

Charakterisierung des Expressionsmusters und der aktivierten Signalkaskaden ausgewählter CTRPs im adulten Myokard

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jakob Hanna
aus Syrien/Kamishli

Gießen, 2015

Aus dem Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Schulz)

Gutachter:
Prof. Dr. S. Rohrbach
Gutachter:
Prof. Dr. R. Tikkanen

Tag der Verteidigung:
12.01.2016

meinen Eltern.

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ.....	10
1.2 Die C1q/TNF-Superfamilie	11
1.2.1 Adiponektin – Charakterisierung und Funktion.....	12
1.2.1.1 Die Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2	14
1.2.1.2 Weitere potentielle Adiponektin-Rezeptoren	15
1.2.1.3 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK).....	15
1.2.2 C1q/TNF α - related proteins – Charakterisierung und Funktion	16
1.3 Ziel der Arbeit	20
2 Material	21
2.1 Chemikalien.....	21
2.2 Antikörper.....	22
2.3 Primer	23
2.4 siRNA	24
3 Methoden.....	25
3.1 Zellkultur	25
3.1.1 Versuchstiere.....	25
3.1.2 Präparation isolierter Kardiomyozyten aus Rattenherzen	25
3.1.3 Vorinkubation der Kulturschalen	26
3.1.4 Kultivierung und Ernte der Kardiomyozyten.....	27
3.1.5 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen und Fibroblasten	28
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	28
3.2.1 Transfektion mittels siRNA	28

3.2.1.1	Small interferenz RNA Transfektion mittels Lipofektion	28
3.2.1.2	Transfektion adulter Rattenkardiomyozyten.....	29
3.2.2	RNA Analyse	29
3.2.2.1	Extraktion von RNA aus Zellkulturen	29
3.2.2.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	30
3.2.2.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	30
3.2.2.4	Standard-PCR	31
3.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
3.2.3	Protein	33
3.2.3.1	Extraktion von Proteinen aus Zellen.....	33
3.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.2.3.3	Western Blot	34
3.3	Statistische Analyse	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Expressionsmuster der CTRP mRNA	37
4.1.1	mRNA-Expressionsmuster der CTRPs in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten.....	37
4.1.2	Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die CTRP mRNA-Expression im kardialen Gewebe von Ratten	39
4.1.2.1	Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die mRNA-Expression von CTRPs in kardialen Myozyten	40
4.1.2.2	Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die mRNA-Expression von CTRPs in kardialen Endothelzellen.....	41
4.1.2.3	Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die mRNA-Expression von CTRPs in kardialen Fibroblasten.....	43
4.2	Expressionsmuster von Adiponektin-Rezeptor 1-, 2- und T-Cadherin-mRNA in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten	43

4.3	CTRP-induzierte Aktivierung der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) in adulten Rattenkardiomyozyten	45
4.3.1	AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-Stimulierung durch CTRPs in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer.....	45
4.3.2	Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC)-Stimulierung durch CTRPs in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer	48
4.3.3	Konzentrationsabhängige Stimulierung der AMP-aktivierte Proteinkinase durch CTRPs	51
4.3.4	Konzentrationsabhängige Stimulierung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch CTRPs	56
4.4	Herabregulation der Adiponektin-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 mittels siRNA in adulten Rattenkardiomyozyten.....	60
5	Diskussion.....	66
5.1	Expressionsmuster der ausgewählten CTRPs in verschiedenen Zelltypen	66
5.2	Expressionsmuster der Adiponektinrezeptoren in verschiedenen Zelltypen..	67
5.3	Möglicher Einfluss von Alter und kalorischer Restriktion auf die Expression der CTRPs.....	68
5.4	Aktivierung der AMPK und ACC durch ausgewählte CTRPs in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer	69
5.5	Aktivierung der AMPK und ACC durch ausgewählte CTRPs in Abhängigkeit von der Konzentration	70
5.6	Potenzieller Einfluss des AdipoR1 bzw. AdipoR2 im Rahmen der CTRP vermittelten Effekte	71

6	Forschungsperspektiven und Schlussfolgerungen.....	73
7	Zusammenfassung – deutsch	75
8	Zusammenfassung – englisch.....	76
9	Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis	77
	9.1 Abbildungsverzeichnis	77
	9.2 Tabellenverzeichnis	77
10	Literaturverzeichnis	78
11	Publikationsverzeichnis.....	87
	11.1 Postervortrag:.....	87
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	88
13	Danksagung	89
14	Tabellarischer Lebenslauf.....	90

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
AdipoR1/2	Adiponektinrezeptor 1/2
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APPL1	adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain and a leucine zipper motif 1
Ara A	Adenine 9-P-D-arabinofuranoside
BMI	Body Mass Index
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CD	Cluster of differentiation
CORS-26	Collagenous repeat-containing sequence of 26 kDa protein
CTR1	C1/Tumor necrosis factor related Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemoluminescence
eNOS	Endotheliale NO Synthase
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
His-Puffer	Histidin-Puffer
HMW	High Molecular Weight
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase
HRP	Horseradish-Peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
kDa	Kilodalton
LMW	Low Molecular Weight
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein1
LV	Linker Ventrikel
MMW	Middle Molecular Weight
mRNA	Messenger RNA

NaOH	Natriumhydroxid
NTC	no template control
pACC	Phosphorylierte Form der ACC
pAMPK	Phosphorylierte Form der AMPK
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, (Phosphate-Buffered Saline)
PPAR α	Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha
RNA-I	RNA-Interferenz
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
siRNA	Small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe besteht insbesondere aus Fettzellen (Adipozyten) sowie der stromavaskulären Zellfraktion. Letztere wiederum ist aus Bindegewebszellen (Fibroblasten), Immunzellen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Präadipozyten zusammengesetzt (Greenwood und Johnson, 1983). Das Fettgewebe ist das größte endokrine Organ des Körpers und fungiert als Energiedepot (Kershaw, 2004). Es wird in ein braunes und weißes Fettgewebe unterteilt. Das braune Fettgewebe ist reich an Mitochondrien und erzeugt durch das mitochondriale Protein Thermogenin eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, wodurch Wärme an Stelle von ATP entsteht. Das weiße Fettgewebe hat die Funktion Energie durch die Lipogenese in Form von Triacylglyceriden zu speichern, sodass es diese bei Bedarf über die Lipolyse in Form von freien Fettsäuren wieder abgibt. Die metabolischen Prozesse der Lipogenese (Energiespeicherung) und der Lipolyse (Energiebereitstellung) wechseln sich ständig ab. Hierbei ist Insulin das wichtigste Lipogenese-regulierende Hormon. Die Unterteilung des weißen Fettgewebes vollzieht sich nach der Lokalisation und kann demnach in ein subkutanen (s.c.) – und ein intraabdominelles/viszerales (v.c.) Fettgewebe gegliedert werden.

Unter dem Terminus Adipozytokine oder Adipokine versteht man Hormone und Proteine des Fettgewebes, die autokrin, parakrin oder endokrin sezerniert werden. Als erstes Adipozytokin wurde Leptin 1994 von dem Molekulargenetiker Zhang beschrieben. Es wirkt als Sättigungshormon auf den Hypothalamus und vermindert dadurch letztendlich die Nahrungsaufnahme (Zhanget al., 1994). Adipozytokine beeinflussen die Insulinsensitivität, den Fettstoffwechsel, die Immunantwort, u.v.m. (Guerre-Millo, 2003; Muoio und Newgar, 2006). Zu den Adipozytokinen gehören u.a. Interleukin6, Interleukin18, Resistin, TNF- α . (Yokotaet al., 2000). An dem Beispiel von Interleukin6 (IL-6) soll kurz die Vielfältigkeit der Wirkung einzelner Adipozytokine skizziert werden. IL-6 ist ein proinflammatorisches Interleukin und wird zu 1/3 vom Fettgewebe synthetisiert. Die Plasmakonzentration korreliert positiv mit dem Auftreten von Adipositas in der Bevölkerung (Fried et al., 1998). Darüber hinaus hat ein erhöhter IL-6 Spiegel einen prädiktiven Aussagewert bei der Entstehung von Diabetes Typ2 und ist im Progress dieser Erkrankung in einer höheren Konzentration zu finden (Pradhanet al., 2001). An-

hand dieses Beispiels wird der Einfluss von Adipozytokine auf die Entstehung von Adipositas sowie Diabetes deutlich. Dies rechtfertigt bereits die Erforschung weiterer Adipozytokine, um die Pathomechanismen der genannten Erkrankungen zu verstehen. Festzuhalten ist, verschiebt sich die Balance zwischen Energieaufnahme und Energieverbrennung zu Gunsten der Energieaufnahme, führt dies in erster Instanz zu Übergewicht bzw. Adipositas, was langfristig weitreichende Folgen mit sich bringt. Insbesondere die Anreicherung von viszeralem Fett wird mittlerweile als ein unabhängiger Risikofaktor für Erkrankungen gesehen, die mit Fettleibigkeit in Verbindung stehen, wie z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Kannel, 1985) oder Diabetes Typ 2 (Björntorp 1991).

1.2 Die C1q/TNF-Superfamilie

Namensgeber sind das erstmalig 1975 beschriebene Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF α) und der C1q-Faktor. Der C1q-Faktor ist das Schlüsselprotein des klassischen Komplementweges und repräsentiert eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das C1q-Molekül ist 460 kDa schwer und besteht aus 18 Polypeptidketten, welche jeweils eine kurze N-terminale, eine Kollagen- und eine globuläre C-terminale Domäne besitzen. Die Polypeptidketten bilden über kovalente und nicht-kovalente Bindungen eine Tripelhelix-Kollagenstruktur, wobei sich sechs dieser Tripel-Helices zusammenlagern und das C1q-Molekül bilden (Kishore et al., 2004). In Abbildung 1 ist die komplexe Struktur des C1q-Moleküls dargestellt und erläutert.

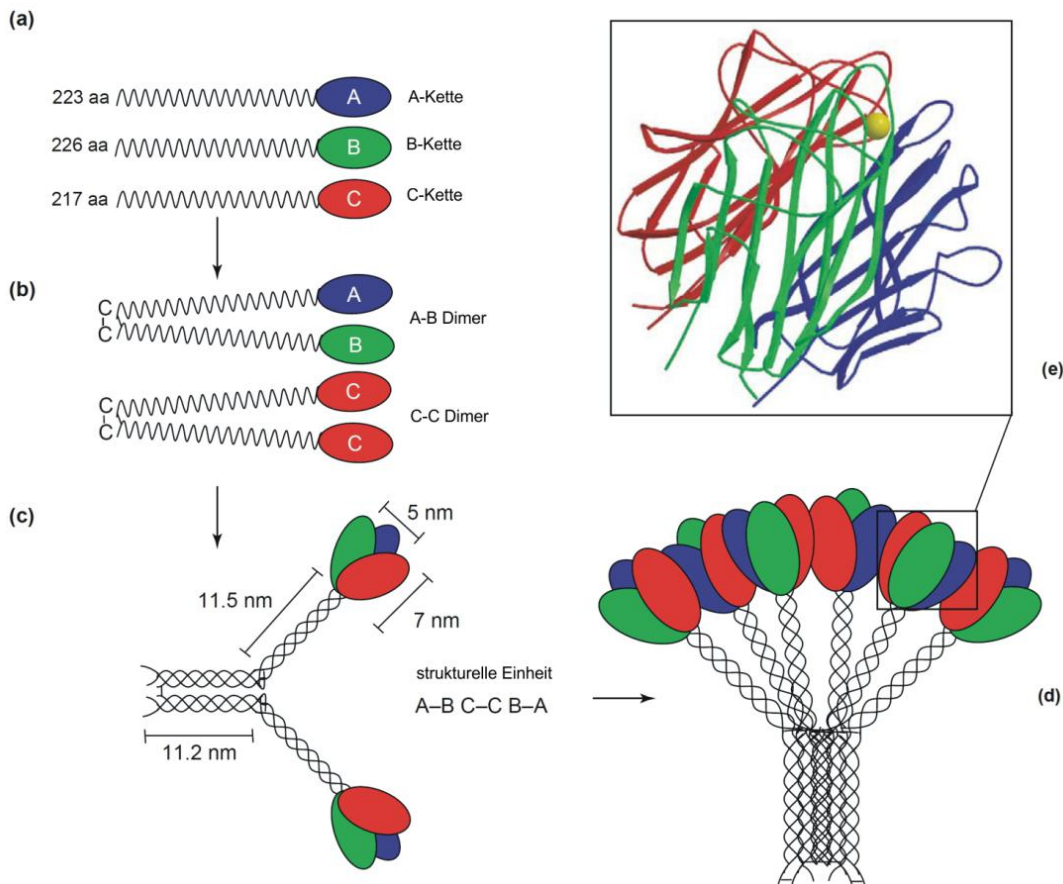


Abb.1: Struktureller Aufbau des C1q-Moleküls. Modifiziert nach Kishore et al., 2004.

(a+b) Die A, B und C-Ketten bilden zuerst durch Disulfidbindung Dimer-Untereinheiten und anschließend eine Tripelhelix-Kollagenstruktur. (c) Über starke nicht-kovalente Bindungen werden drei dieser Struktureinheiten zum C1q-Hexamer organisiert. (d+e) Die Kristallstruktur der drei gC1q-Domänen zeigen in ihrer Oberfläche deutliche elektrostatische Unterschiede.

Durch zahlreiche Arbeiten in diesem Gebiet und nicht zuletzt durch die Aufklärung der Adiponektin-Struktur wurde folglich die C1q/TNF-Proteinfamilie etabliert (Shapiro und Scherer, 1998). Aufgrund der Vielzahl der Proteine mit dieser engen strukturellen Homologie, die die Mitglieder dieser C1q/TNF α -Proteinfamilie ausmachen, wurde postuliert, dass ein gemeinsames Vorläufermolekül vorliegen muss (Kishore und Reid, 1999; Shapiro und Scherer, 1998).

1.2.1 Adiponektin – Charakterisierung und Funktion

Die Adipozyten sezernieren zahlreiche systemisch oder lokalwirkende aktive Moleküle. Das Adiponektin ist eines dieser Adipokine, das vor weniger als 20 Jahren erstmalig beschrieben wurde (Scherer et al., 1995; Hu et al., 1996; Maeda et al., 1996; Nakano et al., 1996). Synonyme für das Adiponektin sind Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), AdipoQ, ApM1 (adipose most abundant gene transcript 1) und GBP28 (gelatine binding protein 28). Grund für diese unterschiedliche Namensgebung

ist, dass mehrere unabhängige Forschungsgruppen in zeitlicher Nähe das Adiponektin beschrieben haben. Durchgesetzt hat sich der Name Adiponektin, der daher in dieser Arbeit verwendet wird. Adiponektin ist ca. 35 kDa schwer und besteht aus 247 Aminosäuren. Die Struktur weist vier Domänen mit großer Ähnlichkeit mit dem C1q-Faktor, Typ VIII und X Kollagen sowie TNF α auf und gehört daher zur C1q/TNF-Proteinfamilie (Scherer et al., 1995). Tsao et al. beschrieb erstmalig die Fähigkeit des Adiponektins über Cysteinresten Multimer-Komplexe zu bilden (2003). Adiponektin zirkuliert im Plasma hauptsächlich in drei Formen: als Trimer (LMW - low molecular weight adiponectin), als Hexamer (MMW - middle molecular weight adiponectin) sowie als hochmolekularer Komplex (HMW - high molecular weight adiponectin) (Okamoto et al., 2006). Auffällig ist zudem, dass Adiponektin ausschließlich von differenzierten Adipozyten exprimiert wird und in relativ hohen Konzentrationen im Serum vorkommt (Hu, 1996). Als das häufigste Adipozytokin macht es ungefähr 0,05% des humanen Gesamtplasmaproteins aus (Scherer et al., 1995). Ferner wurde eine höhere Expression von Adiponektin im viszeralen als im subkutanen Fettgewebe detektiert (Fain et al., 2004). Eine weitere Auffälligkeit ist, dass im Gegensatz zu allen anderen Adipozytokinen, bei Adipositas und bei verminderter Insulinresistenz, eine Verringerung des Adiponektinspiegels beschrieben wurde (Hu et al., 1996).

Übergewicht und Diabetes führen zur Reduktion der Adiponektin-Plasmakonzentration (Arita et al., 1999). Durch Gewichtsabnahme kann sich die Hormonkonzentration jedoch wieder normalisieren (Hu et al., 1996 und Hotta et al., 2000). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Adiponektin durch eine vermehrte Fettsäureoxidation im Muskel den Plasmaglukosespiegel senkte und eine Gewichtsabnahme induzierte (Fruebis et al., 2001). Adiponektin kann somit eine Verbesserung der Insulinsensitivität zugesprochen werden (Yamauchi et al., 2008).

Durch die strukturelle Nähe zu immunologischen Zytokinen, wie dem C1q-Faktor oder dem TNF α , wurde ferner nach einem inflammatorischen Effekt des Adiponektins geforscht. Es konnte gezeigt werden, dass Adiponektin u.a. durch die Suppression der Makrophagenfunktion eine antiinflammatorische Funktion besitzt (Chandran et al., 2003). Des Weiteren kann ihm u.a. durch die Supprimierung der Schaumzellbildung aus Makrophagen und Senkung des Triglyceridspiegels eine antiatherogene Wirkung zugeschrieben werden (Yamauchi et al., 2001). Bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit konnte eine negative Korrelation zwischen Adiponektin und dem C-reaktiven Protein, welcher Marker für systemische Entzündungen und Risikofaktor für

koronare Herzkrankheiten ist, gezeigt werden (Matsubara et al., 2003; Ouchi et al., 2003). Somit erlaubt die Höhe der Adiponektin-Serumkonzentration, Aussagen über das Risiko an einer Hypertonie (Ouchi et al., 2003) sowie an einem Myokardinfarkt (Pischon et al., 2004) zu treffen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Adiponektin insulinsensitivierende, antiinflammatorische, antiatherogene und kardioprotektive Funktionen besitzt. Es wird deutlich, dass die weiterführende Erforschung dieser (und weiterer) Zusammenhänge und Effekte von Adiponektin und weiteren Adipozytokine für die Prävention und Behandlung von Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und der koronaren Herzkrankheit eine zentrale Rolle einnimmt.

1.2.1.1 Die Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2

Adiponektin besitzt zwei Rezeptoren: Adiponektin-Rezeptor 1 (AdipoR1) und Adiponektin-Rezeptor 2 (AdipoR2) gehören zu den Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren (Kadowaki und Yamauchi, 2005). T-Cadherin konnte als Korezeptor für Adiponektin beschrieben werden, wobei T-Cadherin nur in glatten Muskel- und Endothelzellen vorzukommen scheint und vermutlich nur das hochmolekulare Adiponektin (HMW-Adiponektin) bindet (Hug et al., 2004). T-Cadherin besitzt keine intrazelluläre Domäne und kann somit auch keine intrazelluläre Signalkaskade direkt aktivieren (Yamauchi et al., 2003). AdipoR1 wird ubiquitär und vor allem im Skelettmuskel exprimiert, während AdipoR2 reichlich in der Leber vorkommt (Tsuchida et al., 2004). Adiponektin bindet als Ligand an die extrazelluläre (C-terminale) Domäne der Adiponektin-Rezeptoren, wobei die intrazelluläre (N-terminale) Domäne an APPL1 (adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain and a leucine zipper motif 1) bindet. Mittels APPL1 werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen (Kadowaki et al., 2006). Die Adiponektin-Rezeptoren aktivieren die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und den PPAR- α -Stoffwechselweg (Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha) (Yamauchi et al., 2003; Kadowaki und Yamauchi, 2005). In der Leber wird vorwiegend über den AdipoR2 eine Hemmung der Glukoneogenese und eine Induktion der Fettsäureoxidation vermittelt, wodurch der Blutzuckerspiegel und die Triglyzeridkonzentration abnimmt (Combs et al., 2001). Zusätzlich bewirkt Adiponektin im Skelettmuskel vorwiegend über den AdipoR1 eine vermehrte Glukoseaufnahme und Fettsäureoxidation (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001).

Ferner beeinflusst Adipositas das Expressionsverhalten der Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2. Übergewicht und Diabetes führen zur Reduktion der AdipoR1- und AdipoR2-mRNA-Expression im Muskel (Hu et al., 1996) und mit ihr folglich die Adiponektin-Sensitivität (Kadowaki und Yamauchi, 2005).

Inwieweit die Adiponektin-Rezeptoren eine Rolle im Rahmen der CTRP vermittelten Aktivierung bestimmter Signalkaskaden spielen, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

1.2.1.2 Weitere potentielle Adiponektin-Rezeptoren

Das LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein1) ist ein Oberflächenrezeptor, der in verschiedenen Geweben exprimiert ist (Boucher und Herz, 2011). Durch die Bindung von Adiponektin an die extrazelluläre Domäne des LRP1 von Makrophagen konnte eine erhöhte Aufnahme von apoptotischen Zellbestandteilen und somit ein antiinflammatorischer Effekt erzielt werden (Takemura et al., 2007).

In Makrophagen und weiteren Zellen wurde eine extrazelluläre Expression (Tarr et al., 2010 und Yan et al., 2010) des ursprünglich intrazellulär – ubiquitär vorkommenden Calreticulins beschrieben (Gold et al., 2010). In Makrophagen und apoptotischen Zellen konnte durch eine Bindung von Adiponektin mit dem Oberflächenprotein Calreticulin eine vermehrte Phagozytose festgestellt werden. Zusätzlich ist eine Bindung an CD91 – als weiterer Rezeptor für diese Vorgänge – von entscheidender Bedeutung.

Aufgrund der Tatsache, dass die Effekte nicht durch den Adiponektin-Rezeptor 1 und 2 erzielt werden können, wird diesen Rezeptoren eine primär metabolische Rolle zugeschrieben (Takemura et al., 2007).

1.2.1.3 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Die AMPK ist ein heterotrimerer Komplex, der aus den beiden regulatorischen β - und γ -Untereinheiten und aus der katalytischen α -Untereinheit besteht (Hardie 2003). Durch die γ -Untereinheiten ist die AMPK in der Lage Unterschiede im AMP:ATP Verhältnis zu detektieren. Im Zuge von beispielsweise Muskelarbeit kommt es zur Erhöhung des AMP:ATP Verhältnisses, was intrazellulär als Energiemangel gewertet wird und die Aktivierung der AMPK zur Folge hat (Adams et al., 2004). In der katalytischen α -Untereinheit im Aktivierungsloop wird die AMPK an Threonin 172 phosphoryliert (Hawley et al., 1996). Von der α - und β -Untereinheit bestehen jeweils zwei und von der γ -Untereinheit drei verschiedene Isoformen, wobei die $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\gamma 1$ -Untereinheiten

nahezu in jedem Gewebe exprimiert werden (Maeda et al., 2001). Im Herzen und im Skelettmuskel werden überwiegend die α_2 - und β_2 -Isoformen exprimiert (Arad et al., 2007).

