigesetzt worden sind (Abbildung 4.18, „stimuliert“). Im Vergleich mit der Isoproterenol-stimulierten Kontrolle kam es in den Lipidextrakten mit vier unterschiedlichen NA-Konzentrationen zu keiner verstärkten TG-Akkumulation (Abbildung 4.18). Die FS-Reesterifizierung in den primären Adipozyten wurde durch NA nicht verstärkt. Dieser Vorgang stellt also keine Erklärung für den Wirkmechanismus von NA dar.

4.2.2. NA verursacht eine Verringerung der Leber-TG

Da in den bisherigen Experimenten gezeigt wurde, dass NA die Lipolyse in Adipozyten nicht hemmt, wurden andere Mechanismen, die zu einer Plasmalipidsenkung führen, untersucht. Um zu überprüfen, ob NA statt einer Inhibierung der Lipolyse den Einbau von Plasma-FS in Form von TG in der Leber stimuliert, wurden die TG aus Lebergewebe von NA-behandelten Mäusen gemessen.

Für dieses Experiment wurden C57BL/6J-Mäuse über Nacht gefastet. Danach wurde den Tieren entweder Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) als Kontrolllösung oder 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NA in Tris/HCl-Puffer intraperitoneal verabreicht. Nach 20 min wurde die Leber entnommen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil die Plasmalipidparameter FS, Glycerol und TG *in-vivo* in C57BL/6J-Mäusen innerhalb eines Zeitraumes von 20 min durch NA verringert werden (Abbildung 4.2). Anschließend wurden die Lipide des Lebergewebes extrahiert und schließlich wurden die TG des Lipidextraktes kolorimetrisch vermessen. Im Vergleich zur Kontrolle weisen die mit NA behandelten hepatischen Lipidextrakte eine Reduktion der TG um 50% auf (Abbildung 4.19). NA verursacht also keinen Einbau der Plasma-FS in hepatische TG. Es kommt durch NA-Verabreichung sogar zu einer rapiden TG-Abnahme in der Leber.

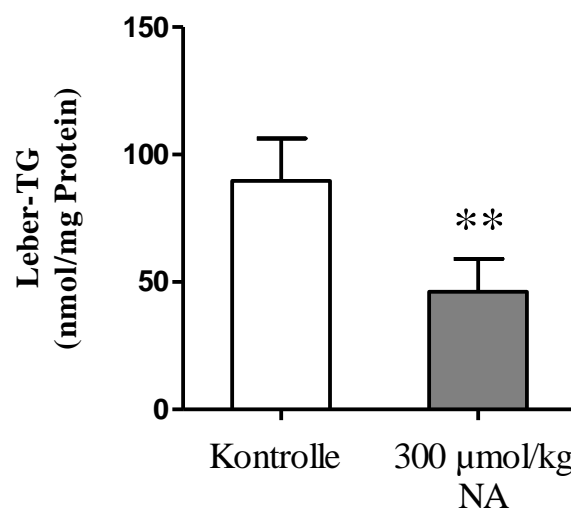


Abbildung 4.19: Messung der hepatischen TG in C57BL/6J-Mäusen nach Kontroll- oder NA-Behandlung. Die Mäuse wurden für 15 h von 18 bis 9 Uhr gefastet. Den C57BL/6J-Mäusen wurde anschließend Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) als Kontrolllösung oder 300 $\mu\text{mol/kg}$ NA in Tris/HCl-Puffer verabreicht. Nach 20 min wurde jeweils die Leber entnommen. Die TG der Leber wurden extrahiert und mittels Infinity™ Triglycerides Reagent kolorimetrisch bestimmt. Die Mäuse waren männlich und 11 Wochen alt. n=5. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,01$ (**).

4.2.3. NA hat keine Auswirkung auf die FS-Aufnahme in Kardiomyozyten

Zunächst wurde getestet, ob NA zu einer verstärkten FS-Aufnahme in oxidative Gewebe führt. Dazu wurden kultivierte H9c2-Kardiomyozyten 4 h in Minimalmedium II gefastet und anschließend mit ^3H -markierter Ölsäure und entweder mit physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle oder mit 500 μM NA beladen. Die FS-Aufnahme in das Innere der Zellen wurde in einem zeitlichen Verlauf von 2 bis 20 min (t_2 , t_5 , t_{10} und t_{20}) verfolgt. Dieser Zeitverlauf wurde deshalb gewählt, da in den *in-vivo*-Experimenten die Plasma-FS nach 20 min auf die Hälfte abgesunken waren (Abbildung 4.2). Zur quantitativen Analyse der aufgenommenen FS wurde die radioaktive Strahlung der Zelllysate gemessen und auf die Proteinkonzentration normalisiert. In Abbildung 4.20 wird ersichtlich, dass die Menge der aufgenommenen FS in die H9c2-Kardiomyozyten in der basalen sowie in der NA-Gruppe von t_2 bis t_{20} stetig

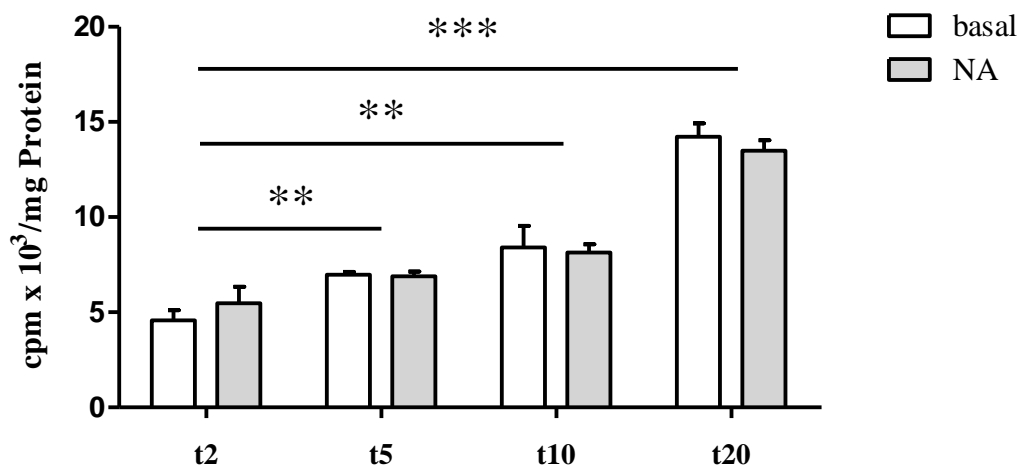


Abbildung 4.20: FS-Aufnahme in H9c2-Kardiomyozyten. Die Zellen wurden in serumfreiem Minimalmedium II für 4 h gefastet. Danach wurden die H9c2-Kardiomyozyten jeweils mit Minimalmedium II und basaler Kontrolllösung (physiologische Kochsalzlösung) oder 500 μM NA behandelt. Zur Verfolgung der FS-Aufnahme in die H9c2-Kardiomyozyten wurden dem Medium 400 μM Ölsäure mit radioaktiv-markierter ^3H -Ölsäure (1 μCi) als *Tracer* hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Radioaktivität der Zelllysate wurde im β -Counter vermessen [cpm]. Anschließend wurden gemessenen auf die Proteinnengen bezogen. $n=3$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

angestiegen ist. Im Vergleich der NA-behandelten Zellen mit den Kontrolllösung-behandelten Zellen wurde jedoch keine Veränderung der FS-Aufnahme in die Zellen ersichtlich. Dieses Ergebnis zeigt, dass NA keine Auswirkung auf die FS-Aufnahme in Kardiomyozyten hat.

Zusammenfassend hat NA eine rapide plasmalipidsenkende Wirkung *in-vivo*, die jedoch nicht von der Lipolyse in Adipozyten abhängt. Die Unabhängigkeit der NA-Wirkung von der Lipolyse wurde in mehreren *in-vitro*-Modellen gezeigt. In diesen Experimenten ist es zu

keiner Verringerung der FS- und Glycerolfreisetzung in das Medium gekommen, diese Parameter wurden zur Messung der Lipolyse herangezogen. Außerdem wurde gezeigt, dass der NA-Wirkmechanismus lipase-unabhängig ist, da auch in den lipase-defizienten AAKO-, AHKO- und DAKO-Mäusen eine Verringerung der Plasma-FS nach NA-Verabreichung aufgetreten ist. Als alternative Wirkmechanismen von NA, die zu einer Plasmalipidsenkung führen, wurden die Reesterifizierung von FS in Adipozyten, der hepatische FS-Einbau in Form von TG und die FS-Aufnahme in Kardiomyozyten untersucht. NA hatte keine Auswirkung auf diese Stoffwechselwege. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der plasmalipidsenkenden Wirkung von NA um einen anderen Mechanismus handelt.

4.3. Untersuchung der Auswirkung von NR auf Lipolyse

NR ist ein weiteres Mitglied des Vitamin B3-Komplexes. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist noch wenig über die Wirkung von NR im Menschen bekannt. Jedoch wurde gezeigt, dass NR als NAD⁺-Vorläufer die NAD⁺-Bildung anregt und außerdem Sirtuin-Enzyme aktivieren kann (Yang et al., 2007). Mit der Verwendung von NR für die Lipolyseexperimente wurden in dieser Arbeit Ähnlichkeiten in der Wirkweise von NA und NR untersucht. Aufgrund der plasmalipidsenkenden Eigenschaft von NA und der metabolischen Ähnlichkeit von NA und NR wurde auch die Auswirkung von NR auf den Lipidstoffwechsel, insbesondere auf intrazelluläre Lipolyse analysiert. Da NR nicht den NA-Rezeptor GPR109A aktiviert (Canto et al., 2012), weisen Ähnlichkeiten in der Wirkung beider Metabolite auf eine zusammenhängende Aktivierung des NAD⁺-Weges hin. In dieser Arbeit wurden *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimente über die Wirkung von NR auf die Lipolyse durchgeführt.