Neben der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) (Park et al., 2002) sind die endotheliale NO-Synthase (eNOS) (Chen et al., 1999) und mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (Cheng et al., 2004) einer der vielen AMPK downstream targets. Die AMPK ist dabei das wichtigste regulatorische Enzym der ACC (Park et al., 2002) und wird direkt von der AMPK u.a. an Serin79 phosphoryliert und somit inhibiert. Eine Phosphorylierung der ACC führt zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation (Ha et al., 1994). Yamauchi beschrieb, dass die Aktivierung der AMPK vorwiegend über den AdipoR1 und die Aktivierung der PPAR- α vorwiegend über den AdipoR2 vermittelt ist (Yamauchi et al., 2007). Abbildung 2 zeigt einen Auszug der oben erläuterten Signalkaskade.

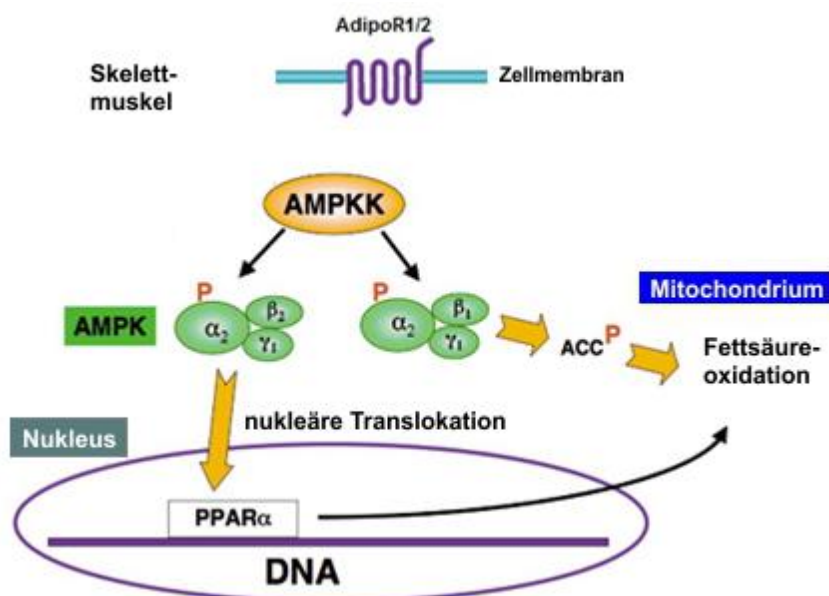


Abb. 2: Einfluss von Adiponektin in Skelettmuskelzellen. Modifiziert nach Tadashi et al., 2009.

Adiponektin aktiviert über die Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2 die AMPK-Kinase (α_2 -AMPK Isoform) in Skelettmuskelzellen. Im Zytoplasma kommt es durch die β_1 -Untereinheit zur Phosphorylierung der ACC und damit zur Steigerung der Fettsäureoxidation. Weiter führt die aktivierte α_2 -AMPK über die Translokation der β_2 -Untereinheit in den Nucleolus zu einer induzierten PPAR- α Gentranskription.

1.2.2 C1q/TNF α - related proteins – Charakterisierung und Funktion

Durch die Pionierarbeit von Wong zum Thema Adipokin-Strukturhomologe wurde erstmalig eine neue Proteinfamilie von Adiponektin-Paralogen beschrieben (Wong et al., 2004). Namensgebend für diese neue Proteinfamilie ist ihr gemeinsamer struktureller Aufbau. Wie Adiponektin ist diese Gruppe in vier determinierte Domänen aufgebaut: ein

N-terminales Signalpeptid, eine kurze variable Region, eine Kollagen-Domäne und eine C-terminale globuläre Kopfdomäne. Abbildung 3 veranschaulicht den strukturellen Aufbau der CTRPs.

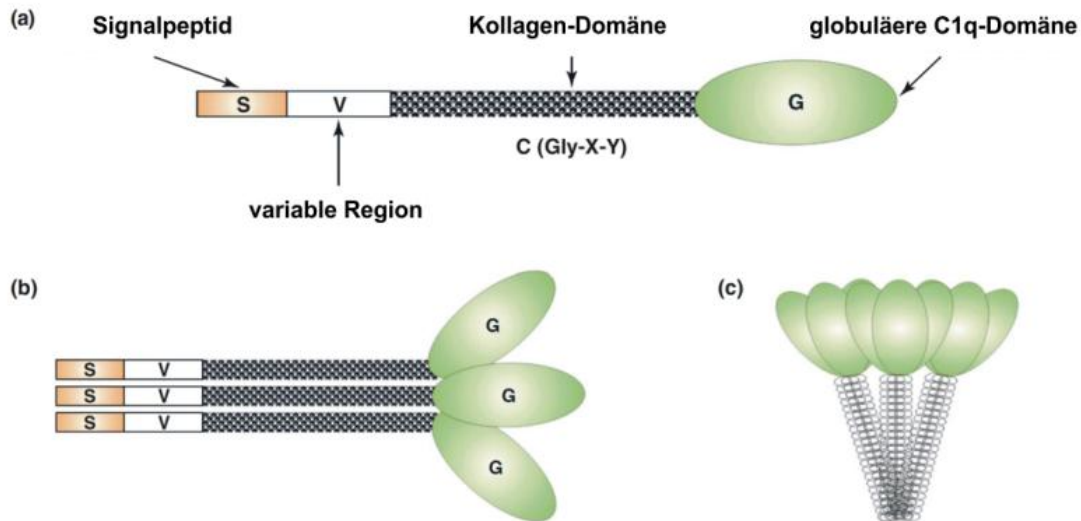


Abb. 3: Strukturelle Organisation der CTRPs. Modifiziert nach Schaeffler und Buechler, 2012.
 (a) Struktur eines CTRP-Monomers, (b) CTRP Proteinstruktur, Homotrimer
 (c) CTRP Proteinstruktur höherer Ordnung bzw. 3D Struktur, hier Nonamer bestehend aus neun Monomere

Bei Mäusen besitzt das CTRP9 mit einer Aminosäurehomologie von 51% die größte Analogie zum Adiponektin (Wong et al., 2009). Die Aminosäurehomologie innerhalb der CTRPs bemisst sich zwischen 27-73% (Wong et al., 2004). Über die Cysteinreste in den kollagenen Domänen bilden die CTRPs ihre Grundstruktur als Trimere. Da Adiponektin als auch die CTRPs als sezernierte Proteine angesehen werden, sind auch einige Mitglieder der CTRPs in der Lage Homooligomere und Heterooligomere mit CTRPs zu bilden oder sogar mit LMW-Adiponektin. CTRP2 und CTRP9 wurden als Heterooligomere mit Adiponektin beschrieben (Wong et al., 2008). Ein wesentlicher Unterschied zum Adiponektin ist jedoch, dass diese ein sehr breites Expressionsmuster aufweisen. So exprimiert das Fettgewebe nur CTRP1, 2, 3, 5, 7 und 9 in großen Mengen, wohingegen CTRP10 vermehrt im Auge, und CTRP6 am häufigsten in der Plazenta exprimiert wird (Wong et al., 2008 und 2009). Genauer betrachtet, wird Adiponektin in 20-fach höherer Konzentration von differenzierten Adipozyten als von stromavaskulären Zellen hergestellt. Gegensätzlich zum Adiponektin werden CTRP1, 2, 3, 5, und 7 primär von den stromavaskulären Zellen synthetisiert (Wong et al., 2008). Ein weiterer Unterschied ist, dass bei zwölf Wochen alten Leptin-defizienten ob/ob Mäusen eine deutliche Abnahme der Adiponektin-mRNA zu messen ist (Wong et al., 2009). Bei diesen Mäusen wurde eine erhöhte CTRP3-mRNA (Wong et al., 2008), CTRP6-mRNA (Peterson et al.,

2010) und CTRP13-mRNA gemessen (Wei et al., 2011). Weiter zeigte sich, dass bei Patienten mit Adipositas, Metabolischem Syndrom und KHK ein niedriger Adiponektinspiegel vorlag (Ziemke und Mantzoros, 2010).

In der Erstbeschreibung durch Wong et al. wurden zunächst sieben CTRPs (CTRP1-7) beschrieben. Mittlerweile zählt die Familie 15 Mitglieder (CTRP1-15), welche nach Struktur, Funktion und Expressionsverhalten unterschieden werden können. Hier soll nur kurz auf die CTRPs eingegangen werden, die auch im Rahmen dieser Dissertationsarbeit verwendet wurden.

CTRP1 wird vornehmlich vom Fettgewebe aber auch in geringeren Mengen von der Plazenta, dem Herz und der Leber exprimiert. In Adiponektin-Null Mäusen (=Adiponektin-Knockout-Mäuse) wurde ein erhöhter CTRP1-Spiegel detektiert (Wong et al., 2008). Die Expression von CTRP1 im Fettgewebe wird durch die proinflammatorischen Interleukine TNF- α und IL-1 β stimuliert (Kim et al., 2006). Seinerseits induziert es in der Nebennierenrinde die Aldosteronproduktion (Jun et al., 2008), führt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und nimmt somit Einfluss auf die Blutdruckregulation (Schrier 2006). Zudem schreibt Lasser et al. (2006) dem CTRP1 eine antithrombogene Wirkung zu.

CTRP2 besitzt die Fähigkeit heteromere Komplexe mit CTRP7 und Adiponektin zu bilden (Wong et al., 2008). CTRP2 führt zur Aktivierung der AMPK, der ACC und der p42/44 MAPK in Myotubes (Wong et al., 2004).

CTRP3, das auch unter *CORS-26*, *Cartducin* oder *cartonectin* bekannt ist, besitzt im humanen Gewebe zwei Isoformen: CTRP3A (40 kDa) und CTRP3B (32 kDa) (Maeda et al., 2001). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine antiinflammatorische Wirkung durch Hemmung der LPS- und Toll like-Rezeptor vermittelten Signalwege aufzeigen (Kopp et al., 2010; Compton und Cheatham, 2010).

CTRP5 wird neben der größten Expression im Fettgewebe u.a. auch in retinalen Pigmentepithel exprimiert (Ayyagari et al., 2005). Neben der Aktivierung der AMPK, der ACC und der GLUT4-Translokation (Park et al., 2009) konnte in einem Mausmodell durch eine miss-sense Mutation des CTRP5 (S163R) die autosomal dominante Late-onset Netzhaut Makula-Degeneration verursacht werden (Chavali et al., 2011).

CTRP6 bildet noch intrazellulär mit CTRP1 Heterotrimere (Schaeffler und Buechler, 2012). Ein gemeinsamer Entstehungsort bzw. ein gemeinsames Vorläufermolekül dieser beiden CTRPs könnte Grund für diese Komplexbildung sein. CTRP6 induziert die Expression des antiinflammatorischen IL-10 (Kim et al., 2010). Des Weiteren scheint

CTRP6 eine mutmaßlich genetische Rolle bei der Entstehung einer rheumatoiden Arthritis sowie bei Diabetes mellitus Typ 1 zu besitzen (Cooper et al., 2008; Wallis et al., 2009; Eyre et al., 2010).

CTRP7 wird hauptsächlich im Fett- und Lungengewebe exprimiert. In acht Wochen alten adipösen Mäusen wurde im Vergleich zu schlanken Mäusen eine erhöhte Expression von CTRP7 beschrieben (Wong et al., 2008).

CTRP9 hat mit 51% die höchste Aminosäurehomologie mit Adiponektin und wird folglich auch als das ähnlichste Adiponektin-Paralog gedeutet. CTRP9 wird vorwiegend im Fettgewebe, aber auch - in deutlich geringeren Mengen - im Herzen, in den Hoden, und in vielen anderen Organen exprimiert. CTRP9 ist in der Lage die AMPK, die Akt und die p42/44 MAPK in Myotubes zu aktivieren (Wong et al., 2009). Neuen Ergebnissen nach werden CTRP9 kardiale Effekte zugeschrieben. So soll es durch CTRP9 zu einer verbesserten Herzfunktion mit einer Reduzierung der Infarktnarbe (Su et al., 2013) und zu einer eNOS induzierten Vasodilatation kommen (Zheng et al., 2011).

CTRP10 wird nur in geringen Mengen im Fettgewebe, vielmehr im Gehirn, in Plazenta und im Auge exprimiert (Wong et al., 2008).

CTRP13 wiederum zeigt im humanen Fettgewebe die höchste Expression an und ist ähnlich wie viele Adipozytokine in weiblichen Mäusen vermehrt exprimiert. CTRP13 fördert die AMPK induzierte insulinabhängige Glukoseaufnahme im Fettgewebe und in Muskelzellen. Zudem bewirkt es eine Hemmung der hepatogenen Glukoneogenese und spielt eine Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz (Wei et al., 2011).

CTRP15 wird vornehmlich im Skelettmuskel exprimiert und wird begriffsnah auch *Myonectin* genannt. Es fördert die zelluläre Fettsäureaufnahme in Adipozyten und Hepatozyten und schafft eine Verknüpfung zwischen Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe in Sachen Fetthomöostase (Seldin et al., 2012).

Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters und der Zirkulation im Serum wird den CTRPs nicht nur eine parakrine oder autokrine Funktion zugeschrieben, sondern auch die eines endokrin wirkenden Hormons (Wong et al., 2009). Über welche Mechanismen und Signalkaskaden die oben aufgeführten Ergebnisse zustande kommen, ist nicht geklärt, da es gegenwärtig keine einheitliche Antwort auf die Rezeptorfrage der CTRPs gibt.

1.3 Ziel der Arbeit

In welchem Ausmaß die 2004 erstmalig beschriebenen Adiponektin-Paraloge bei den oben genannten und weiteren Pathomechanismen eine Rolle spielen, ist Gegenstand aktueller und zukünftiger Arbeiten.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung

1. des zellspezifischen Expressionsmusters von CTRPs im Herzen von Ratten
2. potentieller Einflussfaktoren Alter und kalorische Restriktion auf die kardiale Expression der CTRPs
3. des Einflusses ausgewählter CTRPs auf die Aktivierung von AMPK und ihrem downstream Target ACC
4. der Bedeutung der Adiponektin-Rezeptoren für die CTRP-induzierten Signalwege.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamidlösung	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carnitin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform, minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Collagenase	Biochrom AG, Berlin
Coomassie Brillant Blue G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Creatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cytodin- β -Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethyl sulfoxide (DMSO), $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM-Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching
dNTP-Mix	Fermentas
Ethanol	Riedel-deHaën, Seelze
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FBS	Biochrom AG, Berlin
Gel Red	Biotium, <i>Hayward – USA</i>
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GoTaq® DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199	Biochrom AG, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt

Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
peqGOLD TriFast	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Phosphataseinhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Primer (diverse)	Invitrogen, Karlsruhe
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze
siRNA	Qiagen, Hilden
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
Sodium chloride	Riedel-de Haën, Seelze
steriles Wasser	Braun, Melsungen
Taq®-Polymerase	Invitek, Berlin
Taurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethyldiamin (<i>TEMED</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trockenmilch	Milbona, Neckarsulm
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRI Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
X-Gal	AppliChem

2.2 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 1a und 1b aufgeführt.

primär Antikörper	Spezies	Hersteller	verwendete Verdünnung
ACC	Rabbit	Cell Signaling Technology	1:1.000
phospho - ACC (Ser79)	Rabbit		1:1.000
alpha - AMPK	Rabbit		1:1.000
phospho - AMPK (Thr 172)	Rabbit		1:1.000
GAPDH	Rabbit	Abcam, UK	1:2.000

Tab. 1a: Primäre Antikörper

sekundär Antikörper	Hersteller	verwendete Verdünnung
Anti - Rabbit IgG HRP – linked	Santa - Cruz Biotechnology	1:5.000

Tab. 1b: Sekundärer Antikörper

2.3 Primer

Die verwendeten Primer für die entsprechenden PCR-Fragmente sind in der nachfolgenden Übersicht aufgeführt (Tabelle 2).

Name des Primers	Sequenz	Fragmentlänge (bp)
AdipoR1	sense: TGTCTGTGAAGGACCAGCAG antisense: CTATCGCTGAGGGCTTTGTC	708
AdipoR2	sense: AGAGGGCAGCTCCTGTGATA antisense: TGGGAAGTTTTGTTCCTTGG	300
T-Cadherin	sense: ACGACAACGCTCCTGTCAT antisense: AGAGAGAAGAGCAGCAGCAAG	385
CTRP1	sense: ACGAGTTCAGGAGAACAACA antisense: GCAGGTAGGTCTCCTTCTGGT	544
CTRP2	sense: GGACCTAAGGGCAAGAAAGG antisense: GTAGTGGCCTCCCTCATTCA	162
CTRP5	sense: GTGCCCCACGATCAGCCTTC	431

	antisense: AGCGAAGACTGGGGAGCTGT	
CTRP6	sense: AGGTCAGGCCGTACATCAAC antisense: GTGCACATTGAGGCTGAAGA	341
CTRP7	sense: GGGATGGTAGAGATGGCAGA antisense: CCCTGTTGCAGGGTTGTAGT	362
CTRP9	sense: GGTGGCTTCTACTGGTTATGGA antisense: CTCTCCACGAATTCCATCCTT	199
CTRP12	sense: TGGAAGTCAAGGATTCCAGG antisense: CAGGGACGTATGACGGTGAC	230
CTRP13	sense: CATCCTCATCCCGGTGCT antisense: TTTGGGACCCTGGATGAAAG	171
CTRP15	sense: CGGAGTCTACTACCTGCCCCG antisense: TGGTGGTCCCTTTCTTGGCT	157
BNP	sense: GATCTCCAGAAGGTGCTGGG antisense: TGTAGGGCCTTGGTCCT	198
eNOS	sense: GAGCAGCTATTGGGTCAAGC antisense: AAGATTGCCTCGGTTTGTG	449
Fibronectin	sense: CCTGGAAGTCTACCAGTGCGACTCT antisense: CGTAGGCTGGTTCAGGCCTTCG	155
α1 Kollagen	sense: GGCCCTCCTGGCAAGAACGG antisense: GCAGACCTCGGGGACCCATCT	249

Tab. 2: Verwendete Primer.

2.4 siRNA

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete siRNA ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Protein: AdipoR1	siRNA
Sense Strang	5'-GGCUCUAUUACUCCUUCUATT-3'
Antisense Strang	5'-UAGAAGGAGUAAUAGAGCCAG-3'
Protein: AdipoR2	siRNA
Sense Strang	5'-AAAUUGGAUUACUCUGGUATT-3'
Antisense Strang	5'-UACCAGAGUAAUCCAAUUUAG-3'

Tab. 3: Verwendete siRNA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Versuchstiere:

Aus adulten drei bis sechs Monate alten Wistar-Ratten wurden Kardiomyozyten für die Versuche dieser Dissertation gewonnen. Die Ratten stammen aus eigener Züchtung des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Den Ratten standen Wasser und Nahrung jeder Zeit zur Verfügung. Für spezielle Fragestellungen wurden darüberhinaus ältere Ratten bzw. Ratten mit reduzierter Nahrungszufuhr verwendet.

3.1.2 Präparation isolierter Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Die Präparation der Rattenherzen und die Isolierung der Kardiomyozyten wurden nach Piper et al. (1982) durchgeführt. Die Langendorff-Perfusionsanlage wurde gespült und anschließend mit dem Powell-Medium (=Perfusionsmedium) luftblasenfrei gefüllt. Zuvor wurde das Powell-Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmt und um einen stabilen pH-Wert zu gewährleisten, kontinuierlich mit Carbogen begast. Nach einer kurzen mit 4-5% Isoflurannarkose wurde der Ratte das Genick gebrochen, der Thorax eröffnet, sowie Herz und Lunge entnommen. Das Herz wurde sauber von anhängenden Gewebe- und Organresten befreit und die Aorta freipräpariert. Über die freipräparierte Aorta ascendens wurde das Herz an die Perfusionskanüle der Langendorff-Perfusionsanlage angeschlossen. Mit ca. einem Tropfen pro Sekunde wurde das Blut aus dem Herz gespült. Danach wurde das Herz mit ca. 50 ml Perfusionslösung für 25-30 Minuten reperfundiert. Die Perfusionslösung besteht aus Perfusionsmedium und 20 mg Kollagenase

(chargenabhängig). Nach Beendigung der Reperfusion wurden Aorta und Vorhöfe abgetrennt und das Herz mittels Gewebehacker mit einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Der gewonnene Gewebepulver wurde in 30 ml Perfusionslösung überführt und für fünf Minuten im Wasserbad (37°C) nachverdaut. Durch vorsichtiges auf- und abpipettieren wurde die Trennung der einzelnen Zellen gefördert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und für drei Minuten bei 400 U/min zentrifugiert. Im Pellet befanden sich ausschließlich Kardiomyozyten; im Überstand befanden sich u.a. Endothelzellen und Fibroblasten. Im Anschluss folgten zwei Schritte von Zugabe von Perfusionsmedium mit ansteigender Kalziumchlorid-Konzentration (CaCl₂) (100 mM) und Zentrifugation. Der Überstand wurde jeweils verworfen, wodurch gewährleistet wurde, dass sich die Kardiomyozyten an die ansteigende Kalziumkonzentration gewöhnten. Das Pellet wurde anschließend in 50 ml Perfusionsmedium + 500 µl CaCl₂ (100 mM) überführt und für eine Minute bei 300 U/min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde der Überstand, in dem sich die Endothelzellen befanden, in ein anderes Röhrchen überführt und das Pellet mit den Kardiomyozyten im vorgewärmten Ausplattiermedium aufgenommen. Mit einer Zellpopulation von ca. 40-60% intakten stäbchenförmigen Kardiomyozyten konnten diese ausplattiert und die Versuche begonnen werden. Die Zellisolation wurde von Frau Daniela Schreiber durchgeführt.

3.1.3 Vorinkubation der Kulturschalen

Am Vortag der Präparation wurden die Kulturschalen (Falcon) mit dem Vorplattiermedium bei 37°C inkubiert, um ein maximales Anheften der isolierten Kardiomyozyten zu ermöglichen. Unmittelbar vor dem Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten wurde das Vorplattiermedium abgesaugt. Tabelle 4 gibt die Herstellung des Vor- und Ausplattiermediums (=Waschmedium), welche für jeden Versuch separat hergestellt wurden, wieder.

	Vorplattiermedium	Ausplattiermedium
CCT-Medium	x - ml	x - ml
Fetal calf serum (FCS)	4%	-
Penicillin 100 IE/ml	1%	1%
Streptomycin 100 µg/ml	1%	1%

Tab. 4: Herstellung vom Vor- und Ausplattiermedium.

Das CCT-Medium wurde, wie die folgende Tabelle zeigt hergestellt.

CCT-Medium	
M199/HEPES gepuffert	x - ml
Creatin 5 mM	5 mmol/l
Carnitin 2 mM	2 mmol/l
Taurin 5 mM	5 mmol/l
Cytodin- β - Arabinofuranosid	10 μ mol/l
pH 7,4 auf titriert und steril filtriert	

Tab. 5: Herstellung des CCT-Mediums.

3.1.4 Kultivierung und Ernte der Kardiomyozyten

Die isolierten Kardiomyozyten wurden vorsichtig in einer 37°C vorgewärmten Ausplattiermedium zu einer homogenen Suspension aufgenommen und gleichmäßig auf die vorbereiteten Kulturschalen ausplattiert. Die Präparationsqualität wurde unmittelbar nach dem Ausplattieren sowie nach dem ersten Waschvorgang mikroskopisch bewertet. Qualitätskriterien waren die Anzahl der stäbchenförmigen und spontankontrahierenden Kardiomyozyten. Das Anheften der vitalen Zellen am Boden der Kulturschalen wurde durch die folgende 90 bis 120-minütige Inkubation bei 37°C unter CO₂-freien Bedingungen erzielt. Anschließend wurden die Zellen mit Waschmedium gewaschen. Nachdem Waschen stand den nachfolgenden Versuchen ein Anteil von knapp 90% aus intakten, stäbchenförmigen Zellen zur Verfügung. War der Anteil der intakten und stäbchenförmigen Kardiomyozyten zu gering, wurden die Zellen verworfen.

Für die unterschiedlichen Versuchsvorhaben wurden die Kardiomyozyten nach den Waschungen einer 15-minütigen Ruhephase unterzogen, um die Zellen vor Stress zu schützen. Die Reagenzien wurden auf die Kulturschale gegeben und durch leichtes Schwenken im Kulturmedium verteilt, um so eine homogene Verteilung der Reagenzien und eine gleichmäßige Beimpfung der Zellen zu gewährleisten. Die Kulturschalen wurden anschließend im Brutschrank bei 37°C und unter normoxen Bedingungen mit der bestimmten Inkubationszeit inkubiert, bevor sie der Zellernte unterzogen wurden. Die Zellen wurden mit Zellschaber abgeschabt und in 1,5 ml Tube überführen.

3.1.5 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen und Fibroblasten

Durch die Präparation von Rattenherzen nach der Methode von Piper et al. konnten neben den Kardiomyozyten auch mikrovaskuläre Endothelzellen (kardiale Endothelzellen) und Fibroblasten gewonnen werden. Die Isolierung der mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte mithilfe immunomagnetischer Aufreinigung mit anti-CD31 Antikörper (Thermo Scientific). Es werden die Endothelzellen spezifisch gebunden und so mit den IgG-Maus-beads (Invitrogen) markiert. Die Endothelzellen wurden kultiviert und bei Erreichen der Konfluenz mit dem peqGOLD TriFast Reagenz geerntet. Die CD31-negativen Zellen (Fibroblasten) wurden ebenfalls ausplattiert und bei Erreichen der Konfluenz für die RNA-Isolation geerntet.

Neben den kardialen Fibroblasten konnten nichtkardiale Lungenfibroblasten aus der Ratte gewonnen werden. Für die Ernte und Extraktion von RNA aus Fibroblasten wurde ebenfalls peqGOLD TriFast Reagenz verwendet. Die aus den Endothelzellen und Fibroblasten gewonnene RNA wurde mir von der Arbeitsgruppe zur weiteren Verwendung bereitgestellt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transfektion mittels siRNA

3.2.1.1 Small interferenz RNA Transfektion mittels Lipofektion

Mithilfe von Liposomen wird genetisches Material in die Zelle befördert. Bei der Lipofektion binden die negativgeladenen DNA- bzw. RNA-Moleküle an die kationischen Lipide, welche die Wand des Liposoms bilden. Liposomen bieten den Vorteil sehr leicht mit der Zellmembran zu fusionieren und durch Endozytose ihren Inhalt in die Zelle freizugeben. Als Lipofektionsreagenz wurden Oligofectamine und Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) benutzt. Im Allgemeinen hängt die Transfektionseffizienz von einer Vielzahl von Parametern ab, wie das Mengenverhältnis von genetischem Material zur kationischen Komponente, dem Zelltyp und der Inkubationszeit.

3.2.1.2 Transfektion adulter Rattenkardiomyozyten

Adulte Kardiomyozyten wurden 90 Minuten nach dem Aussäen mit siRNA transfiziert. Dazu wurden die Transfektionsreagenzen Oligofectamine und Lipofectamine RNAiMAX bezüglich ihrer Effizienz und Toxizität getestet. Das vorhandene Nährmedium wurde aus der Schale abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen. Es wurde frisches, vorgewärmtes und antibiotikafreies CCT-Medium für den Transfektionsmix und für die Inkubation der Kardiomyozyten während der Transfektionszeit eingesetzt. Das Mengenverhältnis für den Transfektionsmix (bestehend aus siRNA, Transfektionsreagenz und CCT-Medium) ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Schalengröße	siRNA	Transfektionsreagenz	CCT-Medium
35 mm	1,5 µl	4 µl	add 500 µl
60 mm	3,0 µl	8 µl	add 500 µl

Tab. 6: Transfektionsansatz

Die transfizierten Zellen wurden im Brutschrank inkubiert. Sechs Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit Waschmedium. Die RNA Extraktion erfolgte i.d.R. nach ≥ 42 Stunden. Das Protokoll des Herstellers wurde modifiziert, da aus dem Protokoll keine Angaben für die Transfektion von adulten Kardiomyozyten hervorgingen. Die aufgeführten Werte wurden daher mittels Vorversuchen gewonnen.

In den Versuchen wurde zum Teil zusätzlich zu der Kontrollgruppe, die ohne siRNA behandelt wurden, eine Gruppe mit Kontroll-siRNA behandelt, um Zufälle auszuschließen und die Effektivität der eingesetzten spezifischen siRNA darzulegen. Die Kontroll-siRNA kodiert für eine gescrambelte shRNA Sequenz, die zu keinem spezifischen Abbau bekannter Säuger-mRNA führt. Der Erfolg der Transfektion wurde anhand eines Proteinnachweises durch Western Blot bzw. durch PCR bestätigt. Erst nach der Überprüfung der Transfektionseffizienz war es möglich, Ergebnisse von Folgeversuchen richtig zu interpretieren und zu verwerten.

3.2.2 RNA Analyse

3.2.2.1 Extraktion von RNA aus Zellkulturen

Für die Extraktion von RNA aus Kardiomyozyten wurde das Reagenz peqGOLD TriFast eingesetzt. Die Zellen wurden zuvor mit PBS gewaschen und direkt auf der

Zellkulturschale mit einem ml peqGOLD TriFast je 60 mm Kulturschale lysiert. Die abgeschabten Proben wurden in 1,5 ml Tubes überführt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Weiter wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben und erneut bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C wurde die Oberphase, welche die RNA enthält, in ein neues Tube mit 500 µl Isopropanolol transferiert. Im nächsten Schritt wurde durch Zentrifugieren bei 14000 rpm bei 4°C für 30 Minuten eine Fällung der RNA erzeugt. Das RNA-Pellet wurde kurz mit 75%igem Ethanol gewaschen und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet wurde für drei Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Im letzten Schritt wurde die isolierte RNA in 10 µl DEPC-Wasser überführt und durch Inkubation bei -80°C gelöst. Die so gewonnene RNA wurde isoliert und bis zur Verwendung in den Experimenten bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte im Photometer durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Das Verhältnis 260/280 ist der Reinheitskoeffizient und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen (Ausubel, 1987). Dies konnte auch für die hier durchgeführten Experimente gewährleistet werden.

3.2.2.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Das Ziel einer Polymerase-Kettenreaktion ist die enzymatische Amplifikation von einer Ziel-DNA. Die RT-PCR besteht aus zwei unabhängigen Reaktionen. Zuvor muss die RNA mithilfe der reversen Transkriptase in eine einzelsträngige cDNA generiert werden. Anschließend erfolgt die Standard-PCR zur Vervielfältigung dieser spezifischen cDNA Sequenz.

Im ersten Schritt eines Zyklus werden durch Erhitzen (Denaturierung) die Doppelstränge der Ziel-DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Durch die Anlagerung (Annealing) zweier Primer, die auf den gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Ziel-DNA flankieren, kann im letzten Schritt die Amplifikation (Elongation) erfolgen. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Zyklus kann die DNA Menge exponentiell vervielfacht werden. Bei jedem Reaktionsansatz wird zusätzlich ein Leerwert, der statt der DNA steriles Wasser enthält, mitgeführt, um mögliche Kontaminationen während der Verarbeitung und der verwendeten Reagenzien auszuschließen.

Um die nachfolgenden PCR Experimente zu standardisieren, wurden stets gleiche Mengen an RNA (100 ng/ μ l) zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach folgenden Reaktionsansätzen, wie in Tabelle 7a dargelegt.

1. Reaktionsansatz - 1x	10 μl
RNA (100ng/ μ l)	x μ l
DEPC-H ₂ O	10 – x μ l

Tab. 7a: 1. Reaktionsansatz für cDNA-Synthese.

Dieser Ansatz wurde bei 72°C für drei Minuten inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 15 μ l des 2. Reaktionsansatzes (siehe Tabelle 7b).

2. Reaktionsansatz - 1x	15 μl
5x RT-Puffer	5 μ l
dNTPs (12,5 mM)	1 μ l
Random Primer (1:100)	3 μ l
RNase Out Inhibitor	0,25 μ l
Reverse Transkriptase	0,25 μ l
DEPC-H ₂ O	5,5 μ l

Tab. 7b: 2. Reaktionsansatz für cDNA-Synthese.

Der Ansatz wurde bei 42°C für 30 Minuten inkubiert. Durch die darauffolgende Inkubation bei 95°C für eine Minute wurde die reverse Transkriptase inaktiviert, bevor der Ansatz abschließend auf 4°C abgekühlt wurde. Die fertig hergestellte cDNA wurde mit sterilem Wasser 1:1 verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.2.4 Standard-PCR

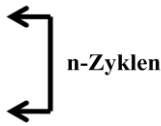
Die eingesetzten Primer, Enzyme und Reagenzien sind im Materialteil verzeichnet. Mit der Durchführung von Vorversuchen mit einem Gradientencycler (Biometra) wurden für die jeweiligen PCR Produkte separat die geeigneten Zyklenzahl und Annealing-Temperaturen ermittelt (Daten hier nicht aufgeführt). Nachdem Zyklenzahl und Annealing-Temperaturen für das jeweilige PCR Produkt feststanden, wurden die Reaktionsansätze der Standard-PCR wie in Tabelle 8 angesetzt.

Standard-PCR 18S - 1x	27 μ l	Standard-PCR - 1x	25 μ l
steriles H ₂ O	11,75 μ l	steriles H ₂ O	12,38 μ l
5x Puffer	5 μ l	Green GoTaq Puffer	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	2 μ l	MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ l
dNTPs (100 μ M)	3 μ l	dNTPs (100 μ M)	3,0 μ l
sense Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l	sense Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
antisense Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l	antisense Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Mango-Taq	0,25 μ l	GoTaq Polymerase	0,3 μ l
RT	2 μ l	cDNA	2,0 μ l
cDNA	2 μ l		

Tab. 8: Ansatz für Standard-PCR und 18S.

Tabelle 9 zeigt die Schritte der Standard-PCR, die im T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt wurden, wobei Zyklenzahl (n) und Annealing-Temperaturen variiert haben.

PCR-Standardprogramm	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Annealing	60°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec
finale Elongation	72°C	2 min



Tab.9: PCR-Schritte.

3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren (DNA und RNA) können entsprechend ihrer Größe in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden, da die negativen Phosphatreste im DNA-Rückgrat im elektrischen Feld wandern können. Kleine DNA Stränge wandern schneller zur Anode der Gelkammer. Für die Identifizierung der PCR-Produkte wurde hier ein 1% Agarosegel angesetzt. Nach Abkühlen auf dem Schüttler wurde 1:50000 μ l GelRED zugesetzt und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Die PCR-Produkte wurden nach dem Auspolymerisieren des Gels aufgetragen und bei 70 Volt nach ihrer Größe aufgetrennt. Bei der Identifizierung der ribosomalen 18S Untereinheit wurden vor dem Auftragen 5 μ l Probenpuffer hinzugefügt. Als Größenmarker wurden 3 μ l GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas) verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde unter UV-Licht mithilfe des Biometra BioDocAnalyse visualisiert und dokumentiert.

3.2.3 Protein

3.2.3.1 Extraktion von Proteinen aus Zellen

Für Proteinanalysen wurden die Kardiomyozyten vor dem Ernten ein Mal mit kaltem PBS gewaschen. Geerntet wurden die Zellen auf Eis mit 100 µl (35 mm Schalen) SDS-Lysepuffer + Proteaseinhibitor (1:500) + Phosphataseinhibitor (1:200). Mithilfe eines Zellschabers wurde das Zelllysate zusammengekratzt und in Tubs überführt und auf Eis gelegt und bei -80°C eingefroren. Erfolgte am selben Tag die Messung der Proteinkonzentration mit dem BSA Protein Assay Kit (Pierce), wurden die Zellsuspensionen mit Ultraschall behandelt, um mechanisch an die Zellinhalte zu gelangen. Anschließend wurden durch Zentrifugation unlösliche Membran- und Zellwandbestandteile vom Proteinlysate entfernt. Um das gewonnene Proteinlysate für weitere Versuche zu verwenden, wurden Proteinliquots mit identischer Proteinmenge unter der Gabe von 6x SDS-Pufferhergestellt.

3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Als analytische Methode zum Nachweis und zur Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Transferieren (*blotten*) der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran gewählt.

Für die Elektrophorese wurde ein 10% Polyacrylamid-Trenngel in die Gelapparatur (Bio-Rad Mini Protein II Gel Apparatur, Fa. Bio-Rad) gegossen und mit 200 µl Isopropanol überschichtet, um die Luftblasen aus dem Gel zu befreien. Je niedriger die Konzentration des Gels ist, desto besser können größere Proteine aufgetrennt werden. Aus diesem Grund wurde für das Detektieren der ACC und pACC, die ca. 250 kDa groß sind, ein 5% Polyacrylamid-Trenngel benutzt. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol ausgewaschen, das Sammelgel darüber gegossen und die benötigten Kämme eingeführt. Während dieser Zeit erfolgte die Denaturierung der Proteinproben bei 95°C für fünf Minuten. Abhängig von der Fragestellung wurden unterschiedliche Mengen an Protein (i.d.R. 10-35 µg) aufgetragen. Mit ebenfalls aufgetragenen Größenmarkern–PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus SM 1811 (Fermentas)– konnte das Molekulargewicht der aufgetragenen Proteine zugeordnet werden. Das Durchlaufen der Proteine durch das Sammelgel erfolgte bei 80 V in ca. 30 Minuten. Anschließend fand die Auftrennung bei 140 V im Laufpuffer (vgl. Tabelle 11) statt, welche ca. 90 Minuten dauerte. Im elektrischen Feld wandern Proteine unterschiedlich schnell zur Anode,

sodass die kleinen Proteine schneller zur Anode gelangen. Sobald die Lauffront das Gelende erreichte, wurde die Elektrophorese beendet. Für das Detektieren größerer Proteine (hier z.B. ACC/pACC), wurde indessen die Elektrophorese noch weitere 30-45Minuten fortgeführt. Tabelle 10 zeigt die genaue Zusammensetzung der verwendeten Gele.

	Trenngel		Sammelgel
Konzentration	5%	10%	
steriles H ₂ O	5,80 ml	4,30 ml	2,95 ml
Laufgelpuffer (1 M Tris, pH 6,8)	4,50 ml	4,50 ml	-
Sammelgelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	-	-	0,5 ml
40% Acrylamid	1,50 ml	3,00 ml	0,5 ml
10% SDS	120 µl	120 µl	40 µg
10x APS	100 µl	100 µl	25 µg
TEMED	10 µl	10 µl	5 µg

Tab. 10: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

3.2.3.3 Western Blot

Der Transfer (*blotting*), der nach Größe getrennten Proteine aus dem Polyacrylamid-Trenngel auf eine Transfermembran (hier Nitrozellulosemembran), geschah bei 120 V über eine Stunde. Zur Herstellung des *Blotsandwiches* wurden zwei Schwämme, sechs Whatman-Filterpapierstücke und eine Transfermembran im Blotpuffer (vgl. Tabelle 11) getränkt. Nach Ende der Gelelektrophorese wurde das Gel von der Glasplatte gelöst und ein Stapel (*Blotsandwiches*) aus: Kathode | Schwamm | 3×Filterpapier | Gel | Transfermembran | 3× Filterpapier | Schwamm | Anode zusammengesetzt. Mit einer Glaspipette walzt man ohne Manipulation den Stapel luftblasenfrei und platziert ihn in die Gelkassette. Dieses wird in die Transferkammer eingesetzt, die mit Blotpuffer aufgefüllt wird.

TBS-T	250 mM Tris 100 mM NaCl 0,2% Tween 20 add H ₂ O
Blotpuffer	250 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol add H ₂ O
Laufpuffer 10x	250 mM Tris 35 mM SDS 192 mM Glycin add H ₂ O

Tab. 11: Ansatz für TBS-T, Lauf- und Blotpuffer.

Mithilfe der Ponceau-Färbung (0,5 g Ponceau S + 1% Essigsäure + dest. H₂O) konnten Proteinbanden gefärbt werden und so die Membran abhängig von der Fragestellung geschnitten werden. Ausgewaschen wurde die Ponceau-Färbung mit dest. H₂O.

Die Membran wurde im Anschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer 5% Trockenmilch-Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe Antikörperliste im Materialteil) über Nacht bei 4°C. Tabelle 12 zeigt die Herstellung des primären und sekundären Antikörpers.

primärer AK	sekundärer AK
Trockenmilch 2,5% 1 x TBS-T 0,01% Natriumazid + prim. Antikörper	Trockenmilch 2,5% 1 x TBS-T + sek. Antikörper

Tab. 12: Herstellung des primären und sekundären Antikörpers.

Am Folgetag wurde nach dreimaligem Waschen (10 Minuten) der Nitrozellulosemembran mit 1x TBS-T, diese mit dem Meerrettichperoxidase (horseradishperoxidase, HRP) konjugierten sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Membran wurde anschließend wieder drei Mal mit 1x TBS-T gewaschen und anschließend mit frischhergestellter ECL-Lösung (Enhanced Chemoluminescence) beschichtet. Tabelle 13 fasst die Herstellung der ECL-Lösung zusammen.

ECL-Lösung	
Tris HCL (100 mM; pH 8,5)	10,00 ml
H ₂ O ₂ (0,009%)	3 µl
Luminol (1,25 mM)	50 µl
Cumarsäure (0,225 mM)	25 µl

Tab. 13: Herstellung der ECL-Lösung.

Bei der Enhanced Chemilumineszenz handelt es sich um eine Methode bei der durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlungen ausgesendet werden. Die Peroxidase-reaktion begann innerhalb einer Minute, wobei die abgegebene Chemilumineszenz in einer Dunkelkammer (Fusion FX7 - Peqlab, Erlangen) detektiert wurde.

3.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der experimentell erhobenen Werte erfolgte mittels t-Test bzw. One Way ANOVA im Statistikprogramm SigmaStat Version 3.5. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung ausgewiesen. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsmuster der CTRP mRNA

CTRPs haben im Vergleich zum Adiponektin ein sehr weites Spektrum an Expressionsorten (Wong et al., 2008). Deshalb sollten diese Versuche dazu dienen, das zellspezifische mRNA-Expressionsmuster ausgewählter CTRPs in Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und anschließend speziell im kardialen Gewebe näher zu untersuchen. Die in 4.1 verwendeten Zellen und die daraus gewonnene RNA stammten aus drei Monate alten Ratten. Als generelle Expressionsdarstellung von CTRPs in Herzmuskelzellen (= „Positivkontrolle“) wurde linker Ventrikel aus adulten Ratten und neonatale Rattenkardiomyozyten genommen. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle verwendet, in der steriles Wasser anstelle der cDNA dazugegeben wurde. Die in diesem Kapitel vorliegenden Ergebnisse wurden mittels RT-PCR Ergebnisse erzielt.

4.1.1 mRNA-Expressionsmuster der CTRPs in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten

Für die Kardiomyozyten wurde BNP (Brain Natriuretic Peptide), für Endothelzellen eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) und für Fibroblasten α 1-Kollagen und Fibronectin als charakteristischer Zellmarker benutzt. Als *housekeeping gene* (konstitutiv exprimiertes Gen) wurde 18S rRNA verwendet.

In Abbildung 4 sind alle Ergebnisse dieser Versuchsreihe in einer übersichtlichen Darstellung zusammengefasst.

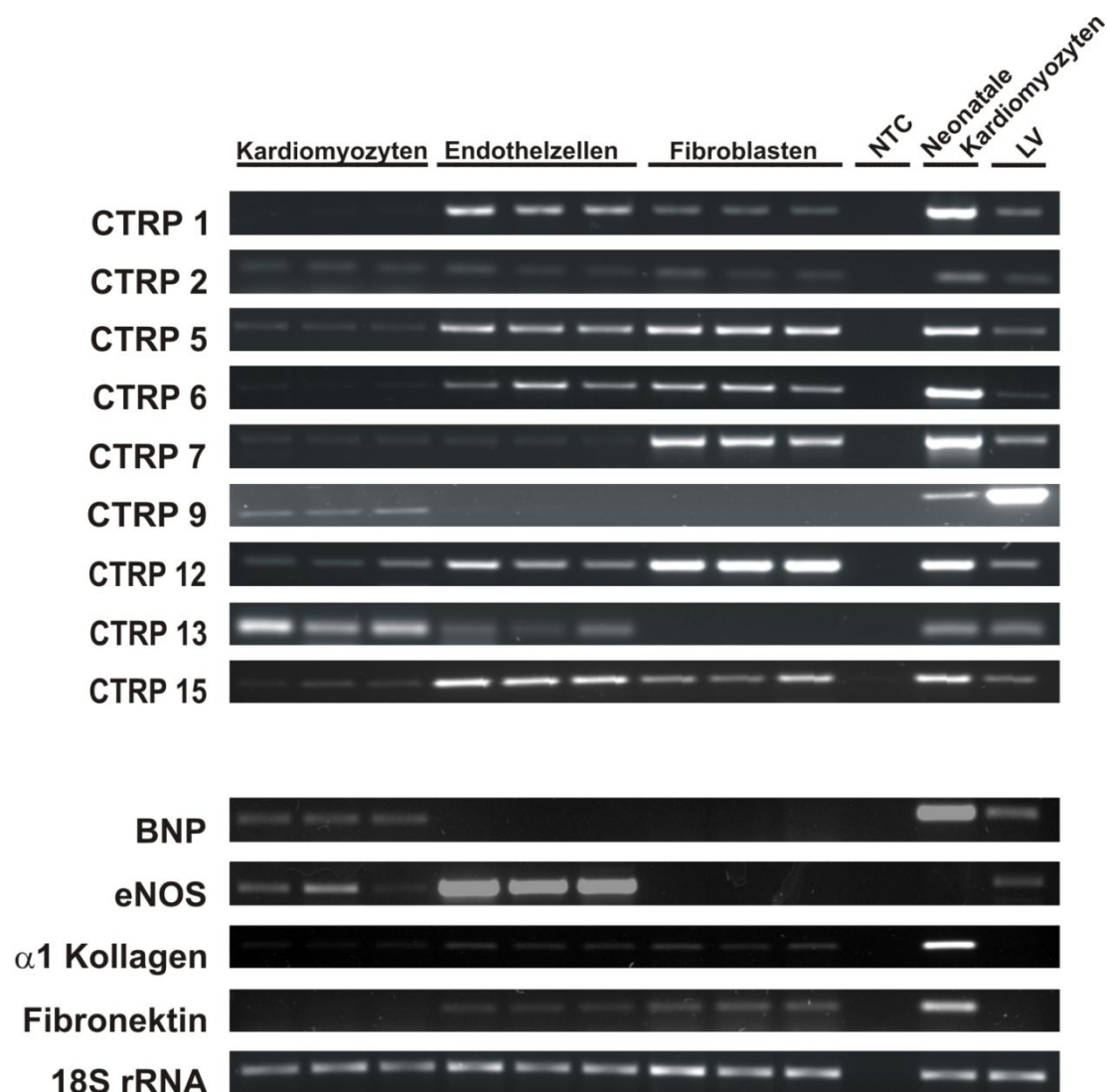


Abb. 4: CTRP mRNA-Expression in isolierten Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten aus drei Monate alten Ratten.