4.3.1. NR senkt Plasmawerte von FS, Glyzerol und TG in C57BL/6J-Mäusen nach intraperitonealer Injektion

Zuerst wurde die Auswirkung von NR *in-vivo* auf gefastete C57BL/6J-Mäuse untersucht, um Ähnlichkeiten zur Wirkung von NA auf die Plasmalipide FS, Glyzerol, TG und auf Plasmaglukose zu studieren. Das Experiment mit NR wurde analog zu dem Experiment mit NA (Abbildung 4.2) durchgeführt. Zuerst wurden die C57BL/6J-Mäuse über Nacht gefastet. Danach wurde eine Blutabnahme zum Zeitpunkt 0 min über den retroorbitalen Sinus durchgeführt. Anschließend wurde als Kontrolle physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Für die Behandlung mit NR wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen injiziert (300 und 900 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NR, in physiologischer Kochsalzlösung). Diese Konzentrationen wurden in Anlehnung an etablierte Versuchsprotokolle gewählt (S. A. J. Trammell et al., 2016). Nach 20, 60 und 120 min wurden retroorbitale Blutabnahmen durchgeführt. In Abbildung 4.21 wird ersichtlich, dass die Kontrollbehandlung keine Auswirkung auf FS-, Glyzerol-, TG- und Glukosewerte im Blutplasma hatte. NR in einer Dosis von 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht senkte die Plasmawerte von FS, Glyzerol und TG 20 min nach der Verabreichung entsprechend um 40%, 30% und 60% (Abbildung 4.21). Im Gegensatz zur Erwartung war die Plasmalipidsenkung der mit 900 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NR behandelten Kohorte mit 20%, 15% und 60% schwächer ausgeprägt als in der niedrigdosierte Kohorte (Abbildung 4.21). Die Wirksamkeit von NR ist also nicht dosisabhängig. In beiden Kohorten trat nach 120 min ein *Rebound*-Effekt der

Plasmalipidwerte ein. Im Gegensatz zur Erwartung stiegen die Plasmaglukosewerte in beiden Kohorten nach der NR-Injektion stetig bis zu einer Zunahme von 50% zu Zeitpunkt 120 min an (Abbildung 4.21). Dieser Effekt wurde bei der Behandlung mit NA nie beobachtet (Abbildung 4.2) und weist wiederum auf metabolische Unterschiede der beiden Vitamin-B3-Metabolite hin.

Mit diesem Experiment wurde ersichtlich, dass die Senkung der Plasmalipidwerte durch NR ein kurzzeitiger Effekt ist, der binnen weniger Minuten stattfindet und sich innerhalb von 120 min erholt. Außerdem ist der Effekt, verglichen mit NA (FS-, Glycerol- und TG-Senkung um 50%, 60% und 30%, Abbildung 4.2), schwächer ausgeprägt. NR senkt in ähnlicher Ausprägung Plasmalipide wie NA. Das deutet auf einen Zusammenhang des Stoffwechselweges der beiden Metabolite, der zu einer Plasmalipidsenkung führt, hin.

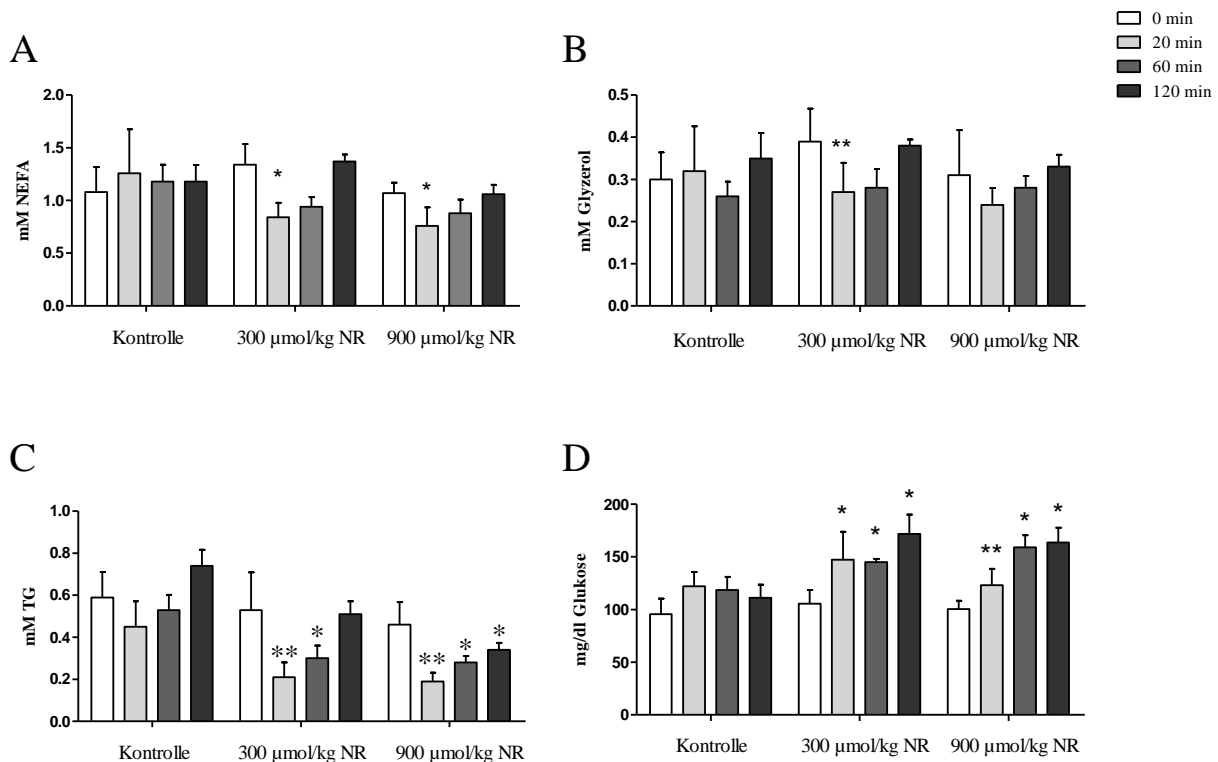


Abbildung 4.21: *in-vivo*-Auswirkung von NR auf gefastete C57BL/6J-Mäuse. Die Mäuse wurden für 15 h von 18 bis 9 Uhr gefastet. Danach wurde eine basale Blutabnahme über den retroorbitalen Sinus und anschließend eine intraperitoneale Injektion (Kontrolle: physiologische Kochsalzlösung; NR: 300 µmol und 900 µmol/kg Körpergewicht) durchgeführt. Weitere Blutproben wurden nach 20, 60 und 120 min entnommen. Aus den Plasmaproben wurden Lipidparameter mittels kolorimetrischer Tests und Glukose mit Glukosestreifen bestimmt: **(A)** zeigt NEFA, **(B)** zeigt Glycerol, **(C)** zeigt TG **(D)** zeigt Glukose. Die Mäuse waren männlich und 9 Wochen alt. n=5. Die Daten sind in Mittelwerten ± S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

4.3.2. NR verursacht keine Veränderung der Plasmawerte FS, Glycerol und TG in C57BL/6J-Mäusen nach intravenöser Injektion

Anschließend wurde ein *in-vivo*-Experiment mit intravenöser Injektion von NA und NR in C57BL/6J-Mäusen durchgeführt, da in Veröffentlichungen eine Metabolisierung von NR zu NA durch Enzyme im Darm gezeigt wurde (Belenky et al., 2007; Bieganowski & Brenner, 2004). Durch die intravenöse Verabreichung von NR wurde im Gegensatz zu intraperitonealer Verabreichung eine Injektionsstelle nahe zum Verdauungstrakt vermieden.

Die Durchführung des Versuches wurde analog zu den *in-vivo*-Versuchen in Abbildung 4.2 und Abbildung 4.21 mit dem einzigen Unterschied einer intravenösen Injektion von NA und NR gestaltet. Zuerst wurden die C57BL/6J-Mäuse über Nacht gefastet. Dann wurde eine Blutabnahme zum Zeitpunkt 0 min über die *Vena facialis* durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht NA und NR in physiologischer Kochsalzlösung intravenös über den retroorbitalen Sinus injiziert. Nach 20 min wurde eine weitere Blutprobe über die *Vena facialis* entnommen. In Abbildung 4.22 wird ersichtlich, dass NA die Plasma-FS 20 min nach der Verabreichung um 50% gesenkt hat, NA wirkte also bei intravenöser Injektion gleich wie bei intraperitonealer Injektion (Abbildung 4.2). Im Gegensatz zu NA löste NR keine Verringerung der Plasma-FS nach 20 min aus. NR hat also keine Auswirkung auf Plasma-FS nach intravenöser Injektion, was auf eine Metabolisierung zu NA nach intraperitonealer Injektion hindeutet.