NTC: no template control; LV: linker Ventrikel; BNP: Brain Natriuretic Peptide, eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Der Abbildung 4 ist zu entnehmen, dass in den Kardiomyozyten vorwiegend CTRP9-, 12-, 13- und 15-mRNA exprimiert wird, wobei CTRP9 und 13 die höchste Expression aufzeigen. Die CTRP9 mRNA-Expression im Herzen scheint allein auf das Vorkommen in den Kardiomyozyten zurückgeführt werden zu können.

Endothelzellen exprimieren vorwiegend CTRP1-, 5-, 6-, 12- und 15-mRNA. Diese mRNA-Expression von CTRP1 und 15 in Endothelzellen ist deutlich stärker als in Kardiomyozyten und Fibroblasten.

In Fibroblasten werden nahezu alle hier untersuchten CTRPs exprimiert. CTRP5-, 6-, 7- und 12-mRNA ist in den Fibroblasten wesentlich stärker vorhanden als dies bei CTRP1 und 2 der Fall ist. Eine mRNA-Expression von CTRP9 und 13 scheint hierbei kaum vorhanden zu sein.

4.1.2 Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die CTRP mRNA-Expression im kardialen Gewebe von Ratten

In verschiedenen epidemiologischen Studien konnte dem Adiponektin kardioprotektive Effekte zugeschrieben werden. Ein verringerter Adiponektinspiegel wurde u.a. bei Männern mit einer vermehrten viszeralen Adipositas gemessen (Yatagai et al., 2003). Der Einfluss des Alters auf die Adiponektin-Serumkonzentrationen wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird behauptet, dass das Alter keinen Einfluss hat (Spranger et al., 2003) und auf der anderen Seite wird in der *Funagata Studie* eine positive Korrelation zwischen Alter und Adiponektinspiegel beschrieben (Daimon et al., 2003).

Um zu untersuchen, ob die Expression von CTRPs sich bei bestehen bzw. nicht bestehen von kardiovaskulären Risikofaktoren ändert, wurde in dieser Arbeit die zellspezifische Expression der CTRPs im kardialen Gewebe untersucht. Von den in 4.1.1 gewonnenen Ergebnissen wurde die mRNA-Expression verschiedener CTRPs in den entsprechend hoch exprimierenden Zelltypen weiter erforscht.

Hier wurde die CTRP mRNA-Expression in Abhängigkeit von Alter und Diät in den entsprechenden Zelltypen isoliert betrachtet. Die Diät wurde durch eine 30%ige Reduktion der kalorischen Nahrungsaufnahme für drei Monate durchgeführt. Die sechs Monate alten Ratten wurden als *jung*, und die 27 Monate alten Ratten als *alt* definiert.

Für kardiale Fibroblasten wurden CTRP5 und 7, für kardiale Endothelzellen CTRP1, 5, 9 sowie 13 und für Kardiomyozyten CTRP2, 9 und 13 analysiert.

4.1.2.1 Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die mRNA-Expression von CTRPs in kardialen Myozyten

Die CTRP2-mRNA-Expression in Kardiomyozyten zeigte (siehe Abbildung 5) über die drei Gruppen hinweg keinen Unterschied. Auffällig ist allerdings, dass sich die mRNA-Expression von CTRP9 in den alten Ratten im Vergleich zu den jungen Ratten ohne kalorische Restriktion signifikant verringert.

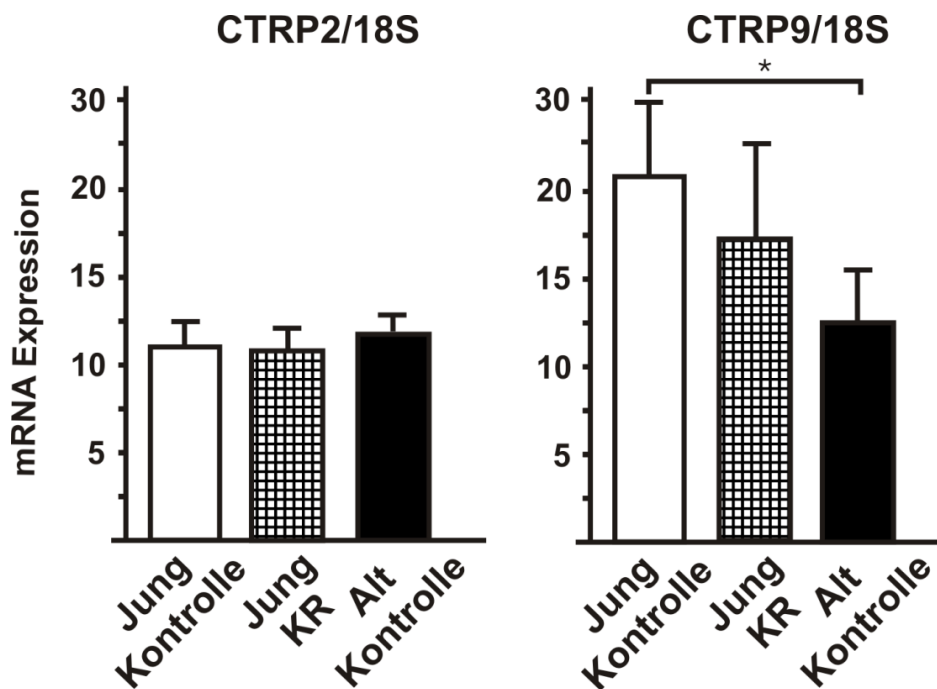


Abb. 5: CTRP2- und 9-mRNA-Expression in Rattenkardiomyozyten.

Jung Kontrolle = 6 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

Jung KR = 6 Monate alte Ratten mit 3 Monate 30% weniger kalorischer Zufuhr.

Alt Kontrolle = 27 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

n=6 pro Gruppe; * = p<0,05.

CTRP13 hingegen zeigt (Abbildung 6) in seinem mRNA-Expressionsverhalten keinen Unterschied in Kardiomyozyten zwischen jungen mit und ohne kalorischer Restriktion und alten Ratten. Somit scheint, wie auch bei CTRP2, das Alter und die kalorische Restriktion keinen Einfluss auf die CTRP13 mRNA-Expression in Kardiomyozyten von Ratten zu haben.

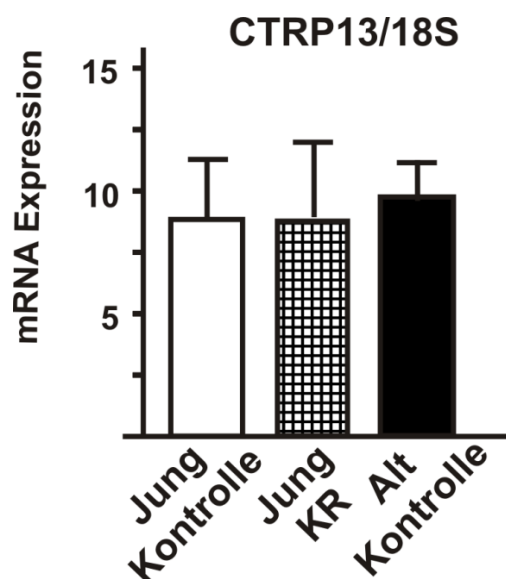


Abb. 6: CTRP13-mRNA-Expression in Rattenkardiomyozyten.

Jung Kontrolle = 6 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

Jung KR = 6 Monate alte Ratten mit 3 Monate 30% weniger kalorischer Zufuhr.

Alt Kontrolle = 27 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

n=6 pro Gruppe.

4.1.2.2 Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die mRNA-Expression von CTRPs in kardialen Endothelzellen

Des Weiteren wurde das mRNA-Expressionsverhalten von CTRP1, 5, 9 und 13 in kardialen Endothelzellen untersucht.

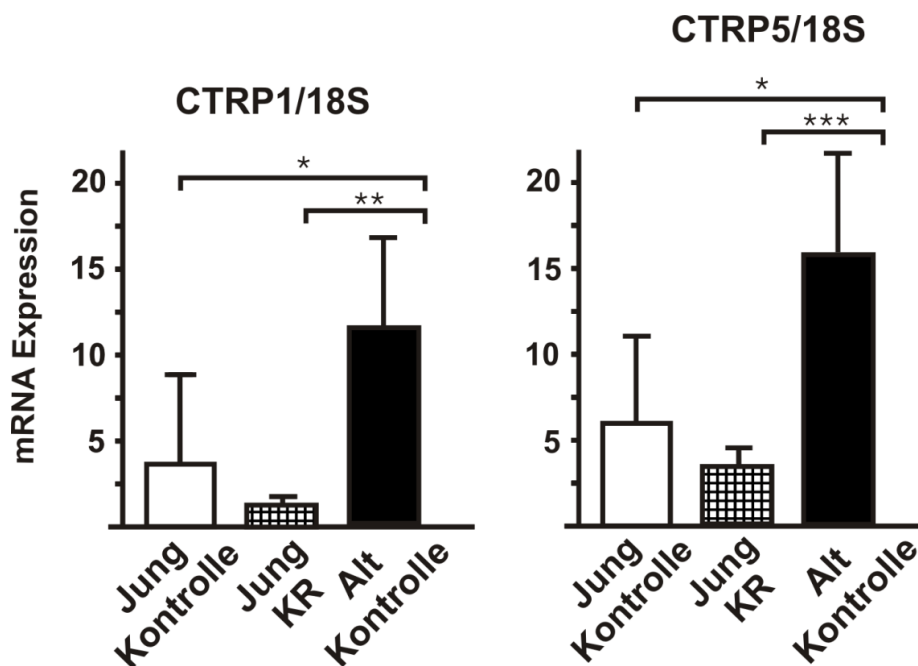


Abb. 7: CTRP1- und 5-mRNA-Expression in Rattenendothelzellen.

Jung Kontrolle = 6 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

Jung KR = 6 Monate alte Ratten mit 3 Monate 30% weniger kalorischer Zufuhr.

Alt Kontrolle = 27 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

n=6 pro Gruppe; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Der Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass die mRNA-Expression von CTRP1 in den alten Ratten im Vergleich zu den jungen Ratten sowie zu den jungen Ratten mit kalorischer Restriktion deutlich erhöht ist.

Ein ähnliches Expressionsmuster sieht man auch bei der CTRP5-mRNA-Expression in den kardialen Endothelzellen. Der deutliche Unterschied zwischen den alten und jungen Ratten liegt statistisch bei $p < 0,001$.

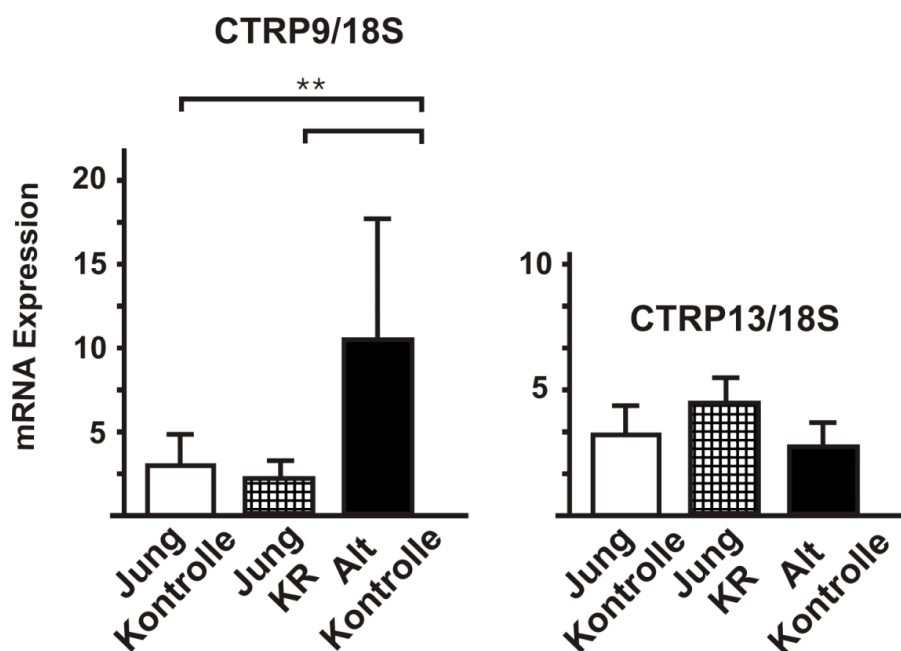


Abb. 8: CTRP9- und 13-mRNA-Expression in Rattenendothelzellen.

Jung Kontrolle = 6 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

Jung KR = 6 Monate alte Ratten mit 3 Monate 30% weniger kalorischer Zufuhr.

Alt Kontrolle = 27 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

n=6 pro Gruppe; ** = $p < 0,01$.

Auch bei CTRP9 findet sich ein sehr ähnliches Expressionsmuster in den kardialen Endothelzellen. Im Vergleich zu den Endothelzellen von jungen Tieren mit oder ohne kalorische Restriktion ist die Expression im Alter deutlich erhöht.

CTR13 zeigt als einziges der hier untersuchten CTRPs in den kardialen Endothelzellen keine Unterschiede im Expressionsverhalten innerhalb der Gruppen.

4.1.2.3 Einfluss der kalorischen Restriktion und des Alters auf die mRNA-Expression von CTRPs in kardialen Fibroblasten

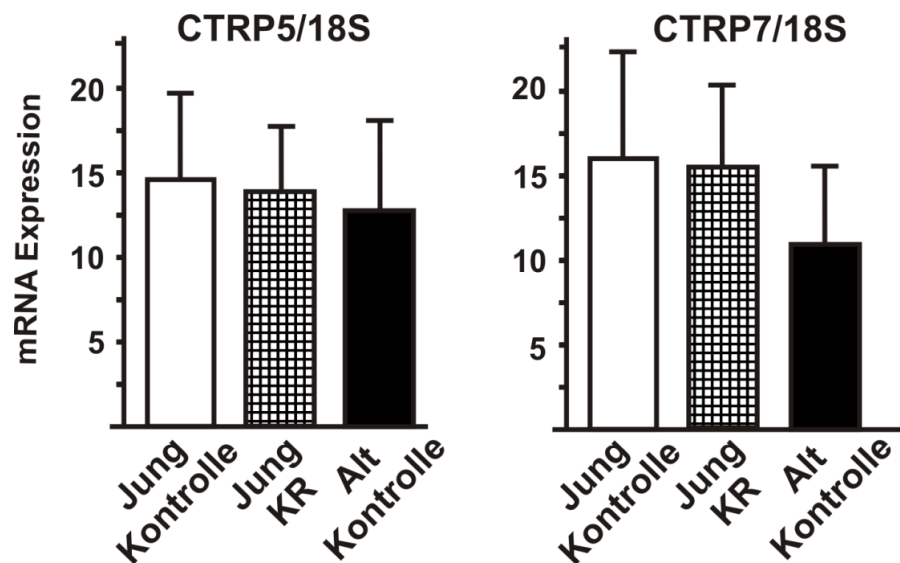


Abb. 9: CTRP5- und 7-mRNA-Expression in Rattenfibroblasten.

Jung Kontrolle = 6 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

Jung KR = 6 Monate alte Ratten mit 3 Monate 30% weniger kalorischer Zufuhr.

Alt Kontrolle = 27 Monate alte Ratten mit normaler kalorischer Zufuhr.

n=6 pro Gruppe.

In den kardialen Fibroblasten (Abbildung 9) sieht man zwischen den Gruppen weder bei der CTRP5 – noch bei der CTRP7-mRNA-Expression wesentliche Unterschiede.

Daraus lässt sich schließen, dass weder das Alter, noch solch eine kalorische Restriktion Einfluss auf das mRNA-Expressionsverhalten von CTRP5 und 7 haben.

4.2 Expressionsmuster von Adiponektin-Rezeptor 1-, 2- und T-Cadherin-mRNA in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten

Das Vorkommen von AdipoR1 und AdipoR2 wurde sowohl im Vorhofmyokard (Piñeiro et al., 2005) als auch im Ventrikelmuskel von Ratten beschrieben (Ding et al., 2007). Ziel dieser Versuche war es, die Expression der beiden Rezeptoren innerhalb der drei gewählten Zellarten näher zu betrachten. Zusätzlich zu AdipoR1 und AdipoR2 wurde auch T-Cadherin untersucht, welches als Adiponektin Korezeptor fungiert und in glatter Muskulatur und Endothelzellen beschrieben wurde (Kadowaki et al., 2005; Hug et al., 2004). T-Cadherin wird mit einem Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Membran

gebunden. T-Cadherin besitzt keine intrazelluläre Domäne und kann somit auch keine intrazelluläre Signalkaskade direkt aktivieren (Yamauchi et al., 2003).

Die folgenden Abbildungen 10-12 zeigen die Expression oben genannter Rezeptoren in Kardiomyozyten, in Endothelzellen sowie in Fibroblasten aus drei Monate alten Ratten.

Der AdipoR1 ist auf mRNA-Ebene sowohl in Kardiomyozyten als auch in Endothelzellen ($p < 0,001$) stärker exprimiert als in Fibroblasten. Im Expressionsverhalten zwischen Endothelzellen und Kardiomyozyten ist ein nur sehr geringer Unterschied zu erkennen.

Der AdipoR2 ist auf mRNA-Ebene in Endothelzellen stärker als in Kardiomyozyten und Fibroblasten exprimiert, wobei Fibroblasten nahezu gleich viel AdipoR2 exprimieren wie Kardiomyozyten.

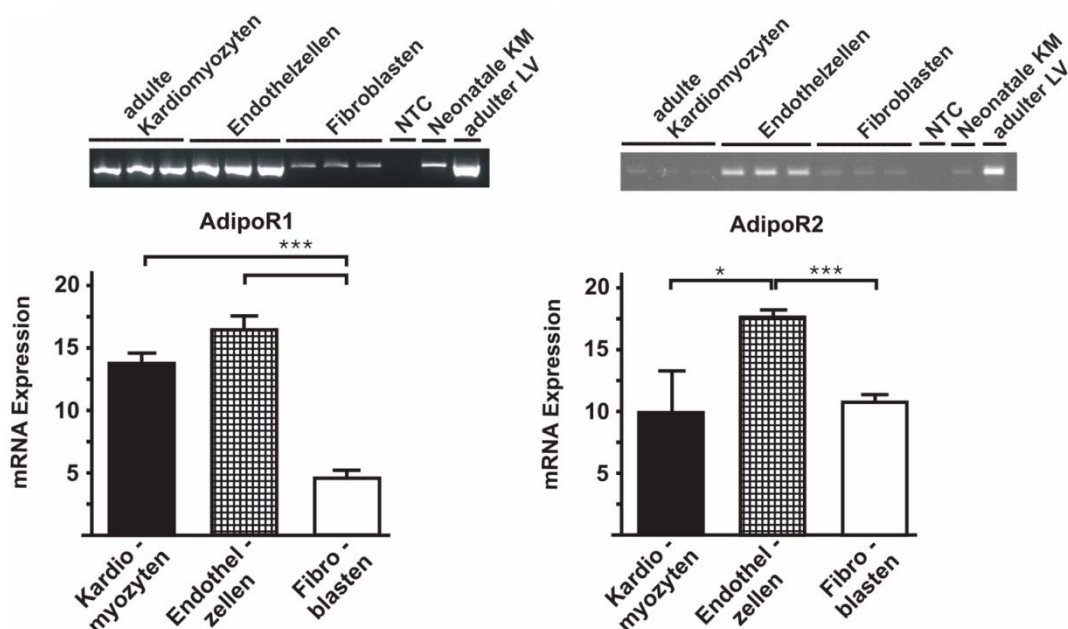


Abb. 10+11: AdipoR1- und AdipoR2-mRNA-Expression in isolierten Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten aus drei Monate alten Ratten.

NTC: no template control; neonatale KM: neonatale Kardiomyozyten; LV: linker Ventrikel.

n=3 pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 3 verschiedenen Herzen; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Die mRNA-Expression von T-Cadherin ist in Endothelzellen im Vergleich zu den Kardiomyozyten und Fibroblasten um das Vierfache erhöht. Ähnlich wie bei AdipoR2, ist auch hier die Expression von T-Cadherin in Kardiomyozyten und in Fibroblasten annähernd gleich groß.

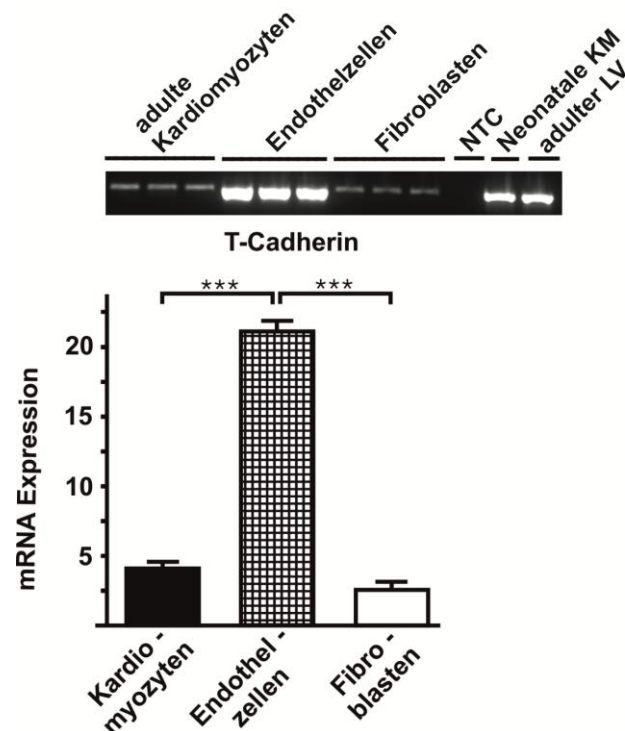


Abb. 12: T-Cadherin-mRNA-Expression in isolierten Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten aus drei Monate alten Ratten.

NTC: no template control; neonatale KM: neonatale Kardiomyozyten; LV: linker Ventrikel. n=3 pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 3 verschiedenen Herzen; *** = $p < 0,001$.

4.3 CTRP-induzierte Aktivierung der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) in adulten Rattenkardiomyozyten

In diesen Versuchen sollte zum einen herausgefunden werden, ob es zur Phosphorylierung der AMPK und ACC in adulten Rattenkardiomyozyten durch CTRPs kommt. Zum anderen sollte die Zeit- und die Konzentrationsabhängigkeit dieser Phosphorylierung untersucht werden.

4.3.1 AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-Stimulierung durch CTRPs in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer

Es wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, dass einige CTRPs in der Lage sind, die AMPK zu aktivieren (Wong et al., 2004; Kambara et al., 2012). Für CTRP1, 2, 7 und 9 wurde dieser Effekt bereits in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Rohrbach in adulten Kardiomyozyten nachgewiesen. Dieser mögliche Effekt sollte im

Rahmen dieser Arbeit bei CTRP3, 6 und 10 in adulten Kardiomyozyten ebenfalls untersucht werden.

Die adulten Kardiomyozyten wurden nach einem festen Zeitschema: 5-, 10-, 20-, 40-, 80 Minuten und 24 Stunden lang mit den entsprechenden CTRPs stimuliert. Der Phosphorylierungsgrad der AMPK wurde mittels Western Blot untersucht. Nachgewiesen wurde diese Aktivierung mit einem spezifischen Antikörper, der die phosphorylierte Form an der Aminosäure Thr172 detektiert.

Die Proben eines Experiments wurden auf zwei SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und anschließend auf jeweils eine Nitrozellulose Membran übertragen. Um die Proben beider Membranen miteinander zu verrechnen, wurde auf jeder Membran exakt gleichviel eines Abgleichproteins aufgetragen. Mit dem Quotienten dieser Probe konnten beide Nitrozellulose Membranen miteinander verglichen werden.

Bei Stimulierung mit CTRP3 (4 $\mu\text{g/ml}$) zeigt sich bei einer Inkubationszeit für 5, 10 und 40 Minuten und bei 24 Stunden eine Aktivierung der AMPK. Die Kurzzeitstimulierung scheint die deutlichste Aktivierung zu induzieren.

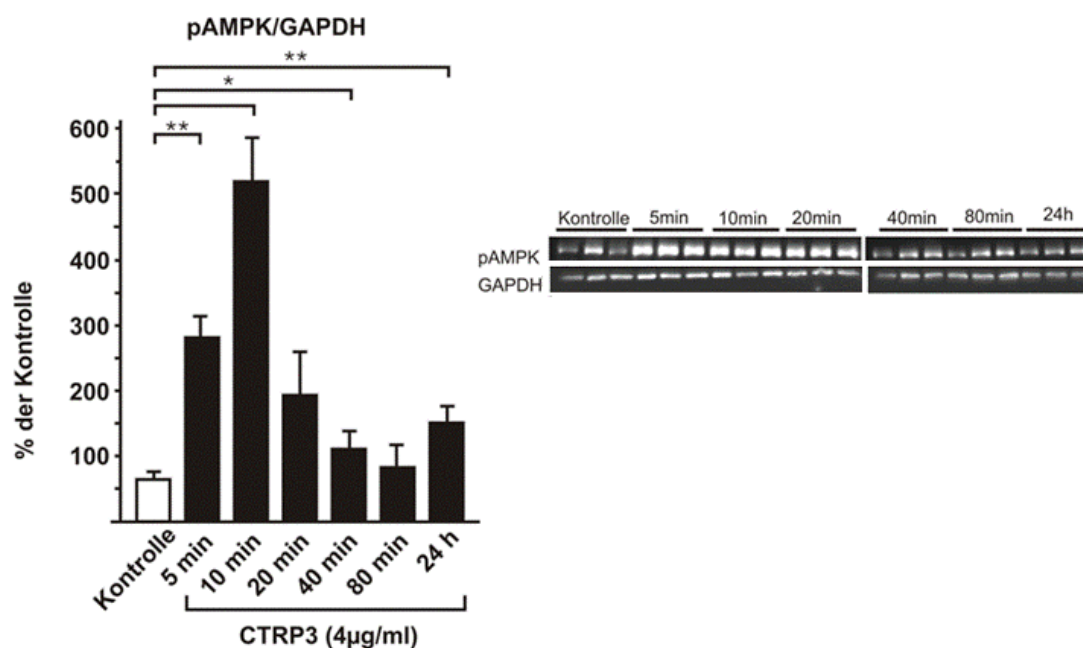


Abb. 13: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP3 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=6$ pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Auch bei CTRP6 (4 $\mu\text{g/ml}$) ist eine statistisch signifikante Aktivierung der AMPK durch eine Kurzzeitstimulierung nach 10 und 20 Minuten zu verzeichnen.

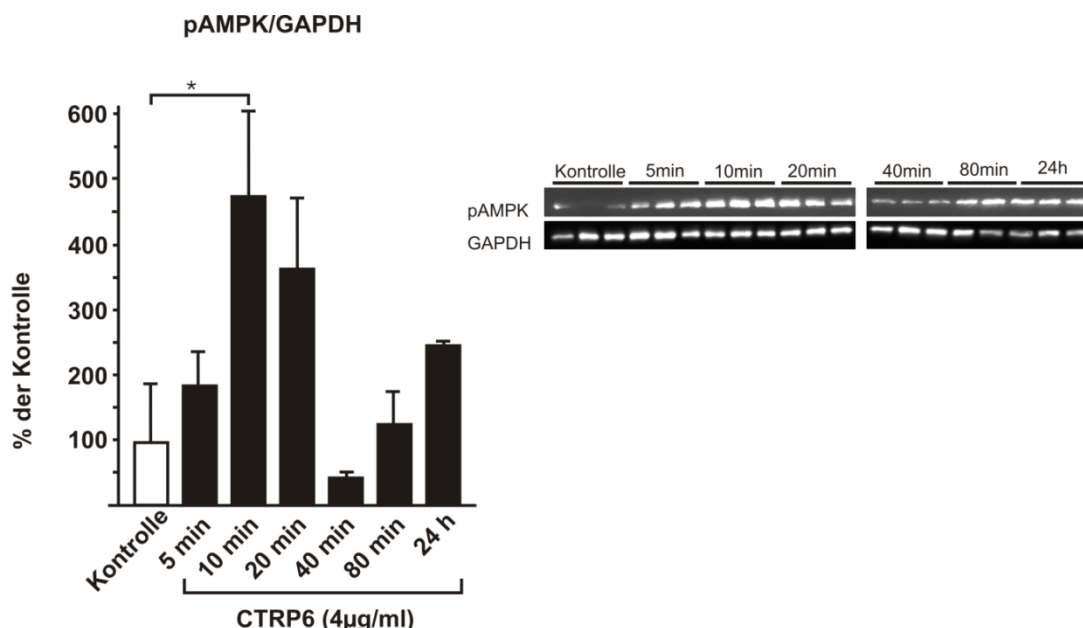


Abb. 14: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP6 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=6 pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben.

* = p<0,05.

Bei der Stimulierung der adulten Kardiomyozyten mit CTRP10 (4 µg/ml) ist nur bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten eine Aktivierung der AMPK zu erkennen. Im Gegensatz zu CTRP3 und 6 ist hier die Aktivierung jedoch nur gering ausgeprägt.

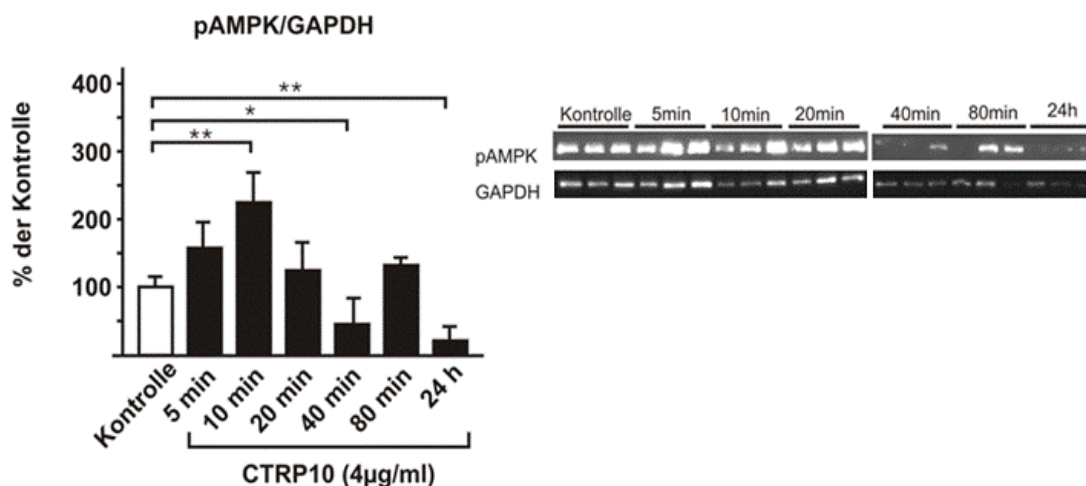


Abb. 15: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP10 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=6 pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. * = p<0,05; ** = p<0,01.

4.3.2 Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC)-Stimulierung durch CTRPs in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer

Neben den Untersuchungen zur Phosphorylierung der AMPK wurden weitere Western Blots angefertigt, um eine mögliche Inhibierung und damit Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) zu analysieren. Die Phosphorylierung des Enzyms an der Aminosäure Ser79 wurde mit einem dafür spezifischen Antikörper detektiert.

Bei der Stimulierung mit CTRP3 (4 $\mu\text{g/ml}$) ist lediglich bei einer zehnmütigen Stimulationszeit eine signifikante Phosphorylierung der ACC nachweisbar. Im Vergleich zu CTRP6 und 10 ist hier die Phosphorylierung nur gering ausgeprägt.

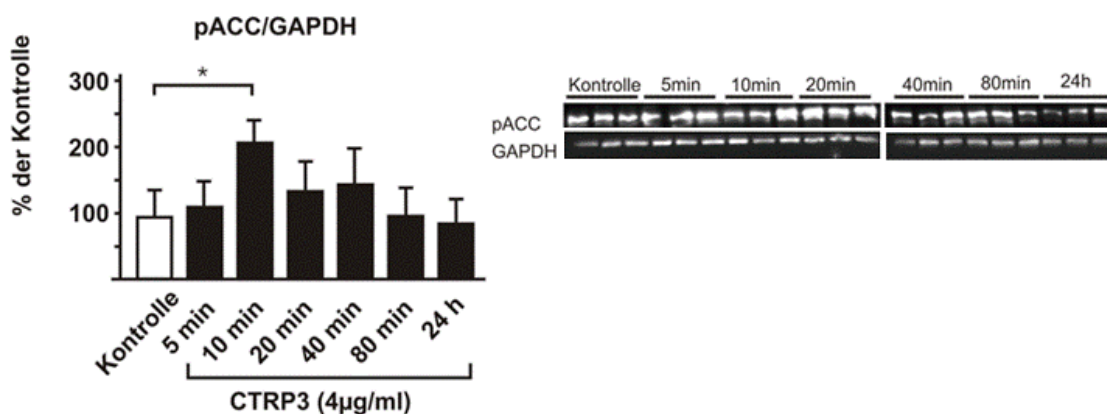


Abb. 16: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP3 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=6$ pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. * = $p < 0,05$.

Durch die Stimulierung der adulten Kardiomyozyten mit CTRP6 findet sich eine starke Inhibierung der ACC, welche bei 5, 10, 20, 40 und 80 Minuten zu finden ist.

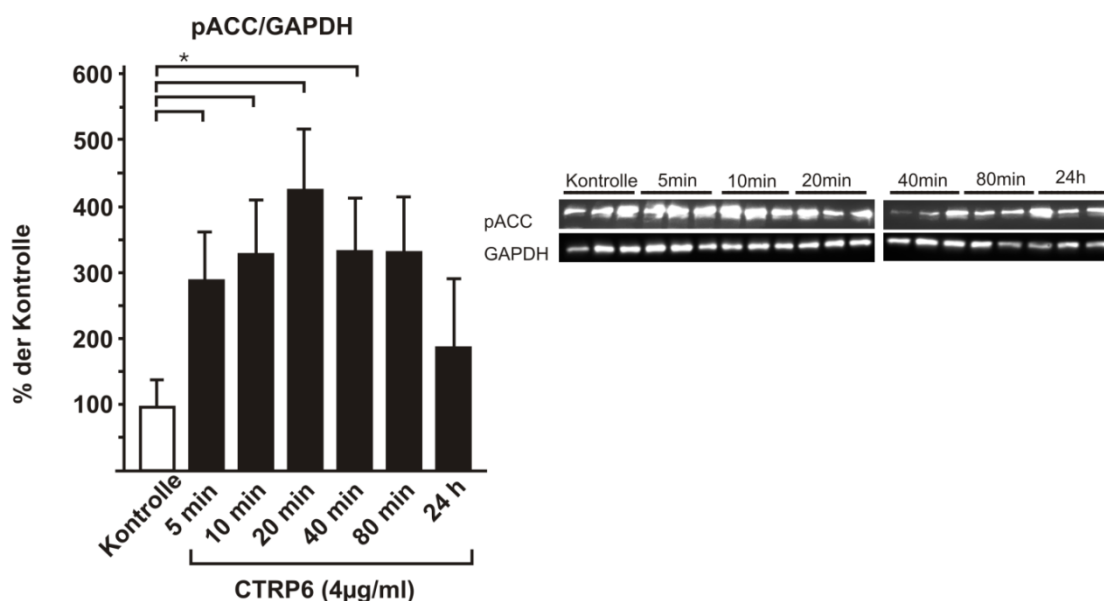


Abb. 17: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP6 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=6$ pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. * = $p < 0,05$.

Analog zur CTRP10 vermittelten AMPK-Aktivierung ist auch die ACC-Phosphorylierung nur bei 10 Minuten ($p < 0,01$) signifikant gesteigert.

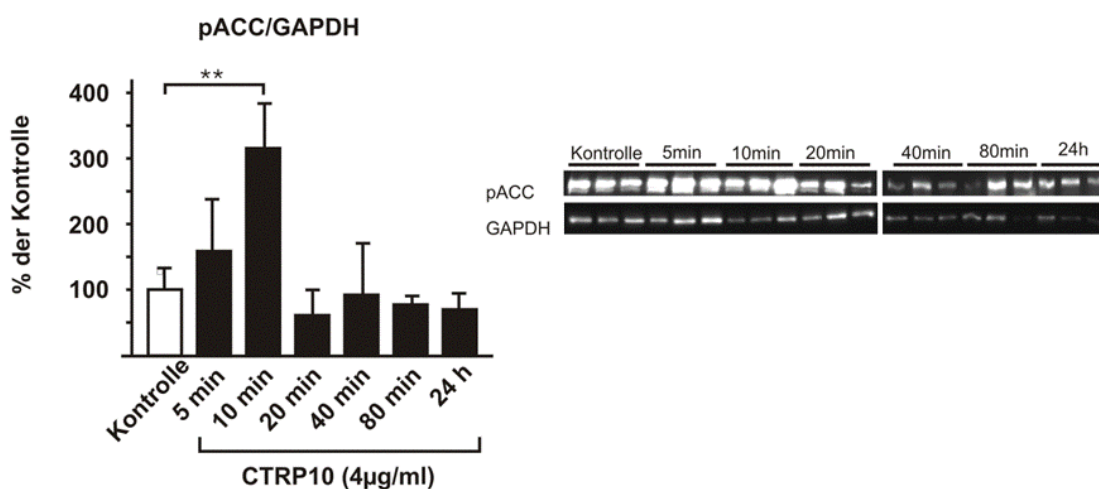


Abb. 18: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP10 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=6$ pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. ** = $p < 0,01$.

Zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung des Gel wurde für alle Western Blots GAPDH verwendet, das auch als housekeeping gene bekannt und in der Forschung sehr gängig ist. Dies ermöglichte es mit einem präparierten Rattenherzen, Proben für den Nachweis einer Phosphorylierung der AMPK und ACC zu detektieren. In Pilotversuchen

wurde zudem nachgewiesen, dass die CTRPs keinen Einfluss auf die Proteinexpression der alpha AMPK oder der ACC nehmen (Daten hier nicht aufgeführt).

Folgende Diagramme in Abbildung 19 und 20 erlauben den Vergleich zwischen dem Abgleich mit GAPDH und dem Abgleich mit gesamt AMPK bzw. gesamt ACC.

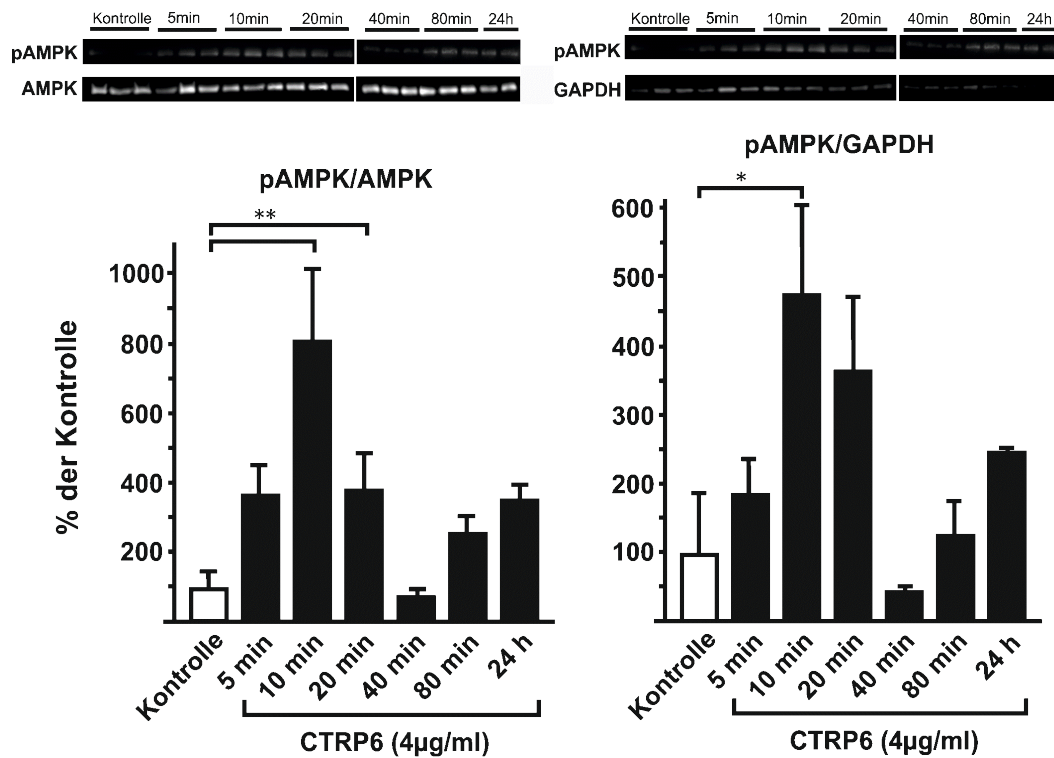


Abb. 19: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP6 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=6 pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. * = p<0,05; ** = p<0,01.

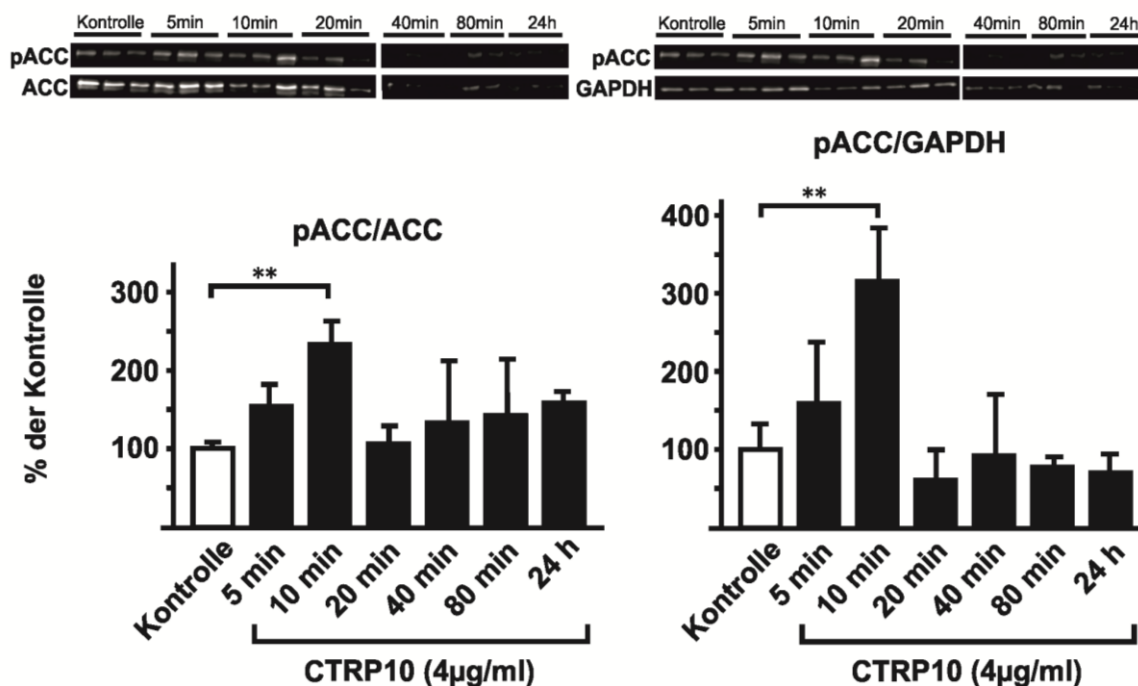


Abb. 20: Western Blot-Analyse für zeitabhängige CTRP10 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=6 pro Gruppe, jeweils Zellen isoliert von 2 verschiedenen Herzen. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. ** = p<0,01.

Auch wenn zum Teil eine Inkubationszeit von 5 oder 20 Minuten ebenfalls eine Aktivierung induzierte, so wurde im Sinne des einheitlichen Arbeitsablaufs und der besseren Arbeitsstruktur für weitere Versuche mit CTRP3, 6 und 10 eine Inkubationszeit von 10 Minuten ausgewählt.