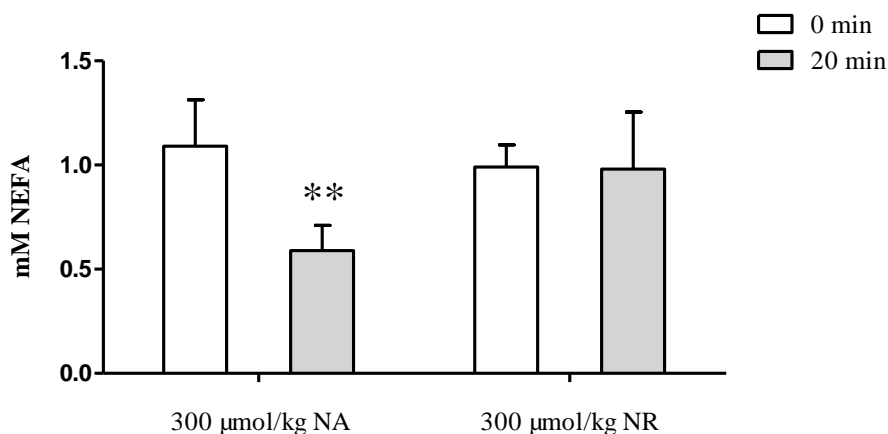


Abbildung 4.22: *in-vivo*-Auswirkung von NA und NR auf gefastete C57BL/6J-Mäuse nach intravenöser Injektion. Die Mäuse wurden für 15 h von 18-9 Uhr gefastet. Anschließend wurden basale Blutproben über die *Vena facialis* entnommen. Dann wurden intravenöse NA- und NR-Injektionen in einer jeweiligen Dosis von 300 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Eine weitere Blutprobe wurde nach 20 min entnommen. Aus den Plasmabproben wurde mithilfe eines kolorimetrischen Tests eine FS-Bestimmung durchgeführt. Die Mäuse waren männlich und 16 Wochen alt. $n=5$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,01$ (**).

4.3.3. NR verursacht keine Senkung von Lipolyseparametern in Adipozytenzelllinien

Um eine adipozyten-spezifische Wirkung von NR auf Lipolyse zu studieren, wurden Lipolyseexperimente mit NR *in-vitro* durchgeführt. Dazu wurden differenzierte 3T3-L1- und primäre Adipozyten unter lipolyse-stimulierten Bedingungen und in Gegenwart von vier unterschiedlichen Konzentrationen an NR für 1 h inkubiert (Abbildung 4.23). Als

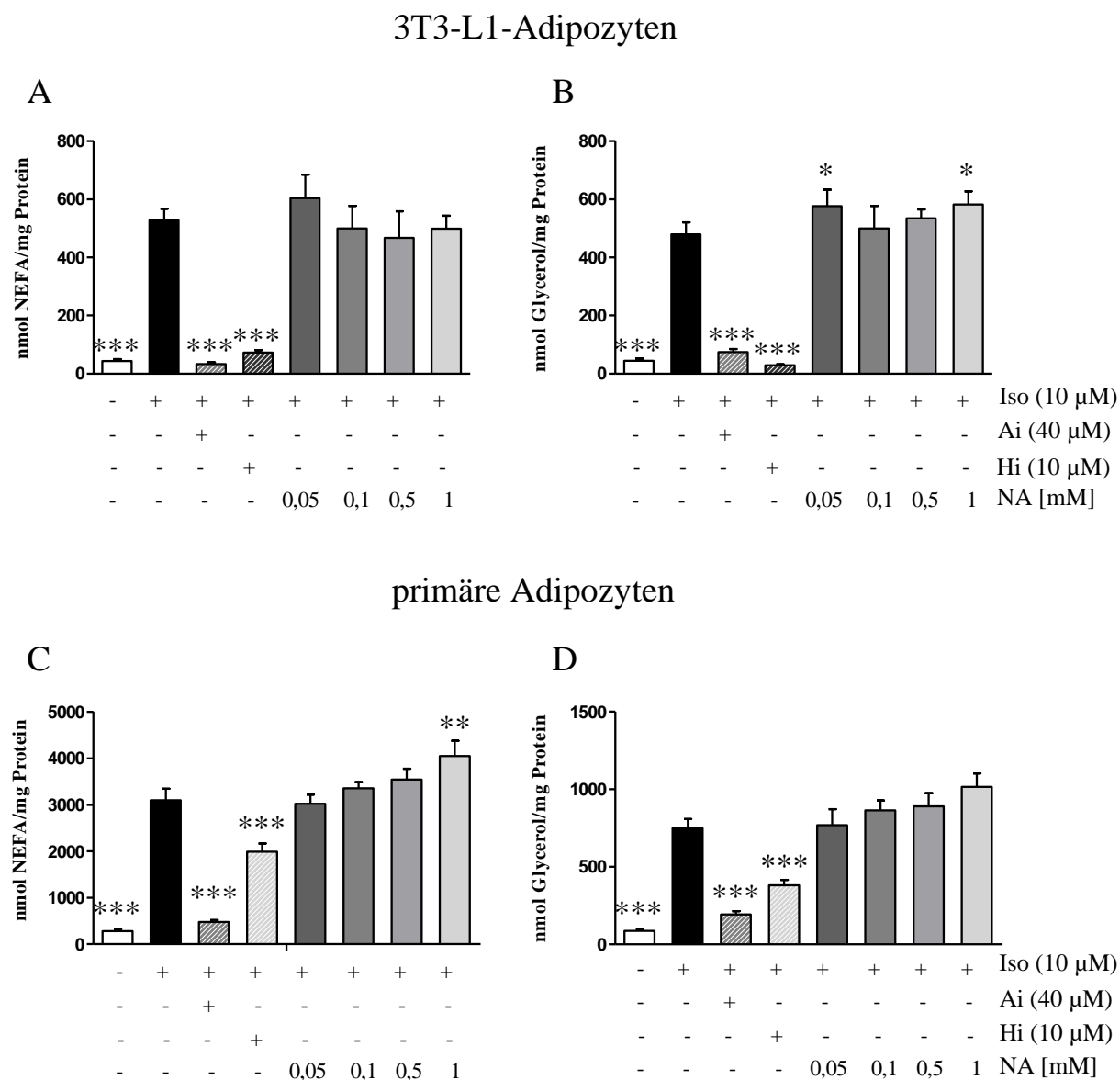


Abbildung 4.23: *in-vitro*-NR-Auswirkung auf kultivierte Adipozyten. (A) zeigt NEFA-, (B) zeigt Glycerolfreisetzung aus differenzierten 3T3-L1-Adipozyten, (C) zeigt NEFA-, (D) zeigt Glycerolfreisetzung aus differenzierten murinen primären Adipozyten. Aus den Adipozyten wurde die Freisetzung von FS und Glycerol als Lipolyseparameter in Gegenwart von NR gemessen. Die Lipolyse der Zellen wurde mit 10 µM Isoproterenol stimuliert, als Positivkontrolle für eine Lipolyseinhibierung wurden die Lipaseinhibitoren Ai und Hi eingesetzt. Außerdem wurden die Zellen mit vier Konzentrationen NR unter lipolyse-stimulierten Bedingungen für 1 h inkubiert (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM NA). FS- und Glycerolmessungen wurden mit kolorimetrischen Tests im Experimentmedium durchgeführt. Die Daten sind in Mittelwerten ± S.D. angegeben. n=4. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Positivkontrolle für eine Lipolyseinhibierung dienten die etablierten Lipaseinhibitoren Ai (40 μM) und Hi (10 μM). Als Parameter für die Lipolyse wurden FS- und Glycerolfreisetzung aus den Adipozyten in das Experimentmedium gemessen. Wie erwartet, kam es in den differenzierten 3T3-L1-Adipozyten durch die Lipaseinhibitoren Ai und Hi zu einer Senkung der FS- und Glycerolfreisetzung auf das basale Niveau (Abbildung 4.23 A und B). In Gegenwart von NR wurde die FS- und Glycerolfreisetzung aus den Adipozyten nicht inhibiert, bei 0,05 mM und 1 mM NR stieg die Glycerolfreisetzung sogar an (Abbildung 4.23 B). Die Untersuchung mit den primären Adipozyten zeigte vergleichbare Resultate (Abbildung 4.23 C und D). Diese Daten weisen auf eine lipolyse-unabhängige Wirkweise von NR hin.

4.3.4. NR verursacht keine Veränderung der Lipaseexpression in Adipozytenzelllinien

Die Proteinexpression der Lipasen HSL (phosphorylierte, aktivierte Form, p-HSL (Ser⁶⁶⁰) und Gesamtproteinexpression HSL) und ATGL in Gegenwart von NR wurde in murinen primären Adipozyten mittels Western-Blot überprüft (Abbildung 4.24). Anhand der Proteinexpression der aktiven p-HSL wird im Vergleich der basalen mit den stimulierten Proteinbanden ersichtlich, dass unter Zugabe von 10 μM Isoproterenol die Lipase HSL phosphoryliert wurde, folglich wurde die Lipolyse stimuliert. Zusätzlich wurden die primären Adipozyten in

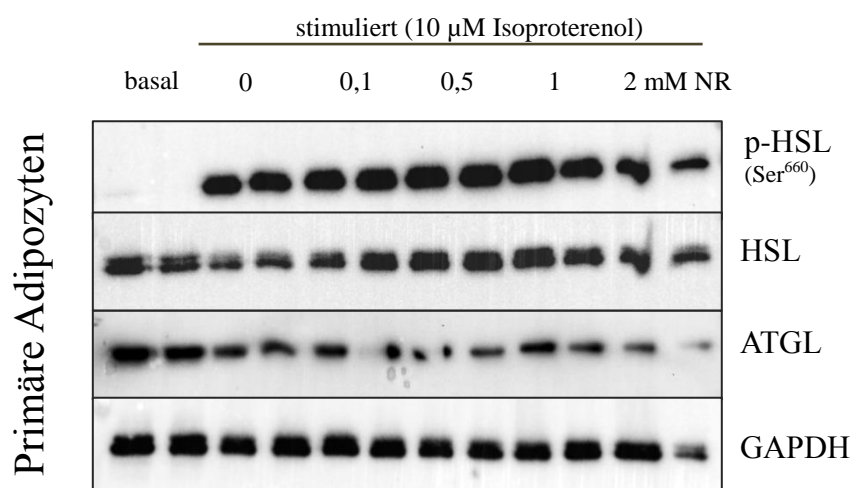


Abbildung 4.24: Proteinexpression von Lipasen in primären Adipozyten nach NR-Behandlung. Die Zellhomogenate (20 μg Protein) wurden mittels 10%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurden phosphorylierte HSL (1:1.000, Phosphorylierung an Serin⁶⁶⁰, p-HSL (Ser⁶⁶⁰)), Gesamt-HSL (1:1.000, HSL), ATGL (1:1.000, ATGL), sowie Anti-GAPDH (Ladekontrolle, 1:10.000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde jeweils Anti-Rabbit mit *horse radish peroxidase* (HRP) (1:10.000) verwendet. Die Detektion erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP und das ChemiDoc™ Touch Imaging System. Die Analyse der Signalintensitäten erfolgte mittels Image Lab™ 5.2.1.

Gegenwart von vier unterschiedlichen NR-Konzentrationen (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM NR) unter Isoproterenol-Stimulierung für 1 h inkubiert. Im Vergleich zu den stimulierten Proteinbanden kam es zu keinen Veränderungen in der Phosphorylierung und somit Aktivierung von HSL durch NR (Abbildung 4.24). Auch die Proteinexpression von Gesamt-HSL und ATGL wurde durch NR nicht beeinflusst.

4.3.5. NR verursacht eine Verringerung der Leber-TG

Analog zu NA (Abbildung 4.19) wurde überprüft, ob NR anstatt einer Inhibierung der Lipolyse den Einbau von Plasma-FS in Form von hepatischen TG induziert. Für dieses Experiment wurden C57BL/6J-Mäuse über Nacht gefastet. Anschließend wurde den Tieren entweder Tris/HCl-Puffer-Lösung als Kontrolle oder 300 $\mu\text{mol/kg}$ NR Körpergewicht in Tris/HCl-Puffer intraperitoneal verabreicht. Die Leber wurde 20 min nach der NR-Verabreichung isoliert. Aus dem Lebergewebe wurden die Lipide extrahiert. Anschließend wurden aus den Lipidextrakten die TG kolorimetrisch vermessen. Im Vergleich zur Kontrolle war der TG-Gehalt in den NR-behandelten Leberlipidextrakten um 43% reduziert (Abbildung 4.25). Im Gegensatz zur Erwartung wurde durch NR also kein Einbau von Plasma-FS in hepatische TG stimuliert. NR führte sogar zu einer rapiden Senkung der hepatischen TG.

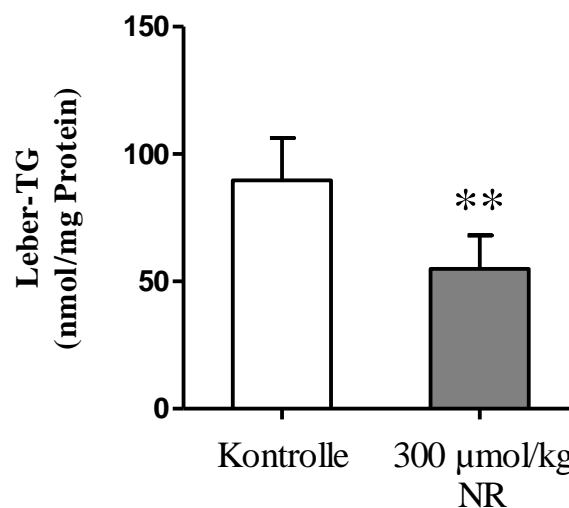


Abbildung 4.25: Messung der Leber-TG in C57BL/6J-Mäusen nach Kontroll- oder NR-Behandlung. Die Mäuse wurden für 15 Stunden von 18 bis 9 Uhr gefastet. Den C57BL/6J-Mäusen wurde anschließend Tris/HCl-Puffer (Kontrolle) oder 300 μmol NR per kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die Leber wurde 20 min nach NR-Verabreichung entnommen. Die hepatischen Lipide wurden extrahiert und der TG-Gehalt wurde mittels Infinity™ Triglycerides Reagent bestimmt. Die Mäuse waren männlich und 11 Wochen alt. $n=5$. Die Daten sind in Mittelwerten \pm S.D. angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student's t -test ermittelt. $p < 0,01$ (**).

Zusammenfassend verursachte NR eine Senkung der Plasma-FS, -Glyzerol und -TG *in-vivo* nach einer intraperitonealen Injektion. Diese Daten waren vergleichbar zu den Ergebnissen mit NA. Nach der intravenösen Injektion kam es im Gegensatz zur NA-Verabreichung jedoch

zu keiner Reduktion der Plasmalipide durch NR. In den *in-vitro*-Experimenten kam es zu keiner Verringerung der Lipolyseparameter FS und Glycerol durch NR. Die Untersuchung des hepatischen TG-Gehaltes zeigte mit einer drastischen Reduktion der hepatischen TG wiederum eine vergleichbare Wirkung von NR und NA. Die Ergebnisse der *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen mit NR sind bis dato jedoch präliminär und zeigen unstimmige Ergebnisse. Für eindeutige Aussagen müssen die NR-Studien zukünftig vertieft werden.

5. Diskussion

5.1. Über NA als Plasmalipidsenker und die Untersuchung des zugrundeliegenden Wirkmechanismus

NA senkt in hohen Dosen von 1-3 g/Tag (Taggart et al., 2005) die humanen Plasmawerte von FS, TG und allen atherogenen Lipoproteinklassen, wie Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL (Altschul et al., 1955; Carlson, 2005). Seit der Entdeckung der plasmalipidsenkenden Eigenschaften von NA (Altschul et al., 1955) wird angenommen, dass NA die Lipolyse hemmt. Diese Inhibierung soll zu einer verringerten FS-Freisetzung in die Zirkulation führen, was wiederum eine verringerte hepatische FS-Reesterifizierung in TG auslöst (Offermanns, 2006). Dadurch kommt es zu einem verringerten TG-Niveau in der Leber. Da TG wichtige Baustoffe von Lipoproteinen wie beispielsweise VLDL und LDL sind, werden bei einem reduzierten hepatischen TG-Wert weniger dieser Lipoproteine gebildet. Die Hemmung der Lipolyse durch NA stellt also eine plausible Erklärung des NA-Wirkmechanismus dar. Jedoch wurde die Inhibierung der Lipolyse durch NA bis dato nicht klar gezeigt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Auswirkung von NA auf die Lipolyse in Adipozyten mithilfe von *in-vitro*-Experimenten in Adipozytenmodellen, *ex-vivo*-Versuchen in Fettgewebsexplantaten und *in-vivo*-Untersuchungen in lipase-defizienten Mauslinien erforscht. Die Ergebnisse zeigten keine Hemmung der Lipolyse in den Adipozyten in den Untersuchungen *in-vitro* und *ex-vivo*, sowie eine Senkung der Plasmalipide trotz einer genetischen Lipasedefizienz in Mauslinien *in-vivo*.

Um die Auswirkung von NA auf die Lipolyse erforschen zu können, wurden *in-vitro*- und *in-vivo*-Modelle etabliert. Dafür wurde zuerst die Proteinexpression des G_i-Protein-gekoppelten GPR109A in Adipozytenzelllinien und in WAT von C57BL/6J-Mäusen analysiert. Der inhibitorische Rezeptor GPR109A wird hauptsächlich auf Adipozyten exprimiert und wird durch NA aktiviert (Tunaru et al., 2003). In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression des GPR109A in 3T3-L1- und primären Adipozyten (Abbildung 4.6) sowie in epiWAT von C57BL/6J-Mäusen gezeigt (Abbildung 4.1). Außerdem wurde eine Fütterung-Fasten-Regulation des GPR109A im epiWAT der Mäuse demonstriert. Es wurde ersichtlich, dass der NA-Rezeptor GPR109A im Vergleich zum gefütterten Zustand bei Nahrungskarenz verstärkt exprimiert wird, wohingegen eine Nahrungsaufnahme die Proteinexpression des Rezeptors herabreguliert. Auch Lipolyse wird bei Nahrungskarenz aktiviert, um FS als Energiesubstrat zu erzeugen (Zechner et al., 2009). Die Abhängigkeit dieser beiden Prozesse von Nahrungskarenz weist auf einen Zusammenhang der GPR109A-Expression mit Lipolyse hin.