Im Rahmen von vorangegangener Experimente in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Rohrbach wurden für CTRP1 und Adiponektin 5 Minuten und für CTRP2, 7 und 9 10 Minuten als Inkubationszeit beschrieben. Diese Zeiten wurden zur besseren Vergleichbarkeit für die folgenden Versuche übernommen.

4.3.3 Konzentrationsabhängige Stimulierung der AMP-aktivierte Proteinkinase durch CTRPs

Um herauszufinden, welche Konzentration für das jeweilige CTRP die bestmögliche ist, wurde folgende umfangreiche Versuchsreihe mit folgenden Fragen gestartet: 1) Was ist die ideale Konzentration für eine Aktivierung der AMPK und Inhibierung der ACC? 2) Verhält sich der Aktivierungs- bzw. Inhibierungsgrad proportional zur CTRP-

Konzentration? 3) Bei welcher Konzentration tritt ein Sättigungsverhalten dieser CTRP vermittelte Effekte ein?

Die adulten Kardiomyozyten wurden fünf bzw. zehn Minuten mit den jeweiligen CTRPs mit 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml und 8 µg/ml stimuliert und anschließend im Western Blot hinsichtlich der Phosphorylierung der AMPK und der ACC analysiert. Durch die Stimulierung mit Adiponektin (Acrp30) für Minuten ist eine proportionale Aktivierung zur gesteigerten Konzentration zu beobachten. Ab einer Konzentration von 1 µg/ml ist schon eine statistisch signifikante Aktivierung zu erkennen. Ob das Sättigungsverhalten der AMPK-Aktivierung durch 8 µg/ml Adiponektin erreicht ist, lässt sich hiermit nicht aussagen.

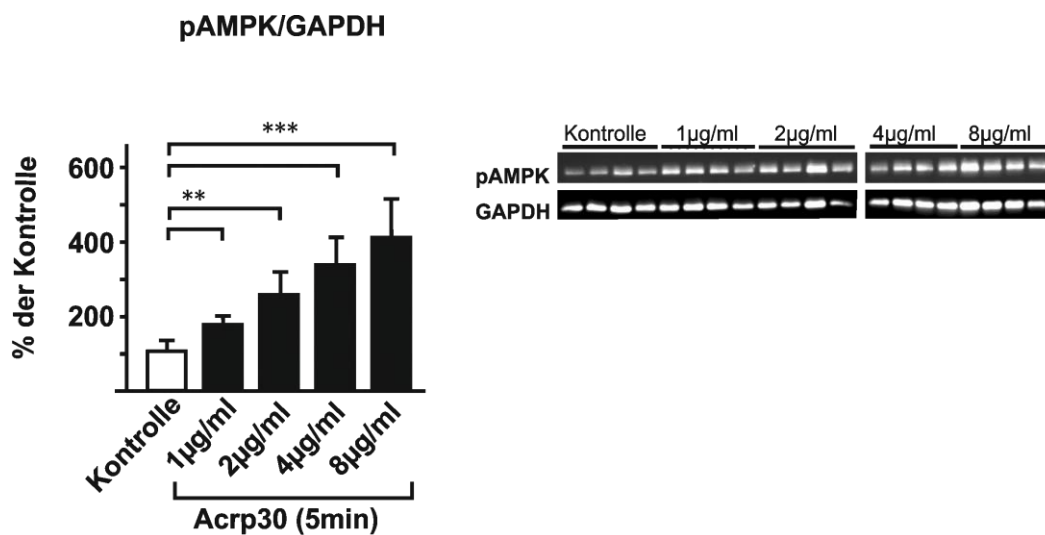


Abb. 21: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige Adiponektin Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte ± SEM sind hier angegeben. ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Die fünfminütige CTRP1 Stimulierung führt erst ab einer Konzentration von 2 µg/ml zur AMPK-Aktivierung, wobei das Maximum innerhalb der hier verwendeten Konzentrationen wohl bei 4 µg/ml zu liegen scheint.

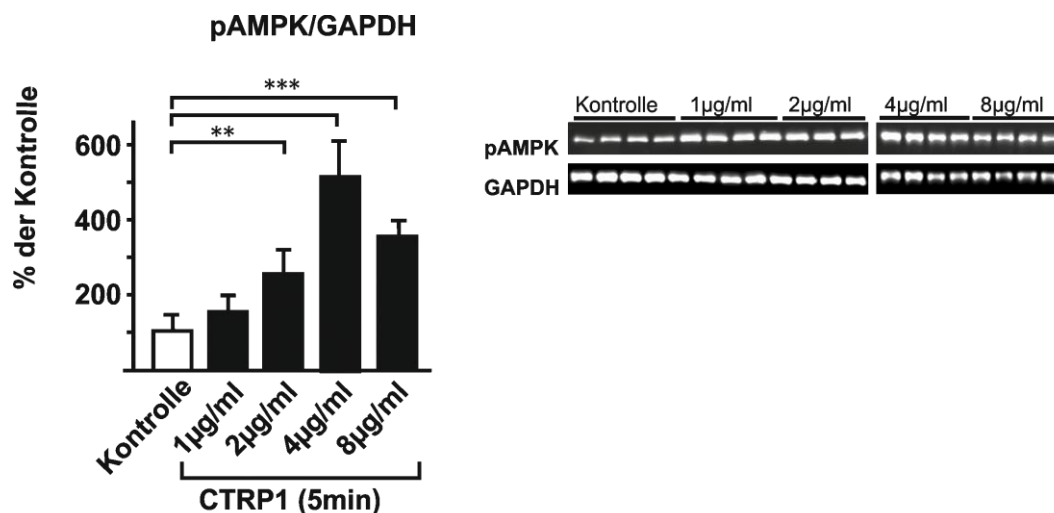


Abb. 22: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP1 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Durch eine zehnminütige Stimulierung mit CTRP2 und 3 ist schon ab 1 µg/ml des jeweiligen CTRPs eine starke Aktivierung der AMPK zu erkennen. 1 µg/ml von CTRP2 führt zu einer Verdopplung und 1 µg/ml CTRP3 zu einer verfünffachenden AMPK-Aktivierung (p<0,001). Eine höhere Konzentration dieser beiden CTRPs scheint kein zusätzliches AMPK-Aktivierungspotential zu haben.

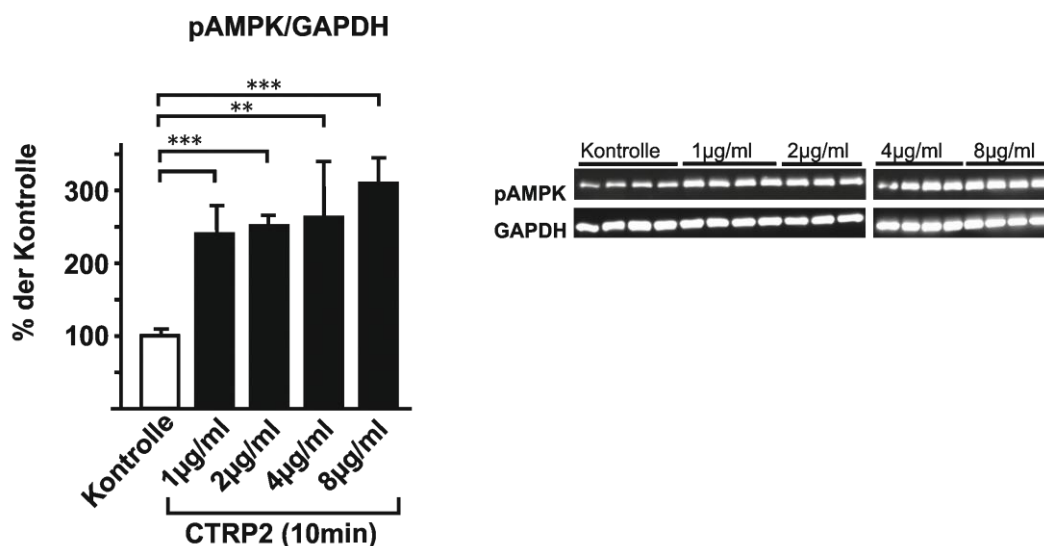


Abb. 23: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP2 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. ** = p<0,01; *** = p<0,001.

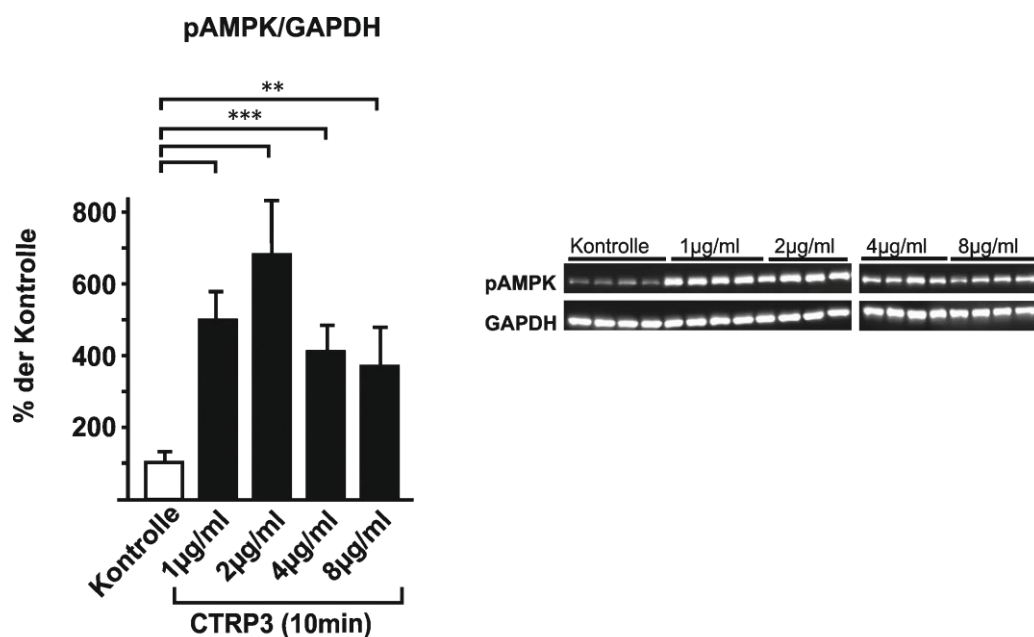


Abb. 24: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP3 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.
 Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Ähnlich wie CTRP2 und 3 ist auch bei 1 µg/ml CTRP6 eine weiter ansteigende Aktivierung der AMPK durch Erhöhung der Konzentration kaum zu erkennen. Bei einer zehninütigen Stimulierung mit CTRP7 kommt es erst ab einer Konzentration von 2 µg/ml zur AMPK-Aktivierung, wobei das Maximum bei 4 µg/ml liegen könnte.

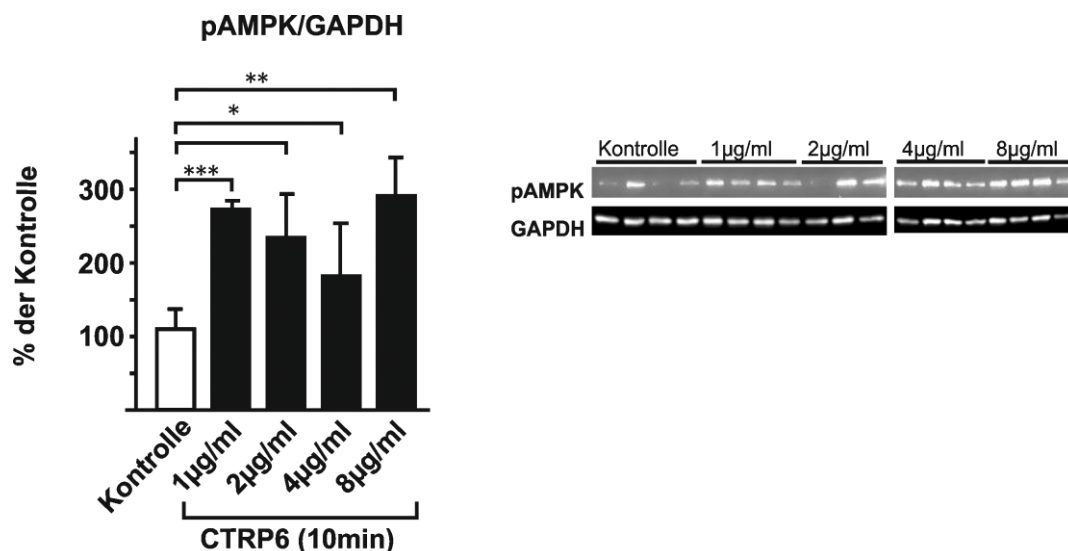


Abb. 25: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP6 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.
 Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

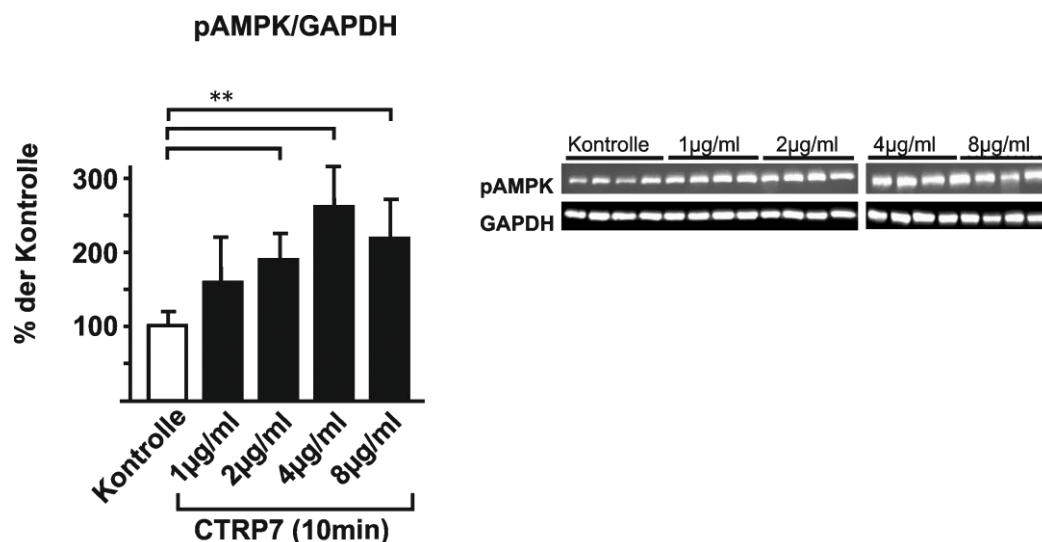


Abb. 26: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP7 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. ** = $p < 0,01$.

CTRP9, das als starker AMPK-Aktivator bekannt ist (Wong et al., 2009), führt schon bei einer zehnminütigen Stimulationszeit mit 1 $\mu\text{g/ml}$ zu einer zehnfachen AMPK-Aktivierung. Diese Aktivierung wird auch bei Verwendung höherer Konzentrationen von CTRP9 nicht weiter gesteigert.

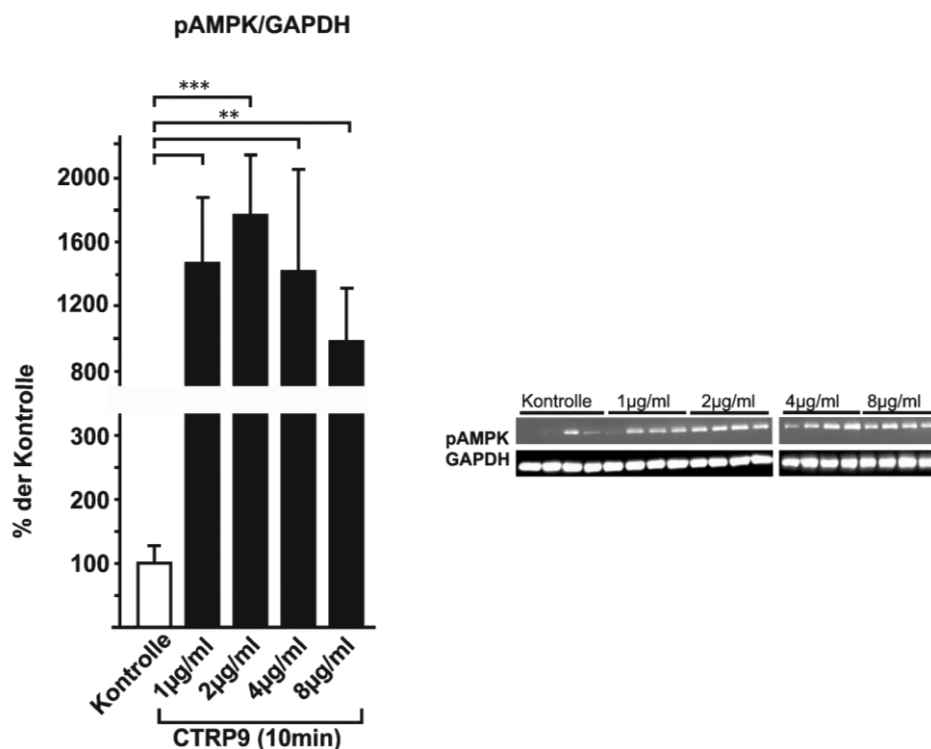


Abb. 27: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP9 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Eine Aktivierung der AMPK durch eine zehnminütige Stimulierung mit CTRP10 ist erst ab einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ nachweisbar ($p < 0,001$). Eine Verdoppelung der Konzentration auf 8 $\mu\text{g/ml}$ führt hierbei zu keiner weiteren Steigerung der Aktivierung. Durch CTRP10 kommt es auch bei höchster Konzentration (8 $\mu\text{g/ml}$) nur zu einer Verdoppelung des Phosphorylierungsgrades der AMPK.

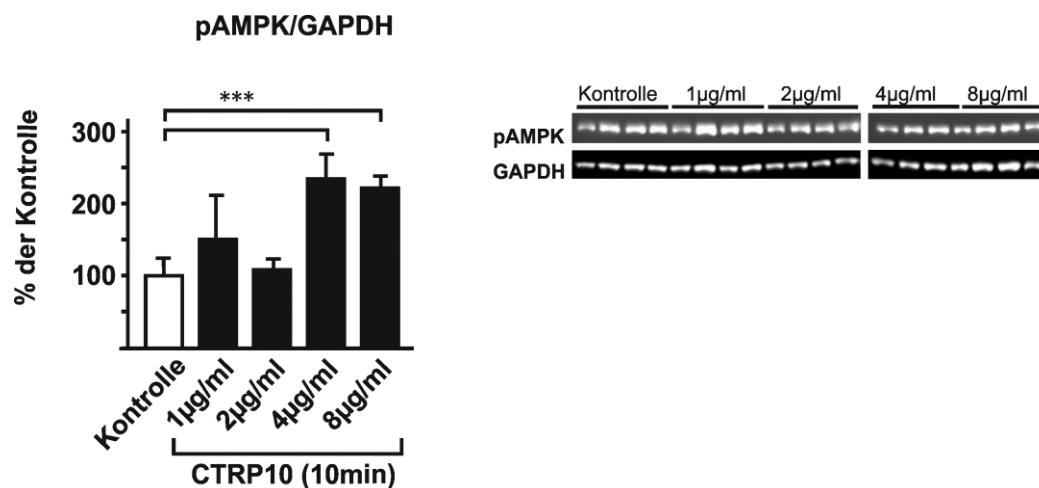


Abb. 28: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP10 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der AMPK-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. *** = $p < 0,001$.

4.3.4 Konzentrationsabhängige Stimulierung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch CTRPs

Auf Proteinebene wurde auch der Phosphorylierungsgrad der ACC mittels Western Blot aufgezeigt. Vergleichbar mit den obigen Ergebnissen zur AMPK-Aktivierung ist auch hier ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ Adiponektin oder CTRP1 eine starke Phosphorylierung der ACC festzuhalten. Bei CTRP1 scheint bei 4 $\mu\text{g/ml}$ das Maximum der Aktivierungsfähigkeit erreicht zu sein.

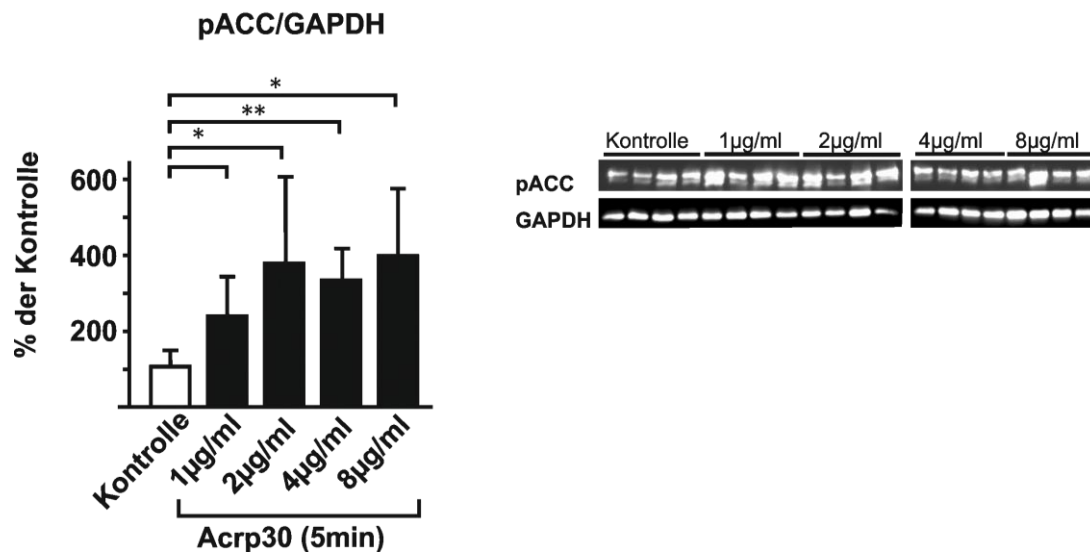


Abb. 29: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige Adiponektin Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. * = p<0,05; ** = p<0,01.

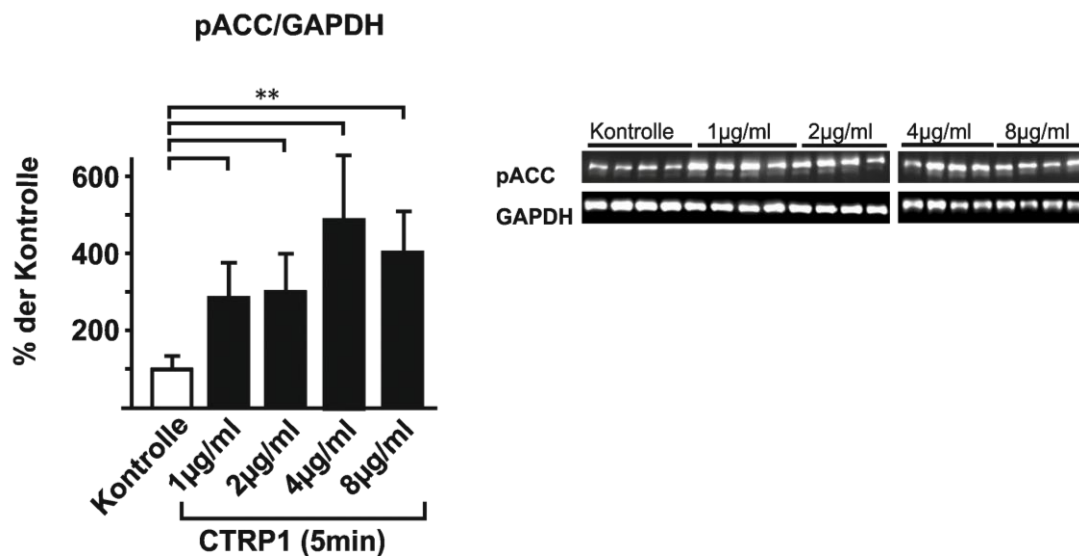


Abb. 30: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP1 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. ** = p<0,01.