Nachdem die Proteinexpression des NA-Rezeptors in epiWAT der C57BL/6J-Mäusen bestätigt worden war, wurde der plasmalipidsenkende Effekt von NA *in-vivo* in diesen Mäusen untersucht. In einer nächtlichen Fastenperiode wurde Lipolyse in den C57BL/6J-Mäusen stimuliert, anschließend wurden 50 µmol/kg oder 300 µmol/kg Körpergewicht NA verabreicht. Die NA-Injektionsdosen wurden an renommierte Publikationen mit beispielsweise 200 µmol/kg Körpergewicht NA angepasst (Tunaru et al., 2003). Nach der Verabreichung von 300 µmol/kg Körpergewicht NA kam es im Vergleich zu 50 µmol/kg Körpergewicht zu einer verstärkten und längerfristigen Senkung der Plasmalipide (Abbildung 4.2). Der NA-Effekt auf Plasmalipide ist also dosisabhängig. Humanstudien haben gezeigt, dass NA-Verabreichung im Grammbereich eine plasmalipidsenkende Wirkung hat (Parsons et al., 1956; Carlson et al., 1962). In den humanen Langzeitstudien führte eine tägliche Verabreichung von 3 g NA über 12 Wochen in gefasteten Versuchspersonen zu einer signifikanten Reduktion der Plasmawerte von Cholesterin, Lipoproteinen und FS (Parsons et al., 1956). Die Wirkung von NA auf Plasmalipide tritt sowohl im Menschen, als auch im Mausmodell nur in hohen Dosen ein.

Darüber hinaus wurde ein *Rebound*-Effekt der Plasmalipidwerte sowohl in den Humanstudien als auch in dieser Arbeit mit C57BL/6J-Mäusen gezeigt. Der *Rebound*-Effekt der humanen Plasmalipidwerte trat 1 h nach NA-Injektion auf (Svedmyr et al., 1969). In dieser Arbeit mit C57BL/6J-Mäusen kam es 120 min nach NA-Injektion zu einem *Rebound* von FS, Glycerol und TG im Blutplasma (Abbildung 4.2). Der *Rebound*-Effekt deutet auf eine schnelle Ausscheidung von NA hin, was auch durch die Verfolgung von radioaktiv-markierter NA bekräftigt wurde (Carlson et al., 1964). Dabei gelangte ein beträchtlicher Anteil von radioaktiv-markierter NA 5 min nach der Injektion in die Niere, was auf eine renale Ausscheidung hinweist.

Nach der Bestätigung der plasmalipidsenkenden Wirkung von NA in C57BL/6J-Mäusen wurde der zugrundeliegende Mechanismus studiert. Laut der allgemein gültigen Erklärung des NA-Wirkmechanismus löst der NA-spezifische Rezeptor GPR109A einen inhibitorischen Signaltransduktionsweg in Adipozyten aus, der über die Inhibierung der Adenylatzyklase zu einer verringerten intrazellulären cAMP-Menge führt (Tunaru et al., 2003). Aufgrund des Wissens über eine Senkung der cAMP-Menge über den Rezeptor GPR109A (Butcher et al., 1968) wurde angenommen, dass die niedrige intrazelluläre cAMP-Konzentration zur Inaktivierung der cAMP-abhängigen PKA in Adipozyten führt. Folglich soll es zu einer Inhibierung der Lipolyse kommen (Offermanns, 2006). Die für diese Arbeit durchgeführten

Untersuchungen des lipolyse-inhibierenden Effekts von NA *in-vitro* zeigten keine Bestätigung dieser Hypothese: Sowohl die Analysen der Proteinexpression von ATGL und HSL in Adipozyten oder murinem epiWAT (Abbildung 4.10, Abbildung 4.4), als auch die Untersuchung der Lipaseaktivität *in-vitro* in murinem epiWAT (Abbildung 4.5) zeigten keine Inhibierung der Lipaseexpression oder -aktivität in Gegenwart von NA. Die Untersuchungen von Lipolyse in 3T3-L1-, in primären Adipozyten und in Fettgewebsexplantaten in Gegenwart von NA zeigten ebenfalls keine Verringerung der FS- und Glycerolfreisetzung (Abbildung 4.7, Abbildung 4.11).

Als Referenz einer Lipolyseinhibierung dienten die etablierten Lipaseinhibitoren Ai und Hi (Mayer et al., 2013; Schweiger et al., 2006). Mit den Inhibitoren konnte eine Inhibierung von ATGL oder HSL mit einer potenziellen Lipolysehemmung durch NA verglichen werden. Um die Lipolyse zu stimulieren und damit den gefasteten Zustand der Mäuse in den *in-vivo*-Versuchen zu imitieren, wurden die Adipozyten oder murinen Fettgewebsexplantate mit dem β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol behandelt. Isoproterenol ist ein Katecholamin, das die Lipolyse durch Aktivierung von β -Adrenorezeptoren induziert (Somvanshi et al., 2013). Die Konzentration von 10 μ M im Experimentmedium entspricht einer maximalen Stimulierung der Lipolyse (Abbildung 4.8). Weder bei maximaler, noch bei geringer Stimulierung der Lipolyse kam es zu einer durch NA ausgelösten Verringerung der FS- oder Glycerol-Freisetzung in das Experimentmedium *in-vitro* oder *ex-vivo* (Abbildung 4.7, Abbildung 4.9, Abbildung 4.11). Die intrazelluläre Lipolyse in Adipozyten wurde also durch die Anwesenheit von NA nicht inhibiert. Eine zusätzliche Unterstützung dieser Daten zeigten Experimente mit NA in humanen Zelllinien, bei denen es zu einer minimalen Hemmung der Lipolyse kam (persönliches Gespräch mit Prof. Mikael Ryden, Karolinska Institutet Stockholm, unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse widersprechen vielen Publikationen über den Wirkmechanismus von NA (Carlson, 2005; Tunaru et al., 2003; Baird, 1968).

Auch die Analyse eines alternativen Regulationsweges der Lipolyse über den ERK-(MAPK)-Signalweg bestätigte die geltende Hypothese der Lipolyseinhibierung durch NA nicht. Die phosphorylierte, aktivierte Form p-ERK 1/2 nahm in Zellhomogenaten aus murinen primären Adipozyten mit steigenden NA-Konzentrationen zu (Abbildung 4.10). Die phosphorylierten Threonin/Tyrosin-Aminosäurereste auf ERK 1/2 befinden sich auf der Aktivierungsschleife der ERK-Proteine (Chen et al., 1996). Ihre Phosphorylierung führt zu einer Aktivierung der ERK-Proteine (Robidoux et al., 2006). Daraus folgt eine geringfügige Aktivierung der Lipolyse. Auch Tunaru et al. (2003) haben gezeigt, dass NA die Phosphorylierung von ERK 1

und 2 verstärkt. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Hypothese der lipolyse-inhibierenden Wirkung von NA.

Um den Effekt von NA auf Lipolyse *in-vivo* zu studieren, wurden Analysen mit NA in lipase-defizienten Mäusen durchgeführt: adipozyten-spezifische ATGL-KO-Mäuse (AAKO-Mäuse), adipozyten-spezifische HSL-KO-Mäuse (AHKO-Mäuse) und adipozyten-spezifische ATGL-HSL-Doppel-KO-Mäuse (DAKO-Mäuse) wurden für Untersuchungen mit NA verwendet. Da der NA-Wirkmechanismus der Lipolyseinhibierung mit der Aktivierung des inhibitorischen GPR109A-Rezeptors begründet wird (Tunaru et al., 2003), war die adipozyten-spezifische Lipasedefizienz der Mäuse angemessen. Zuerst wurde die Auswirkung von NA auf die Plasmalipidwerte in den AAKO- und AHKO-Mäusen untersucht (Abbildung 4.12, Abbildung 4.15). Um die Experimente vergleichbar zu den *in-vivo*-Untersuchungen mit C57BL/6J-Mäusen (Abbildung 4.2) durchzuführen, wurden die lipase-defizienten Mäuse vor den Experimenten für 6 h gefastet. Aufgrund der Deletion der reaktionslimitierenden Lipasen ATGL und HSL in den Adipozyten der AAKO- beziehungsweise AHKO-Mäuse werden entsprechend TG oder DG bei Nahrungskarenz eingeschränkt oxidiert (Zimmermann et al., 2004, Haemmerle et al., 2006). Deshalb wurden die lipase-defizienten Mäuse nicht über Nacht gefastet. Die Plasma-FS wurden in den AAKOs oder AHKOs trotz einer adipozyten-spezifischen ATGL- beziehungsweise HSL-Defizienz durch NA gesenkt (Abbildung 4.12, Abbildung 4.15). In den beiden Modellen war jeweils eine der die beiden Lipasen genetisch deletiert. Die Proteinexpression der jeweils anderen reaktionsbestimmenden Lipase war in den lipase-defizienten Mäusen zwar verringert, es bestand aber eine Restproteinexpression (Abbildung 4.13, Abbildung 4.14). Der TG-Abbau in DG und eine freie FS kann von beiden Lipasen katalysiert werden (Haemmerle et al., 2002). ATGL ist im ersten Schritt der Lipolyse das limitierende Enzym, HSL spaltet TG in geringerem Ausmaß. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die Untersuchung der NA-Wirkung auf die Lipolyse „verfälscht“ wurde, indem die jeweils nicht deletierte, aktive Lipase durch NA-Verabreichung gehemmt wurde und dadurch die Plasma-FS reduziert wurden. Die Option eines NA-Wirkungsmechanismus über die Inhibierung der Lipolyse bestand nach diesen Experimenten also weiterhin.

Aufgrunddessen wurden weiterführende Analysen mit NA in DAKO-Mäusen durchgeführt. Durch die adipozyten-spezifische Defizienz von ATGL und HSL können in DAKOs kaum FS als Energiesubstrat freigesetzt werden. Nahrungsentzug hat deshalb massive Auswirkungen auf den Stoffwechsel und führt zu einer rapiden Abnahme der Körpertemperatur in den DAKOs. Deshalb wurden die DAKO-Mäuse für die Experimente mit NA im Gegensatz zu

den C57BL/6J-, AAKO- und AHKO-Mäusen nicht gefastet, sondern *ad-libitum* gefüttert. NA löste in den DAKOs eine Senkung der Plasma-FS aus (Abbildung 4.16). Diese Daten unterstützen eine lipolyse-unabhängige Wirkung von NA, da trotz des Fehlens von ATGL und HSL in Adipozyten die Plasma-FS durch NA gesenkt wurden.

Die Plasmawerte von Glycerol wurden durch NA im Gegensatz zu AAKO-Tieren (Abbildung 4.12) in DAKOs und auch in den AHKOs nicht reduziert (Abbildung 4.15, Abbildung 4.16). DAKOs und AHKOs haben gemeinsam, dass die HSL adipozyten-spezifisch deletiert ist. Das Ausbleiben einer Verringerung des Plasma-Glycerolwerts durch NA in DAKOs und AHKOs deutet auf einen Effekt von NA auf die HSL-katalysierte Lipolyse hin. Die ausgeprägte Verringerung der Plasma-FS (Abbildung 4.15, Abbildung 4.16) durch NA in diesen beiden Mausmodellen spricht jedoch gegen einen NA-Effekt auf HSL-katalysierte Lipolyse.

Sofern NA nicht die Lipolyse inhibiert, könnte dieser Metabolit einen alternativen Stoffwechselweg beeinflussen, der zur Plasmalipidsenkung führt. In weiterführenden Untersuchungen über alternative NA-Wirkmechanismen wurde ermittelt, dass NA eine rapide Reduktion der hepatischen TG in C57BL/6J-Mäusen auslöst (Abbildung 4.19). Es wurde bereits gezeigt, dass NA die hepatische DGAT2 hemmt (Ganji et al., 2004). Dieses Enzym ist für FS-Reesterifizierung zu TG in der Leber verantwortlich. Wenn NA also die hepatische DGAT2 hemmt, kommt es zu einer verringerten TG-Speicherung in der Leber. Dadurch fehlen TG für die Bildung der Lipoproteine VLDL und LDL und es kommt zu einer verringerten Konzentration dieser Plasmalipoproteine. Bemerkenswerterweise ist GPR109A nicht in der Leber exprimiert (Offermanns, 2006). Das deutet darauf hin, dass NA die DGAT2 in den Hepatozyten nicht über den GPR109A hemmt, was wiederum eine rezeptor-unabhängige Wirkung von NA in der Leber befürwortet. In Mäusen mit hepatischer DGAT2-Reduktion ist die hepatische TG-Synthese und FS-Oxidation erhöht (Tep et al., 2012). Durch hepatische DGAT2-Reduktion mittels *antisense*-Oligonukleotiden wurden in fettleibigen Mäusen Hyperlipidämie und hepatische Steatose reduziert (Yu et al., 2005). Da NA einer Hyperlipidämie entgegenwirkt, besteht die Möglichkeit, dass die Plasmalipidsenkung durch NA von der Inhibierung der hepatischen DGAT2 ausgelöst wird. Aufgrund des Zusammenhangs der NA-Wirkung auf hepatische DGAT2 und des hepatischen TG-Stoffwechsels stellt die Leber ein vielversprechendes Ziel in der zukünftigen Suche nach alternativen Wirkmechanismen von NA dar.

Die aktuelle Hypothese des NA-Wirkmechanismus ist die schnelle FS-Aufnahme in oxidative Gewebe, wie beispielsweise in die Leber, BAT oder Skelettmuskel. Jedoch ist unklar, ob

dieser Prozess über den NA-Rezeptor laufen kann, da GPR109A beispielsweise in der Leber und im Skelettmuskel nicht exprimiert wird (Tunaru et al., 2003). In den oxidativen Geweben könnte NA zur katabolen FS-Oxidation, also zum Abbau der FS in das universelle Stoffwechselprodukt Acetyl-CoA, führen. Im Widerspruch dazu stehen Studien, in denen durch NA eine verminderte FS-Oxidation in BAT beobachtet wurde (Blondin et al., 2017; Labbé et al., 2015). Die verringerte FS-Oxidation wurde in diesen Arbeiten mit inhibierter Lipolyse begründet, die aber nicht gemessen wurde. Dies ist ein Beispiel dafür, dass NA in Studien oft ohne Überprüfung als Lipolysehemmer eingesetzt wird, was als Konsequenz zu falschen Schlüssen über Stoffwechselwege führen kann. Die Untersuchung der Wirkung von NA auf Lipolyse stellt also einen bedeutsamen Forschungsgegenstand dar. In dieser Arbeit wurden Widersprüche zu der gängigen Theorie der Lipolysehemmung durch NA gesammelt, die in zukünftigen Untersuchungen aufgeklärt werden sollen.

5.2. Über NR als Plasmalipidsenker und die Untersuchung des zugrundeliegenden Wirkmechanismus

NR ist ein NAD^+ -Vorläufermolekül, das über die Entstehung von Nikotinamidmononukleotid (NMN) zu NAD^+ umgewandelt wird. NAD^+ wirkt als Kosubstrat der Proteinfamilie der SIRT. Diese Enzyme können Histone, Transkriptionsregulatoren und metabolische Enzyme deazetylieren und sind somit Schlüsselregulatoren für den zellulären Energiemetabolismus. Canto et al. (2012) haben gezeigt, dass die Verabreichung von NR den NAD^+ -Gehalt in Mitochondrien in der Leber und im Muskel erhöht. NR ist, wie NA, ein Teil des Vitamin B3-Komplexes, aktiviert im Gegensatz zu NA nicht den GPR109A. Da NR den Rezeptor GPR109A nicht aktiviert, könnte eine ähnliche Wirkung von NR zu NA auf Plasmalipide darauf hindeuten, dass auch NA Plasmalipide nicht über GPR109A senkt. Deshalb wird in dieser Arbeit die Auswirkung von NR auf Plasmalipidwerte mit NA verglichen. Darüber hinaus ist die Auswirkung von NR auf Plasmalipide bis dato nicht erforscht worden. Somit kann die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung des NR-Wirkmechanismus Aufschluss darüber geben, wie sich NR auf Plasmalipidwerte auswirkt und ob diese Auswirkung einem NAD^+ -abhängigen Weg unterliegt.

Nach der Verabreichung von NR *in-vivo* in C57BL/6J-Mäuse wurden Plasma-FS, -TG und -Glycerol in ähnlicher Ausprägung verringert wie nach NA-Verabreichung (Abbildung 4.21). Im Gegensatz zu den Daten mit NA stieg jedoch die Plasmaglukose nach NR-Verabreichung in 2 h auf das 1,5-fache an (Abbildung 4.21). Dieses Ergebnis könnte im Zusammenhang

damit stehen, dass der Insulingehalt im Blut durch NR-Verabreichung verringert wird, sehr stark ausgeprägt ist dieser Effekt bei einer hochkalorischen Ernährung (Canto et al., 2012). Der Anstieg der Plasmaglukose durch NR steht im Widerspruch zu publizierten Daten über die Verbesserung von T2D durch die Behandlung mit NAD⁺-Vorläufern (Karpe & Frayn, 2004). Möglicherweise handelt es sich bei der Erhöhung des Plasmaglukosewerts durch NR aber um einen kurzzeitigen Effekt, der sich nach kurzer Zeit wieder normalisiert. Zusammengefasst wirkt intraperitoneal injiziertes NR *in-vivo* ähnlich wie NA, jedoch in schwächerem Ausmaß auf Plasmalipidparameter und es erhöht im Gegensatz zu NA den Blutglukosewert unmittelbar nach der Verabreichung.

Trammell & Brenner (2013) haben beschrieben, dass das weitere NAD⁺-Vorläufermolekül und Vitamin-B3-Mitglied NAM durch bakterielle Nikotinamidasen im Darm zu NA und NAD⁺ umgewandelt wird. Um die Nähe zum Darm durch eine intraperitoneale NR-Injektion zu umgehen, wurden NR und NA intravenös in C57BL/6J-Mäuse injiziert (Abbildung 4.22). Damit wurde umgangen, dass NA und NR durch bakterielle Enzyme im Darm verändert werden. Nach der intravenösen Verabreichung von NA kam es in derselben Ausprägung zu einer Senkung der Plasma-FS wie nach intraperitonealer Verabreichung (Abbildung 4.22). Die intravenöse NR-Injektion führte zu einem völligen Ausbleiben einer Senkung der Plasma-FS (Abbildung 4.22). Möglicherweise wird NR durch Nikotinamidasen bei intraperitonealer Injektion zu NA oder NAD⁺ umgewandelt und senkt daher Plasma-FS bei intravenöser Injektion nicht.

Im Vergleich mit NA (Abbildung 4.19) wurde eine ähnliche Reduktion hepatischer TG in C57BL/6J-Mäusen nach NR-Verabreichung beobachtet (Abbildung 4.25). Im Gegensatz zu NA, die hepatische DGAT2 hemmt (Ganji et al., 2004), ist von NR keine DGAT2-inhibierende Eigenschaft bekannt. Da NR die hepatischen TG in derselben Ausprägung wie NA senkt, könnte das einen Zusammenhang des Wirkmechanismus beider Metabolite bedeuten. Da beide Verbindungen NAD⁺-Vorläufer sind, werden die hepatischen TG möglicherweise dadurch gesenkt, dass NA und NR einen „NAD⁺-Signalweg“ aktivieren. Auch die Tatsache, dass NR den Rezeptor GPR109A nicht aktiviert und dieser Rezeptor nicht in der Leber exprimiert wird (Offermanns, 2006), befürwortet eine rezeptor-unabhängige Senkung der hepatischen TG sowohl durch NR, als auch durch NA. Es könnte aber auch sein, dass NR zu NA konvertiert wird und wiederum NA eine Reduktion der hepatischen TG in dieser Untersuchung hervorgerufen hat. Bis dato wurde keine integrale Erklärung für die Senkung der hepatischen TG durch NA und NR gefunden.