Die zehnminütige Stimulierung mit CTRP2 ist erst ab einer Konzentration von 4 µg/ml ($p < 0,01$) signifikant gesteigert. Im Gegensatz dazu ist schon bei 1 µg/ml CTRP3 eine Vervierfachung der ACC-Phosphorylierung erreicht, welche trotz höherer Konzentrationen kaum zu steigern ist.

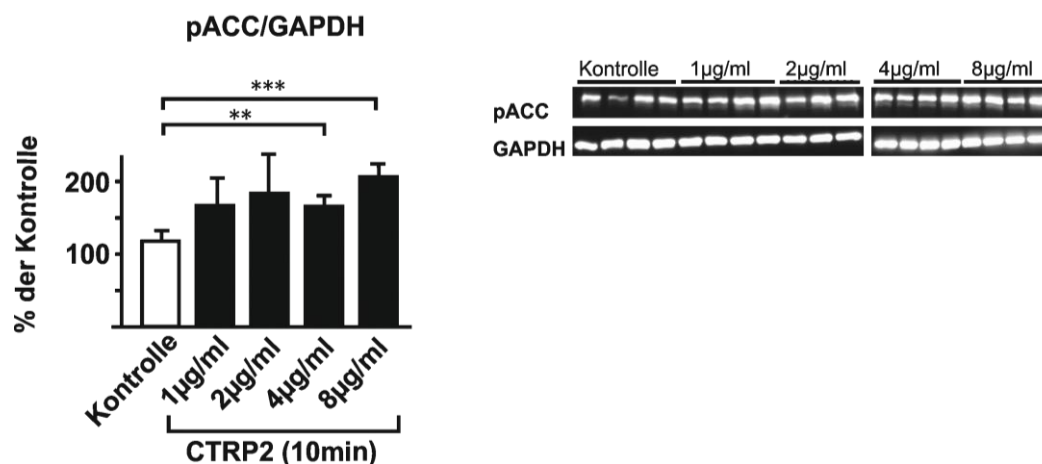


Abb. 31: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP2 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

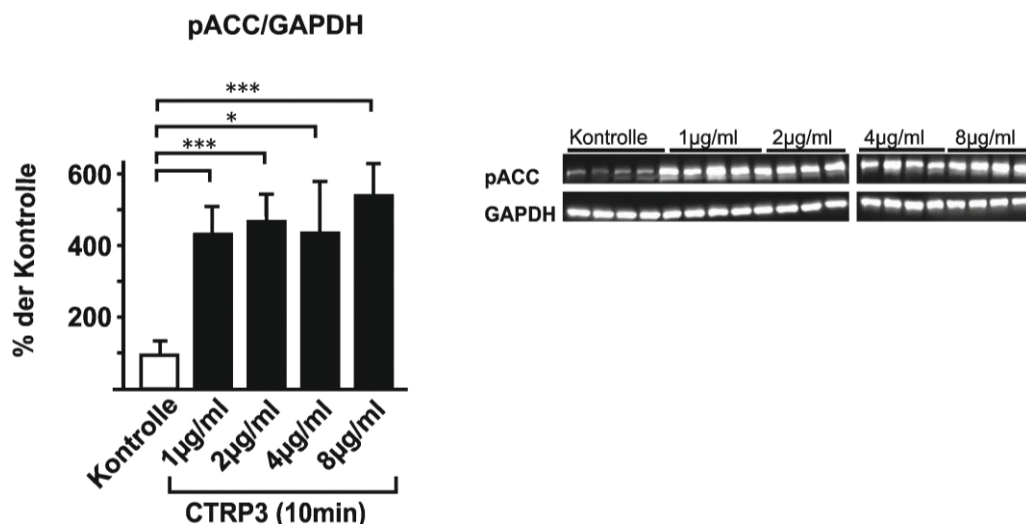


Abb. 32: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP3 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Ab 1 µg/ml führt CTRP6 nach 10 Minuten Stimulierungszeit durchgehend zu einer Aktivierung der ACC. CTRP7 zeigt erst ab einer Konzentration von 2 µg/ml eine ACC-

Phosphorylierung, wobei eine Steigerung der Konzentration bis 8 $\mu\text{g/ml}$ keinen stärkeren Effekt hat.

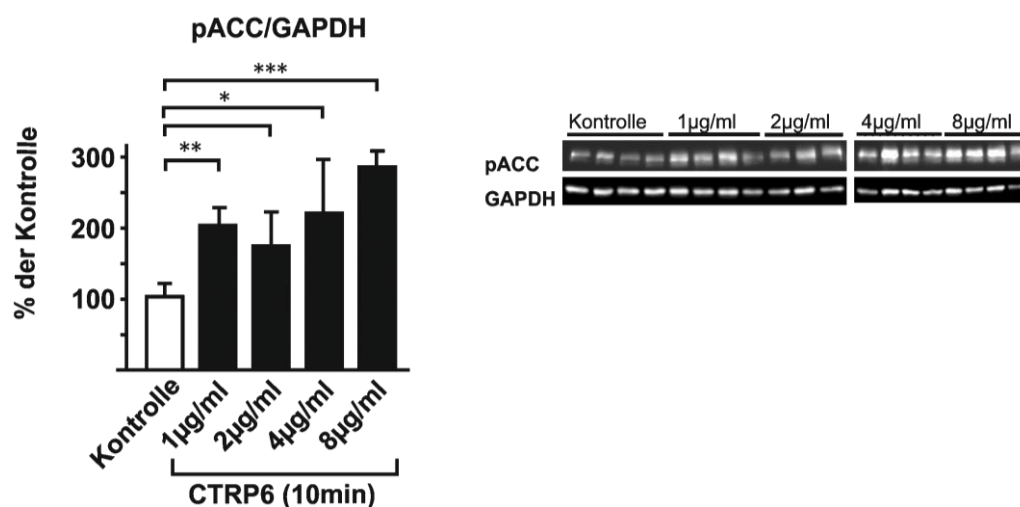


Abb. 33: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP6 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

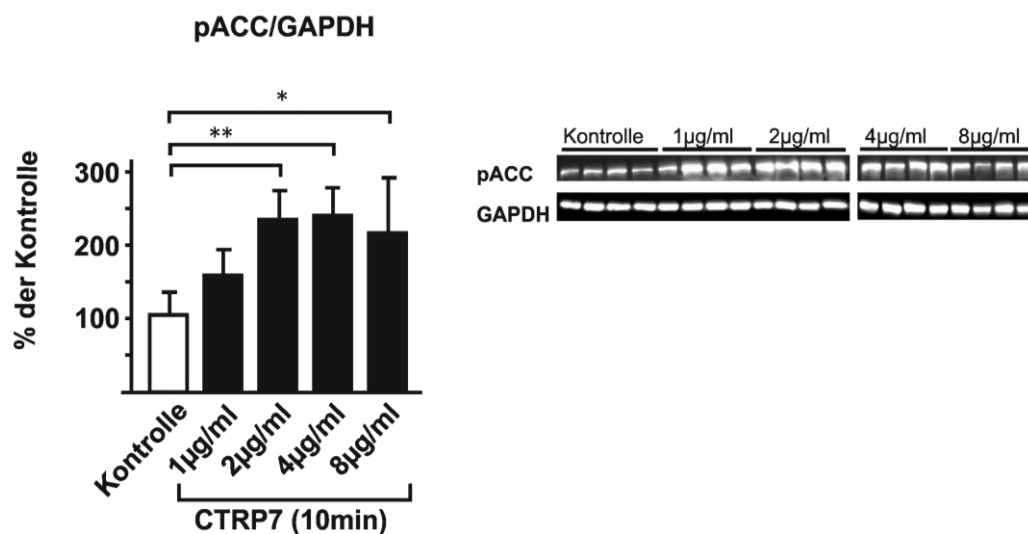


Abb. 34: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP7 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Eine CTRP9 induzierte ACC-Inhibierung ist bereits ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ bei 10 Minuten Stimulierung statistisch signifikant. Die Phosphorylierung der ACC wird dabei auf das Doppelte bzw. Dreifache gesteigert.

CTRP10 phosphoryliert schon bei geringen Konzentrationen die ACC. Bei einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ ist das Phosphorylierungspotential am stärksten ($p < 0,01$).

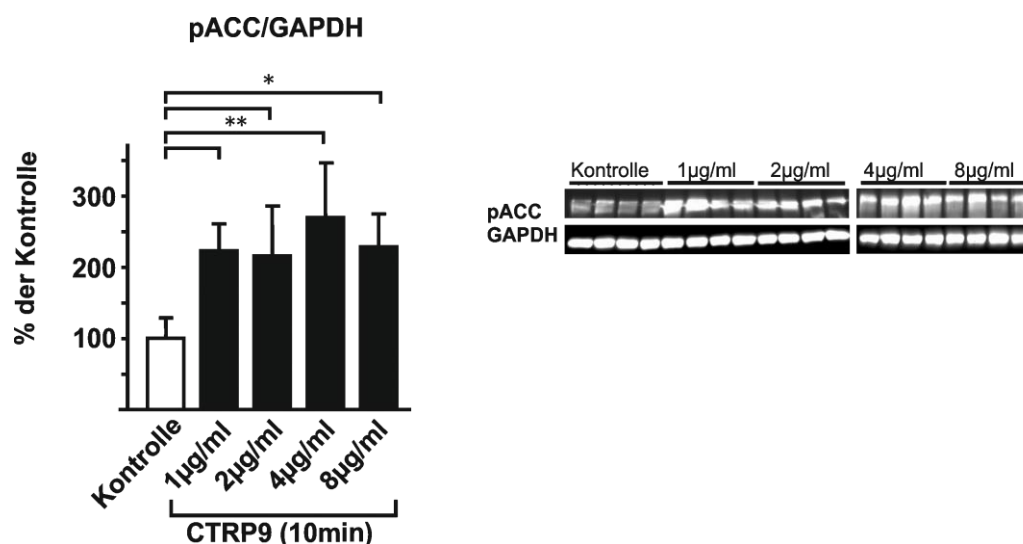


Abb. 35: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP9 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. * = p<0,05; ** = p<0,01.

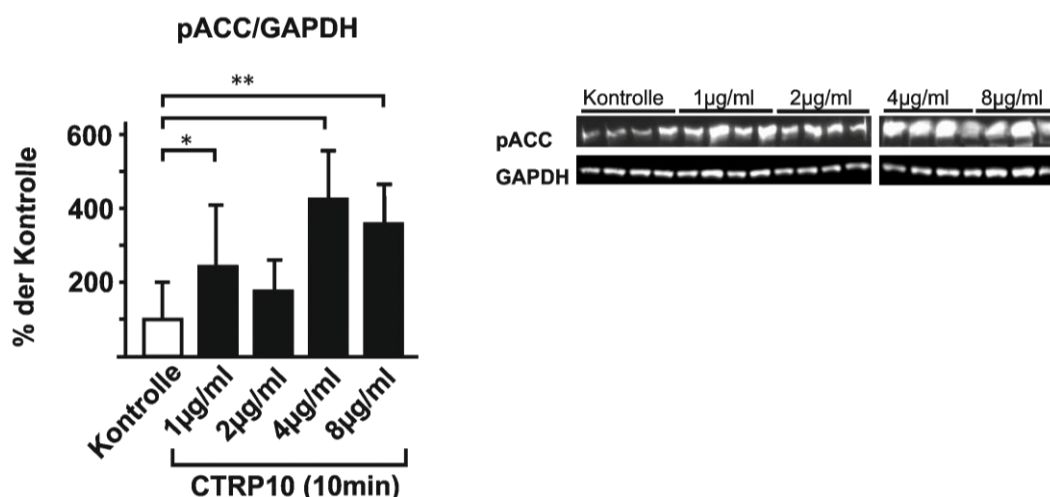


Abb. 36: Western Blot-Analyse für konzentrationsabhängige CTRP10 Stimulation adulter Rattenkardiomyozyten.

Daten der ACC-Phosphorylierung stammen aus Experimenten mit jeweils n=4 pro Gruppe; bei einem durchgeführten Versuch. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben. * = p<0,05; ** = p<0,01.

4.4 Herabregulation der Adiponektin-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 mittels siRNA in adulten Rattenkardiomyozyten.

Um der Frage nachzugehen, ob Adiponektin-Rezeptoren bei den intrazellulären Effekten der CTRPs eine Rolle spielen, wurden folgende Versuche konzipiert.

Es sollte in erster Linie die Expression der AdipoR1 und 2 in adulten Kardiomyozyten herabreguliert werden. Nach diesem Knockdown sollten die Zellen mit CTRPs stimuliert werden, um die Rolle der Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in der CTRP vermittelten Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zu untersuchen.

Eine Möglichkeit, um die Expression eines spezifischen Proteins zu inhibieren, ist die Methode der RNA-Interferenz, die in 3.2.1.1. ausführlich beschrieben wurde. Entsprechend der Angaben anderer Arbeitsgruppen wurde mittels siRNA ein Knockdown um 70% bei adulten Kardiomyozyten des p21 und p27 Proteins erzielt. Diese Ergebnisse wurden nach 48 Stunden Inkubation mittel Western Blot gewonnen (Di Stefano et al., 2011). Primär wurden die Zellen vor der Ernte makroskopisch nach Anzahl, Form, Vitalität und Kontraktilität bewertet. Hier stellte sich Lipofectamine RNAiMAX im Vergleich zum Oligofectamin als das weniger toxische dar. Dies war das Resultat einer quantitativen Analyse zwischen diesen beiden Transfektionsreagenzien hinsichtlich der Anzahl toter Zellen sowie der Anzahl noch intakter Zellen. Die Knockdown-Effizienz wurde mithilfe von RT-PCR analysiert. Mit der AdipoR1-siRNA und Lipofectamine RNAiMAX wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Knockdown der AdipoR1 mRNA-Expression um ca. 70% erzielt ($p < 0,001$). Durch die Verwendung von Oligofectamine konnte ebenfalls ein deutlicher Knockdown der AdipoR1 mRNA-Expression erzielt werden ($p < 0,05$).

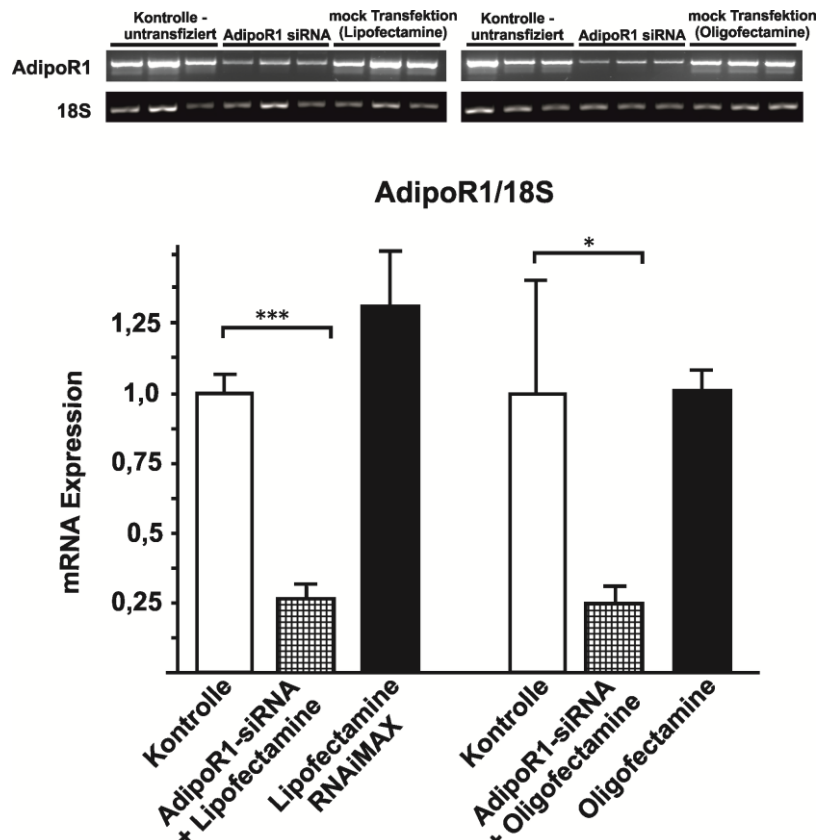
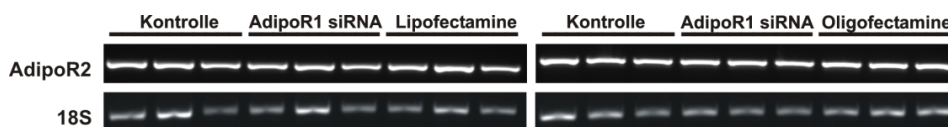


Abb. 37: RT-PCR-Analyse für AdipoR1-Knockdown in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten.

Daten des Knockdowns stammen aus Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe; 2 unabhängige Versuche. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Um die Spezifität der verwendeten AdipoR1-siRNA zu zeigen, wurde in denselben Proben die Expression des AdipoR2 untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die AdipoR1-siRNA keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des AdipoR2 hat.



AdipoR2/18S

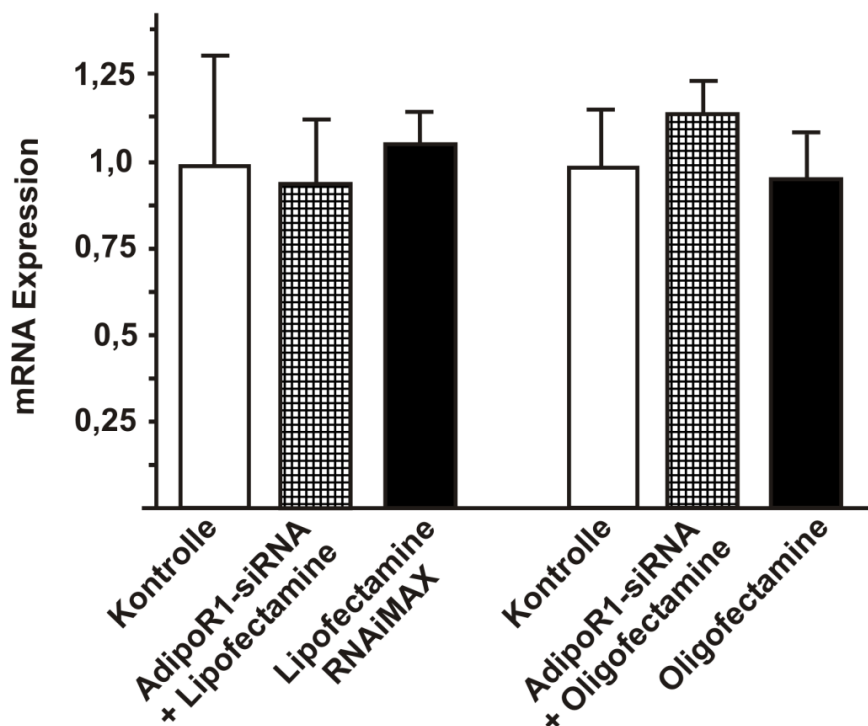


Abb. 38: RT-PCR-Analyse für AdipoR2-Knockdown in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten.

Daten des Knockdowns stammen aus Experimenten mit jeweils n=3 pro Gruppe; 2 unabhängige Versuche. Mittelwerte± SEM sind hier angegeben.

Anschließend wurde zusätzlich zu der Kontrollgruppe eine Gruppe mit einer Kontroll-siRNA behandelt, um den Einfluss der Transfektion auf die AdipoR1 bzw. AdipoR2 mRNA-Expression zu untersuchen.

Der unten angeführten Grafik sind drei wichtige Resultate zu entnehmen: 1) Mit der AdipoR2-siRNA wird ein Knockdown der AdipoR2 mRNA-Expression um ca. 70% erzielt ($p < 0,001$) 2) Die AdipoR1-siRNA hat keinen hemmenden Einfluss auf die AdipoR2 mRNA-Expression 3) Die Kontroll-siRNA verändert die Expression von AdipoR2 nicht.

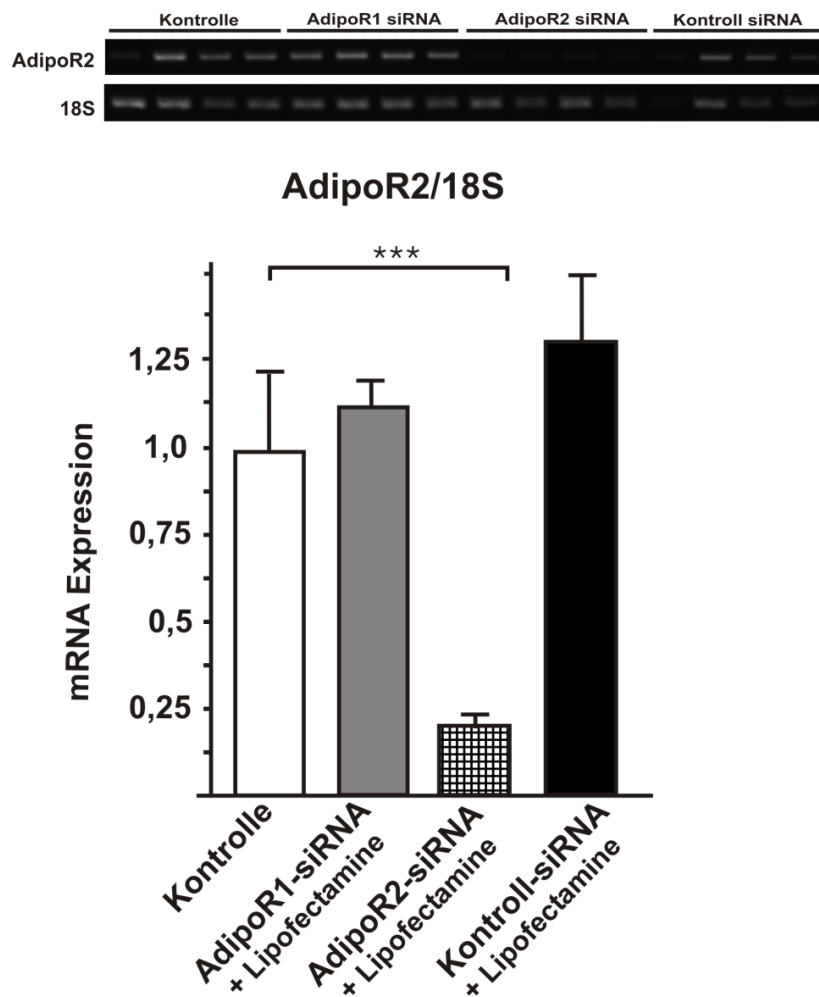


Abb. 39: RT-PCR-Analyse für AdipoR2-Knockdown in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten.