Da in dieser Arbeit der Fokus auf der Auswirkung von NA auf die Lipolyse lag, wurden mit NR präliminäre Untersuchungen durchgeführt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* Evidenzen gesammelt, dass NA einen lipolyse-unabhängigen Wirkmechanismus hat. Diese Annahme widerspricht vielen Publikationen der NA-Forschung, da die Hemmung der Lipolyse seit der Entdeckung von NA als der Grund der plasmalipidsenkenden Wirkung angenommen wurde (Baird, 1968; Tunaru et al., 2003, Carlson et al., 1963). Deshalb könnten diese Ergebnisse die jahrzehntelange allgemeingültige Annahme des NA-Wirkmechanismus falsifizieren. Durch die begleitenden Untersuchungen mit NR wurden für NA alternative Wege zur GPR109A-induzierten Lipolysehemmung, wie beispielsweise eine mögliche Anschaltung des NAD⁺-Weges angetastet. Diese Arbeit hat für die Untersuchung des NA-Wirkmechanismus einige Fragen, aber auch Möglichkeiten für die Erforschung des Plasmalipidsenkens NA aufgebracht.

6. Abkürzungen

Ai	Atglistatin®
AR	Arbeitsreagenz
ATGL	<i>Adipose Triglyceride Lipase</i>
BAT	<i>brown adipose tissue</i> (braunes Fettgewebe)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosine monophosphate</i>
CGI-58	<i>Comparative gene identification-58</i>
DG	Diazylglyzerol
ERK	<i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>
FS	Fettsäure
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
Hi	HSL-Inhibitor
HSL	<i>Hormon-sensitive Lipase</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>
k.A.	keine Angabe
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Lp A	Lipoprotein A
MAPK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
MG	Monoazylglyzerol
MGL	<i>Monoacyl Glycerol Lipase</i>
NA	<i>nicotinic acid</i> (Nikotinsäure)
NAD⁺	Nikotinamidadenindinukleotid

NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NAM	Nikotinamid
NR	Nikotinamidribosid
p-ERK	<i>phosphorylated Extracellular signal-regulated Kinase</i>
p-HSL	<i>phosphorylated Hormon-sensitive Lipase</i>
PKA	Proteinkinase A
PLIN-1A	Perilipin 1A
RT	Raumtemperatur
SIRT	Sirtuine
T2D	Typ 2 Diabetes
TG	Triazylglyzerol
TGH	Triglyzeridhydrolase
Trp	Tryptophan
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WAT	<i>white adipose tissue</i> (weißes Fettgewebe)

7. Referenzen

- Altschul R., Hoffer A., Stephen J.D. (1955). Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Archives of Biochemistry*, 54: 558–559.
- Altschul R. (1963). A precis regarding the hypocholesterolemic activities of nicotinic acid and 3-pyridineacetic acid. *Minerva medica*. 54:1969-71.
- Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2008). Adipokines and the Peripheral and Neural Control of Energy Balance. *Molecular Endocrinology*, 22(5), 1023–1031. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0529>
- Badawy, A. A. B. (2014). Pellagra and alcoholism: A biochemical perspective. *Alcohol and Alcoholism*, 49(3), 238–250. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agu010>
- Baird, E. (1968). Effects of Lipolytic and Antilipolytic Levels in Isolated Substances Fat Cells * on Adenosine, 243(8).
- Belenky, P., Racette, F. G., Bogan, K. L., McClure, J. M., Smith, J. S., & Brenner, C. (2007). Nicotinamide Riboside Promotes Sir2 Silencing and Extends Lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 Pathways to NAD⁺. *Cell*, 129(3), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.024>
- Bergan, H. E., Kittilson, J. D., & Sheridan, M. A. (2013). PKC and ERK mediate GH-stimulated lipolysis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(2), 213–224. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0039>
- Bieganski, P., & Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a preiss-handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell*, 117(4), 495–502. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00416-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00416-7)
- Blondin, D. P., Frisch, F., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, É. E., Haman, F., ... Carpentier, A. C. (2017). Inhibition of Intracellular Triglyceride Lipolysis Suppresses Cold-Induced Brown Adipose Tissue Metabolism and Increases Shivering in Humans. *Cell Metabolism*, 25(2), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.005>
- Bock, H.H., Herz J., May P. (2007). Conditional animal models for the study of lipid metabolism and lipid disorders. *Handbook of experimental pharmacology*, (178):407-39.. https://doi.org/10.1007/978-3-540-35109-2_17

- Branco, A. F., Pereira, S. P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A. A., & Oliveira, P. J. (2015). Gene expression profiling of H9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129303>
- Brasaemle, D. L. (2007). *Thematic review series: Adipocyte Biology*. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of Lipid Research*, *48*(12), 2547–2559. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700014-JLR200>
- Brown, W. V. (2001). Novel approaches to lipid lowering: what is on the horizon? *The American Journal of Cardiology*, *87*(5A), 23B–27B. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256846>
- Butcher, R. W., Baird, C. E., & Sutherland, E. W. (1968). Effects of Lipolytic and Antilipolytic Substances on Adenosine Effects of Lipolytic and Antilipolytic Levels in Isolated Substances Fat Cells * on Adenosine. *J. Biol. Chem.*, *243*(243), 1705–1712.
- Canto, C., Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Youn, D. Y., Oosterveer, M. H., Cen, Y., ... Auwerx, J. (2012). The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, *15*(6), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.022>
- Cao, W., Luttrell, L. M., Medvedev, A. V., Pierce, K. L., Daniel, K. W., Dixon, T. M., ... Collins, S. (2000). Direct binding of activated c-Src to the β 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(49), 38131–38134. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000592200>
- Carlson, L. A. (1963). Studies on the effect of nicotinic acid on catecholamine stimulated lipolysis in adipose tissue in vitro. *Acta Med Scand*, *173*: 719–22.
- Carlson, L. A. (2005). Nicotinic Acid: The broad-spectrum lipid drug: a 50th anniversary review. *J Intern Med*, *258*(94–114), 94–114.
- Carlson, LA., Hanngren A. (1964). Initial distribution in mice of ³H-labeled nicotinic acid studied with autoradiography. *Life sciences*. 867-71.
- Carrera-Bastos, P., Fontes-Villalba, M., O'Keefe, J., Lindeberg, S., & Cordain, L. (2011). The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Research Reports in Clinical Cardiology*, 15–35. <https://doi.org/10.2147/RRCC.S16919>

- Cettour-rose, P., Gademann, K., Rinsch, C., Schoonjans, K., Sauve, A. A., & Auwerx, J. (2013). Europe PMC Funders Group The NAD + precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet induced obesity, *15*(6), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.022>.The
- Chen, D., Waters, S. B., Holt, K. H., & Pessin, J. E. (1996). SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(11), 6328–6332. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6328>
- Chitraju, C., Mejhert, N., Haas, J. T., Diaz-Ramirez, L. G., Grueter, C. A., Imbriglio, J. E., ... Farese, R. V. (2017). Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis. *Cell Metabolism*, *26*(2), 407–418.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.012>
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., ... Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1509–1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>.Identification
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, *365*(9468), 1415–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66378-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66378-7)
- Edens, N. K., Leibel, R. L., & Hirsch, J. (1990). Mechanism of free fatty acid re-esterification in human adipocytes in vitro. *Journal of Lipid Research*, *31*(8), 1423–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2280183>
- Eguchi, J., Wang, X., Yu, S., Kershaw, E. E., Chiu, P. C., Dushay, J., ... Rosen, E. D. (2011). Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4 Jun. *Cell Metabolism*, *7*(4), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.020>.The
- Fukuda, N., & Ontko, J. a. (1984). Interactions between fatty acid synthesis, oxidation, and esterification in the production of triglyceride-rich lipoproteins by the liver. *Journal of Lipid Research*, *25*, 831–842.
- Ganji, S. H., Tavintharan, S., Zhu, D., Xing, Y., Kamanna, V. S., & Kashyap, M. L. (2004). Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *Journal of Lipid Research*, *45*(10), 1835–1845. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300403->

JLR200

- Ginsberg, H. N., & Reyes-Soffer, G. (2013). Niacin. *Current Opinion in Lipidology*, 24(6), 475–479. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000017>
- Girousse, A., Tavernier, G., Valle, C., Moro, C., Mejhert, N., Dinel, A. L., ... Langin, D. (2013). Partial Inhibition of Adipose Tissue Lipolysis Improves Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity Without Alteration of Fat Mass. *PLoS Biology*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001485>
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2016). Genes to Statins, 161(1), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.036.A>
- Gordon, S. M., Li, H., Shah, A., Lu, L. J., & Davidson, W. S. (2015). A Comparison of the Mouse and Human Lipoproteome: Suitability of the Mouse Model for Studies of Human Lipoproteins. *J Proteome Res*, 18(3), 386–392. <https://doi.org/10.1038/nn.3945.Dopaminergic>
- Granneman, J. G., Moore, H. P. H., Krishnamoorthy, R., & Rathod, M. (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34538–34544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068478>
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., ... Zechner, R. (2006). Triglyceride Lipase, 211(May), 734–737.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., ... Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4806–4815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110355200>
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Jing, E., Grueter, C. A., Amy, M., Aouizerat, B., ... Christopher, B. (2013). Accelerate the Development of the Metabolic Syndrome, 44(2), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.019.SIRT3>
- Holm, C., Østerlund, T., Laurell, H., & Contreras, J. A. (2000). MOLECULAR MECHANISMS REGULATING HORMONE-SENSITIVE LIPASE AND LIPOLYSIS.

- Jung, S. (2018). Implications of publicly available genomic data resources in searching for therapeutic targets of obesity and type 2 diabetes. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 43. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0066-5>
- Kahn, B., & Flier, J. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 473–481. <https://doi.org/10.1172/JCI10842>
- Kamanna, V. S., Ganji, S. H., & Kashyap, M. L. (2013). Recent advances in niacin and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 24(3), 239–45. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283613a68>
- Karpe, F., Dickmann, J. R., & Frayn, K. N. (2011). Fatty acids, obesity, and insulin resistance: Time for a reevaluation. *Diabetes*, 60(10), 2441–2449. <https://doi.org/10.2337/db11-0425>
- Karpe, F., & Frayn, K. N. (2004). The nicotinic acid receptor--a new mechanism for an old drug. *Lancet*, 363, 1892–1894. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16359-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16359-9)
- Labbé, S. M., Caron, A., Bakan, I., Laplante, M., Carpentier, A. C., Lecomte, R., & Richard, D. (2015). *In vivo* measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *The FASEB Journal*, 29(5), 2046–2058. <https://doi.org/10.1096/fj.14-266247>
- Lafontan, M., & Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function, 34.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., ... Auwerx, J. (2006). Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127(6), 1109–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.013>
- Lanska, D. J. (2012). The discovery of niacin, biotin, and pantothenic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(3), 246–253. <https://doi.org/10.1159/000343115>
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., ... Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism*, 3(5), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.005>

- Lauring, B., Taggart, A. K. P., Tata, J. R., Dunbar, R., Caro, L., Cheng, K., ... Plump, A. (2012). Niacin Lipid Efficacy Is Independent of Both the Niacin Receptor GPR109A and Free Fatty Acid Suppression. *Science Translational Medicine*, 4(148), 148ra115-148ra115. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003877>
- Marquez-Sandoval, F., MacEdo-Ojeda, G., Viramontes-Hernández, D., Fernández Ballart, J. D., Salas Salvador, J., & Vizmanos, B. (2011). The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: A systematic review. *Public Health Nutrition*, 14(10), 1702–1713. <https://doi.org/10.1017/S1368980010003320>
- Mayer, N., Schweiger, M., Romauch, M., Grabner, G. F., Eichmann, T. O., Fuchs, E., ... Breinbauer, R. (2013). Development of small-molecule inhibitors targeting adipose triglyceride lipase. *Nature Chemical Biology*, 9(12), 785–787. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1359>
- Mayes, P., & Topping, D. (1974). lipogenesis by plasma free fatty acids: simultaneous studies on lipoprotein secretion, cholesterol synthesis, ketogenesis and gluconeogenesis (Short Communication). *Biochemical Journal*, 140, 111–114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1167977/>
- Moreira, G. C., Cipullo, J. P., Ciorlia, L. A. S., Cesarino, C. B., & Vilela-Martin, J. F. (2014). Prevalence of metabolic syndrome: Association with risk factors and cardiovascular complications in an urban population. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105056>
- Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, S., & Schotz, M. C. (1980). Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 667–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.003315>
- Offermanns, S. (2006). The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(7), 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.05.008>
- Olivecrona, T., Liu, G., Hultin, M., & Bengtsson-Olivecrona, G. (1993). Regulation of lipoprotein lipase. *Biochemical Society Transactions*, (1989).
- Ramachandran, A. (2014). Know the signs and symptoms of diabetes. *Indian Journal of Medical Research*, 140(5): 579–581.

- Robidoux, J., Kumar, N., Daniel, K. W., Moukdar, F., Cyr, M., Medvedev, A. V., & Collins, S. (2006). Maximal β 3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37794–37802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605572200>
- Schaffer, J. E. (2003). Lipotoxicity: When tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology*, 14(3), 281–287. <https://doi.org/10.1097/00041433-200306000-00008>
- Schoiswohl, G., Stefanovic-Racic, M., Menke, M. N., Wills, R. C., Surlow, B. A., Basantani, M. K., ... Kershaw, E. E. (2015). Impact of reduced ATGL-mediated adipocyte lipolysis on obesity-associated insulin resistance and inflammation in male mice. *Endocrinology*, 156(10), 3610–3624. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1322>
- Schweiger, M., Romauch, M., Schreiber, R., Grabner, G. F., Hütter, S., Kotzbeck, P., ... Zechner, R. (2017). Pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase corrects high-fat diet-induced insulin resistance and hepatosteatosis in mice. *Nature Communications*, 8(May 2016), 14859. <https://doi.org/10.1038/ncomms14859>
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., ... Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40236–40241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608048200>
- Sitnick, M. T., Basantani, M. K., Cai, L., Schoiswohl, G., Yazbeck, C. F., Distefano, G., ... Kershaw, E. E. (2013). Skeletal muscle triacylglycerol hydrolysis does not influence metabolic complications of obesity. *Diabetes*, 62(10), 3350–3361. <https://doi.org/10.2337/db13-0500>
- Soga, T., Kamohara, M., Takasaki, J., Matsumoto, S., Saito, T., Ohishi, T., ... Furuichi, K. (2003). Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(1), 364–369. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00342-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00342-5)
- Somvanshi, R. K., Qiu, X., & Kumar, U. (2013). Isoproterenol induced hypertrophy and associated signaling pathways are modulated by Somatostatin in H9c2 cells. *International Journal of Cardiology*, 167(3), 1012–1022. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.03.077>

- Svedmyr, N., Harthorn, L., & Lundholm, L. (1969). The relationship between the plasma concentration of free nicotinic acid and some of its pharmacologic effects in man. *Clin.Pharmacol.Ther.*, *10*(4), 559–570.
- Taggart, A. K. P., Kero, J., Gan, X., Cai, T., Cheng, K., Ippolito, M., ... Waters, M. G. (2005). Adipocyte Lipolysis via the, 26649–26653. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500213200>
- Taylor, A. J., Sullenberger, L. E., Lee, H. J., Lee, J. K., & Grace, K. A. (2004). Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing cholesterol (ARBITER) 2: A double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation*, *110*(23), 3512–3517. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148955.19792.8D>
- Tep, S., Mihaila, R., Freeman, A., Pickering, V., Huynh, F., Tadin-Strapps, M., ... Ason, B. (2012). Rescue of Mtp siRNA-induced hepatic steatosis by DGAT2 siRNA silencing. *Journal of Lipid Research*, *53*(5), 859–867. <https://doi.org/10.1194/jlr.M021063>
- Trammell, S. A., & Brenner, C. (2013). Targeted, Lcms-Based Metabolomics for Quantitative Measurement of Nad + Metabolites. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *4*(5), e201301012. <https://doi.org/10.5936/csbj.201301012>
- Trammell, S. A. J., Weidemann, B. J., Chadda, A., Yorek, M. S., Holmes, A., Coppey, L. J., ... Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside opposes type 2 diabetes and neuropathy in mice. *Scientific Reports*, *6*(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep26933>
- Tunaru, S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*, *9*(5), 548–553. <https://doi.org/10.1038/nm>
- Tunaru, S. (2005). Characterization of Determinants of Ligand Binding to the Nicotinic Acid Receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Molecular Pharmacology*, *68*(5), 1271–1280. <https://doi.org/10.1124/mol.105.015750>
- Tunaru, S., Kero, J., Annette, S., & Christian, W. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*, *9*(5), 548–553. <https://doi.org/10.1038/nm>
- Viljoen, M., Swanepoel, A., & Bipath, P. (2015). Antidepressants may lead to a decrease in niacin and NAD in patients with poor dietary intake. *Medical Hypotheses*, *84*(3), 178–

182. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.12.017>
- Wang, S., Soni, K. G., Semache, M., Casavant, S., Fortier, M., Pan, L., & Mitchell, G. A. (2008). Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, *95*(3), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.06.012>
- Watt, M. J., Holmes, A. G., Steinberg, G. R., Mesa, J. L., Kemp, B. E., & Febbraio, M. A. (2004). Reduced plasma FFA availability increases net triacylglycerol degradation, but not GPAT or HSL activity, in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *287*(1), E120–E127. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00542.2003>
- Xia, B., Cai, G. H., Yang, H., Wang, S. P., Mitchell, G. A., & Wu, J. W. (2017). Adipose Tissue Deficiency of Hormone- Sensitive Lipase Causes Fatty Liver in Mice. *PLoS Genet*, *13*(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007110>
- Yang, T., Chan, N. Y. K., & Sauve, A. A. (2007). Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: Effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, *50*(26), 6458–6461. <https://doi.org/10.1021/jm701001c>
- Yu, X. X., Murray, S. F., Pandey, S. K., Booten, S. L., Bao, D., Song, X. Z., ... Bhanot, S. (2005). Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology*, *42*(2), 362–371. <https://doi.org/10.1002/hep.20783>
- Zechner, R., Kienesberger, P. C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., & Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research*, *50*(1), 3–21. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800031-JLR200>
- Zimmermann, R. (2004). Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science*, *306*(5700), 1383–1386. <https://doi.org/10.1126/science.1100747>
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., ... Et Al. (2004). Science Supporting Online Material Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase R. Zimmermann et al. *Lipids*, *1*(3), 1–22. <https://doi.org/10.1126/science.1100747>