Daten des Knockdowns stammen aus Experimenten mit jeweils $n=4$ pro Gruppe; 2 unabhängige Versuche. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben; *** = $p < 0,001$.

In den weiteren Versuchen sollte der siRNA-Effekt auf die AdipoR1 Proteinexpression mittels Western Blot untersucht werden. Es wurden drei verschiedene primäre Antikörper für AdipoR1 benutzt, die jedoch auch in hohen Proteinkonzentrationen in adulten Rattenkardiomyozyten keine eindeutigen AdipoR1 Banden zeigten. Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 40 ein Blotbild aufgeführt, das die Schwierigkeit der Darstellung aufzeigt.

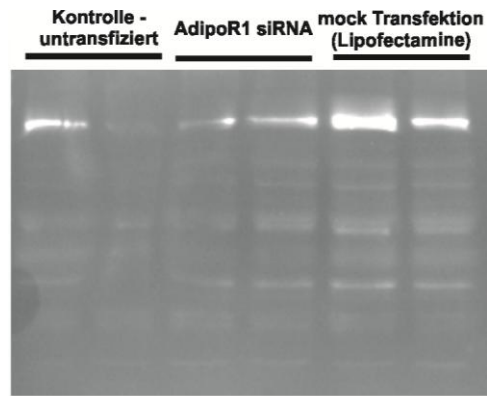


Abb. 40: Western Blot-Analyse:

Versuch für AdipoR1 Darstellung in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten.

Ein Teilaspekt, welcher erschwerend für diese Versuchsreihe war, ist die Toxizität der Reagenzien der siRNA-Transfektion. In diesen und anderen Vorversuchen zeigte sich bei beimpften isolierten Kardiomyozyten ein vermehrtes Absterben im Vergleich zu denen, welche nicht mit beimpft wurden.

In der Literatur wurden 48 Stunden als Inkubationszeit für ein Protein-knockdown verwendet (DiStefano et al., 2011). In den Schalen, welche vor der Ernte (nach mind. 48 Stunden) mikroskopisch begutachtet wurden, war der Großteil der adulten Kardiomyozyten bereits abgestorben, sodass kaum noch kontraktile Zellen vorgefunden wurden. Die Ursache hierfür und somit limitierend für diese Versuche ist, die hohe Empfindlichkeit der adulten Kardiomyozyten für eine derartig lange Inkubationszeit. Weitere Analysen auf Proteinebene waren bei diesen beimpften adulten Kardiomyozyten nicht mehr möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch die Methodik der reproduzierbaren AdipoR1- & AdipoR2-mRNA Knockdowns mittels spezifischer siRNA in adulten Rattenkardiomyozyten etabliert.

5 Diskussion

Die oben beschriebenen Ergebnisse gilt es mit bereits bestehenden Erkenntnissen aus der gegenwärtigen Forschung zusammenzuführen und zu diskutieren, um Forschungsperspektiven daraus abzuleiten. Hierzu werden Teilaspekte der Ergebnisse in den Blick genommen.

5.1 Expressionsmuster der ausgewählten CTRPs in verschiedenen Zelltypen

Das Fettgewebe, dessen endokrine Funktion eine zunehmend bedeutende Rolle in der Forschung eingenommen hat, ist ausschließlich für die Adiponektin-Expression verantwortlich (Scherer et al., 1995). Die Adiponektin-Paraloge haben im Gegensatz dazu ein stark abweichendes Expressionsmuster (Wong et al., 2004). Im Rahmen dieser Fragestellung liegt hier der Schwerpunkt auf die kardiale zellspezifische CTRP-Expression in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten adulter Ratten.

Eine ausführliche Darlegung der endothelialen Expression von CTRPs ist in der Literatur bisher noch nicht vorhanden, abgesehen von CTRP1 dessen Expression in der Gefäßwand in der gegenwärtigen Literatur beschrieben ist (Lasser et al., 2006). In den hier durchgeführten Versuchen wurde in Endothelzellen eine deutliche mRNA-Expression von CTRP1, 5, 6, 12 und 15 und eine geringere mRNA-Expression von CTRP2, 7, und 13 gefunden (vgl. 4.1.1). 2011 konnte gezeigt werden, dass CTRP9 NO-vermittelte vasodilatatorische Effekte ausüben kann (Zheng et al.), obwohl ausgehend von diesen Ergebnissen eine Expression in Endothelzellen nicht vorhanden ist.

Eine isolierte Darstellung der mRNA-Expression der CTRPs in Fibroblasten wurde noch nicht beschrieben. Nahezu alle der hier untersuchten CTRPs, insbesondere CTRP5, 6, 7, und 12 werden in Fibroblasten exprimiert. Bislang wurde bei der Betrachtung der Expression von CTRPs im Herzen nur auf CTRP1, 5, 6 und 7 beschränkt (Wong et al., 2008). Erst in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wird zusätzlich die geringe mRNA-Expression von CTRP2, 3 und in hohem Maße die von CTRP9 im Herzen adulter Mäuse aufgezeigt (Su et al., 2013). Dies wurde auch im Rahmen dieser Versuche belegt. Durch die hier erzielten Ergebnisse kann jedoch eine zusätzliche geringe mRNA-Expression

von CTRP12, 13 und 15 in adulten Kardiomyozyten postuliert werden. Neben CTRP9 scheint auch CTRP13 in ähnlich hohem Maße in adulten Kardiomyozyten exprimiert zu sein.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit ein unterschiedliches Expressionsmuster in den drei verschiedenen Zelltypen analysiert, woraus sich weitere Fragen über die zellspezifische Funktion und die Rolle der entsprechenden CTRPs ergeben, deren Erforschung Ziel künftiger Arbeiten sein kann. Eine daran anknüpfende Frage könnte sein: Inwieweit die vor allem in Endothelzellen exprimierten CTRPs – vergleichbar mit dem Adiponektin – eine potenzielle antiatherogene Wirkung besitzen.

5.2 Expressionsmuster der Adiponektinrezeptoren in verschiedenen Zelltypen

Die mRNA-Expression von AdipoR1 in adulten Rattenkardiomyozyten wurde bereits beschrieben (Ding et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte neben der zusätzlichen Expression von AdipoR1-mRNA in Fibroblasten auch gezeigt werden, dass AdipoR1-mRNA in Endothelzellen annähernd gleichstark vorhanden ist wie in Kardiomyozyten (vgl. 4.2). AdipoR2, welches vornehmlich in der Leber exprimiert wird (Yamauchi et al., 2003), zeigt in diesem Zusammenhang sowohl in Fibroblasten, in Endothelzellen als auch in Kardiomyozyten ein gewisses mRNA-Expressionsprofil. Dem Adiponektin wird u.a. kardioprotektive Effekte zugeschrieben (Ouchi et al., 2003). Dies könnte auch in der Anwesenheit beider Rezeptoren in Kardiomyozyten begründet sein, welche vermutlich essentiell für die kardioprotektiven Effekte sind. Ferner ist zu klären, ob den Adiponektin-Paralogen, insbesondere denjenigen, die im kardialen Gewebe gefunden wurden, ebenfalls kardioprotektive Effekte zugeschrieben werden können.

T-Cadherin, dessen Expression in Endothelzellen, in glatten Muskelzellen und im kardiovaskulären System bereits beschrieben ist, interagiert ebenfalls mit Adiponektin (Hug et al., 2004). Im Gegensatz zum AdipoR1 und AdipoR2 gibt es noch keine Arbeiten, die einen potentiellen Zusammenhang zwischen den CTRPs und T-Cadherin untersucht haben. Kürzlich wurde in Endothelzellen eine CTRP9 vermittelte AMPK-, Akt- und eNOS-Aktivierung beschrieben (Zheng et al., 2011). Auch hierzu stellt sich die Frage, inwieweit die T-Cadherin-Expression eine Rolle spielt, da T-Cadherin vornehmlich in Endothelzellen exprimiert wird.

5.3 Möglicher Einfluss von Alter und kalorischer Restriktion auf die Expression der CTRPs

Aufgrund der Tatsache, dass die CTRPs im Vergleich zum Adiponektin ein deutlichdifferenzierteres Expressionsmuster aufweisen, stellt sich zum einen die Frage nach der Funktion der CTRPs in den entsprechenden Geweben und zum anderen nach den Faktoren, die auf die Expression Einfluss nehmen. Den aktuellen Forschungen sind keine Daten über potentielle Einflussfaktoren zur zellspezifischen Expression der CTRPs in den hier untersuchten Zelltypen zu entnehmen. Die Einflussfaktoren der CTRP-Expression, welche in der Literatur beschrieben sind, beziehen sich ausschließlich auf die im Serum gemessenen CTRP-Expressionsunterschiede.

Neben dem Geschlecht (vgl. dazu: Wong et al., 2008 und 2009; Zhikui et al.; 2011) scheinen Leptin und Adiponektin weitere Einflussfaktoren auf die CTRP-Expression zu sein. In Adiponektin-Nullmäusen wurde eine doppelte Plasmakonzentration an CTRP1 gemessen (Wong et al., 2008). Grund hierfür könnte die kompensatorische Funktion von CTRPs sein. In acht Wochen alten männlichen Leptin-defizienten ob/ob Mäusen wurde sowohl eine erhöhte Adiponektin- als auch eine erhöhte CTRP1-, 2-, 3-, 6-, 7-, 9- und 12-Konzentration entdeckt (Wong et al., 2008 und 2009; Zhikui et al., 2012). Interessanterweise konnte im Vergleich zu diesen Ergebnissen bei zwölf Wochen alten männlichen Leptin-defizienten ob/ob Mäusen eine signifikante Verringerung der Adiponektin und keine erhöhte CTRP9 Expression gemessen werden (Wong et al., 2009). Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass das Alter ein potentieller Einflussfaktor ist.

Da der Forschungsschwerpunkt dieser Dissertation auf der zellspezifischen Expression lag, wurden bezugnehmend auf den damaligen Forschungsstand das Alter sowie die kalorische Restriktion als potentieller neuer Einflussfaktor herangezogen. Verglichen wurden die drei Gruppen; *jung* (6 Monate), *jung mit kalorischer Restriktion* (-30% kalorischer Zufuhr für 3 Monate) und *alt* (27 Monate) miteinander. In den kardialen Endothelzellen scheint das Alter eine vermehrte mRNA-Expression von CTRP1, 5 und 9 zu induzieren, welche meist hoch signifikant ist (vgl. 4.1.2.2). Dieser Effekt konnte jedoch für CTRP13 nicht gezeigt werden.

Für die CTRP9 mRNA-Expression in Kardiomyozyten scheint das Alter – im Gegensatz zu kardialen Endothelzellen – hemmenden Einfluss zu nehmen. Die mRNA-Expression von CTRP2 und 13 scheint durch diese Faktoren allerdings unbeeinflusst zu sein. Diese

deskriptiven Ergebnisse zeigen auf, wie differenziert diese regulatorischen Mechanismen analysiert werden müssen.

In allen hier durchgeführten Versuchen gab es keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen der Gruppe mit den jungen Ratten mit oder ohne kalorische Restriktion. Daraus ergibt sich der vorläufige Schluss, dass die hier angesetzte kalorische Restriktion keinen Einfluss auf die Expression der CTRPs bei den jungen Ratten hat. Zu hinterfragen ist, ob eine deutlichere kalorische Restriktion von beispielsweise 50% bzw. 30% über einen längeren Zeitraum nötig wäre, um etwaige Expressionseinflüsse aufzudecken. In solch einer Versuchsreihe könnte anschließend, mit einer Ergänzung um die Gruppe *alt mit kalorischer Restriktion*, weiteruntersucht werden, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß die kalorische Restriktion Einfluss auf das Expressionsmuster der CTRPs hat.

In jüngeren Arbeiten konnten darüberhinaus weitere Einflussfaktoren auf die mRNA-Expression von CTRP9 im Herzen von Mäusen detektiert werden. Beispielsweise ist durch eine Stimulierung mit TNF- α und in Mäusen mit Diabetes mellitus Typ 2 die CTRP9 mRNA-Expression signifikant verringert (Su et al., 2013). Wie diese Ergebnisse einzuordnen sind, ist noch nicht geklärt, jedoch lässt sich hier ein Vergleich zum Adiponektin machen, da Diabetes bei Patienten ebenfalls zur Reduktion der Adiponektinkonzentration führt (Arita et al., 1999). Ob somit CTRP9 auch antidiabetogene Eigenschaften zugeschrieben werden können, lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht eindeutig sagen.

5.4 Aktivierung der AMPK und ACC durch ausgewählte CTRPs in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer

Die AMPK stimuliert eine Reihe von Enzymen und Transkriptionsfaktoren und hemmt u.a. energieverbrauchende Synthesevorgänge wie die Protein-, Fettsäure- und Cholesterinbiosynthese. Durch die gleichzeitige Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase, die dadurch in die inaktive Form überführt wird, kommt es zum Abfall der Malonyl-CoA-Konzentration und damit zur Hemmung der Fettsäurebiosynthese und folglich zu einer gesteigerten ATP-generierenden β -Oxidation der Fettsäuren (Yamauchi et al., 2008).

Die Eigenschaft bestimmter CTRPs die AMPK und ACC zu phosphorylieren, wurde bereits mehrfach gezeigt (Wong et al., 2004; Peterson et al., 2012; Kambara et al., 2012). Eine CTRP3-Stimulierung der adulten Rattenkardiomyozyten ist in der Lage die AMPK zu aktivieren, sodass es bis zu einer fünffachen AMPK-Aktivierung kommt. Mithilfe dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die CTRP3 vermittelte AMPK-Aktivierung zellspezifisch ist und somit in Kardiomyozyten, nicht aber in Hepatozyten detektiert werden kann (Peterson et al., 2010). Durch die Zeitversuche konnte in den meisten Fällen bei 10 Minuten Stimulierungszeit sowohl eine AMPK- als auch ACC-Phosphorylierung gemessen werden, was wohl durch die Tatsache des gleichen Signalwegs zu erklären ist.

In Skelettmuskelzellen von C2C12 Maus-Myotubes konnte eine Phosphorylierung der AMPK und ACC nur in hohen Konzentrationen (10 µg/ml) von CTRP6 detektiert werden (Wan et al., 2010). Durch eine kurzzeitige Inkubation der adulten Kardiomyozyten mit einer deutlich geringeren Konzentration von CTRP6 kommt es hierbei ebenfalls zu einer Aktivierung der AMPK. Eine CTRP10 vermittelte AMPK-Aktivierung und ACC-Inhibierung wurde in der gegenwärtigen Literatur noch nicht aufgeführt. CTRP10 scheint jedoch ein schwacher AMPK-Aktivator zu sein, da es nur bei einer isolierten zehnmütigen Stimulierung mit ≥ 4 µg/ml CTRP10 zur Aktivierung kommt ($p < 0,05$). CTRP3 scheint hingegen ein starker AMPK-, jedoch nur ein schwacher ACC-Aktivator zu sein. Dies lässt sich dadurch erklären, dass CTRP3 über andere *downstream targets* der AMPK zu wirken scheint.

5.5 Aktivierung der AMPK und ACC durch ausgewählte CTRPs in Abhängigkeit von der Konzentration

Um der Frage nachzugehen, welche Konzentration bzw. Affinität des jeweiligen CTRPs nötig ist, um eine adäquate Aktivierung beider Enzyme zu gewährleisten, wurde die konzentrationsabhängige Phosphorylierung beider Enzyme mit 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml und 8 µg/ml Adiponektin, CTRP1, 2, 3, 6, 7, 9, und 10 in adulten Kardiomyozyten untersucht. Als einziger der hier untersuchten Adipozytokine hat Adiponektin ein direkt proportionales AMPK-Aktivierungsverhalten bis 8 µg/ml. Wobei noch nicht geklärt ist, ob eine Stimulierung mit 8 µg/ml Adiponektin das Maximum an AMPK-Aktivierung darstellt.

Für CTRP2, 3, 6 und 9 ist eine ausreichende AMPK-Aktivierung, schon ab einer Konzentration von 1-2 $\mu\text{g/ml}$ erzielt. In der Literatur wurden oft höhere Konzentrationen hierfür benützt (Wong et al., 2004 und 2009). In C2C12 Maus-Myotubes konnte weder bei 1 $\mu\text{g/ml}$ noch bei 3 $\mu\text{g/ml}$, sondern erst ab 10 $\mu\text{g/ml}$ CTRP6 eine ACC-Phosphorylierung gezeigt werden (Wan et al., 2010). CTRP3 und 6 hingegen weisen in adulten Rattenkardiomyozyten schon ab geringeren Konzentrationen eine ACC-Aktivierung auf.

Mit diesen gewonnenen Fakten bleibt weiterhin offen, wie die Diskrepanz im Zeitverlauf der CTRP vermittelten AMPK- und ACC-Phosphorylierung zu erklären ist. Warum induziert CTRP9 eine Verzehnfachung der AMPK-, gleichzeitig nur eine Verdopplung der ACC-Phosphorylierungsrate. Aufschlussreich wäre es auch zu wissen, ob mit einem AMPK-Inhibitor die CTRPs trotzdem solch ausgeprägte ACC-Phosphorylierung induzieren. Daraus könnten Rückschlüsse gezogen werden, ob gleichzeitig neben dem *AMPK-ACC-Signalweg*, auch andere Signalkaskaden durch CTRPs angetrieben werden.

5.6 Potenzieller Einfluss des AdipoR1 bzw. AdipoR2 im Rahmen der CTRP vermittelten Effekte

Da die Erstbeschreibung der CTRPs knapp zehn Jahre her ist (Wong et al., 2004), werden gegenwärtig laufend neue Erkenntnisse über die CTRPs gewonnen. Ungeklärt ist bisher immer noch, über welche(n) Rezeptor(en) die vielfältigen Effekte vermittelt werden. Für Adiponektin sind die ubiquitär vorhandenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 beschrieben.

Details, die in dem Zusammenhang zwischen CTRPs und den Adiponektin-Rezeptoren nicht außeracht gelassen werden können, sind einerseits die Ähnlichkeit zum Adiponektin und andererseits die Fähigkeit mit Adiponektin Heteromere zu bilden. Für CTRPs mit diesen Eigenschaften könnten die Adiponektin-Rezeptoren eine größere Rolle spielen als für CTRP5, das im Vergleich zu CTRP9 weder eine große Homologie zum Adiponektin hat noch Komplexe mit Adiponektin zu bilden vermag (Wong et al., 2004 und 2008). Vor diesem Hintergrund zeigte sich in der CTRP5 vermittelten AMPK- und ACC-Phosphorylierung kein Unterschied zwischen Myozyten mit siRNA vermitteltem AdipoR1- und AdipoR2-Knockdown und Kontroll-Myozyten (Park et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurde kürzlich gezeigt, dass durch eine siRNA vermittelte

AdipoR1 Proteinhemmung um über 60% in HUVECs (human umbilical vein endothelial cells), die CTRP9 induzierte AMPK-Aktivierung nicht mehr detektierbar ist. Bei der AdipoR2 Hemmung durch siRNA konnte dieser Effekt interessanterweise nicht reproduziert werden (Qijun et al., 2011).

Der *Rezeptorfrage* der CTRPs sollte im Rahmen dieser Arbeit darüberhinaus nachgegangen werden, jedoch ergaben sich methodische Herausforderungen, sodass nur die Vorversuche erfolgreich durchgeführt werden konnten. Ursache hierfür ist die hohe Empfindlichkeit der Zellmembran der adulten Kardiomyozyten und die daraus resultierenden Schwierigkeiten, welche in 4.4 kurz erklärt wurden.

Aktuell wird im Rahmen anderer Versuche in der AG von Fr. Prof. Dr. Rohrbach ein siRNA vermittelter Knockdown mittels Viren erprobt. Weiterführende Versuche mit z.B. AdipoR1- und AdipoR2-Knockout-Mäusen müssen unternommen werden, um Rückschlüsse über das Ligand-Rezeptor-Verhältnis der einzelnen CTRPs zu gewinnen.

6 Forschungsperspektiven und Schlussfolgerungen

Abschließend sollen Forschungsperspektiven aufgezeigt werden, die über die in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse hinausgehen, aber dennoch als zusammengehörig betrachtet werden können. Exemplarisch soll dies anhand von auserwählten CTRPs erfolgen.

Bei Adipositas kommt es zur gesteigerten Expression der meisten Adipozytokine. Im Gegensatz dazu ist das Adiponektin bei Adipositas herabreguliert, was sich positiv auf die Entstehung von Folgeerkrankungen auswirkt. Vielmehr konnte dem Adiponektin protektive Eigenschaften auf die Entstehung von metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben werden (Hui et al., 2012; Lee und Kwak, 2014).

In aktuellen Arbeiten von Yi et al. konnten in Mäusen auch durch CTRP3 protektive Effekte auf die pathophysiologischen Prozesse des kardialen Remodellings verzeichnet werden. Im Mausmodell wurde durch chronische Ligation der Koronararterien eine Reduktion der CTRP3-Expression gemessen. Wurde durch CTRP3-Protein-Infusionen der CTRP3-Spiegel wiederhergestellt, konnte eine Verbesserung der kardialen Funktion und eine verringerte Narbenbildung nach einem Herzinfarkt aufgezeigt werden. Dieser molekulare Mechanismus scheint durch eine erhöhte Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A)-Produktion bedingt zu sein. Ferner konnte beschrieben werden, dass dieser CTRP3 vermittelte Effekt mit einer vermehrten Akt- (Proteinkinase B) Phosphorylierung und gesteigerter Hypoxie-induzierter Faktor-1 (HIF-1)-Expression einhergeht. Dieser Effekt wurde auch in kultivierten Mauskardiomyozyten aufgezeigt (Yi et al. 2012). Resultierend kann somit neben dem Adiponektin auch dem CTRP3 proangiogene und kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden.

In weiteren aktuellen *in vitro*- als auch *in vivo*-Experimenten konnte durch kontrollierte Verabreichung von CTRP9 an Mauskardiomyozyten eine geringere hypoxiebedingte Apoptoserate festgestellt werden. Dieser Effekt scheint AMPK und AdipoR1 vermittelt zu sein, da er sowohl bei einer AMPK-Blockade als auch beim AdipoR1-Knockdown weniger stark ausgefallen ist. Darüber hinaus konnte im Maus-Infarktmodell durch eine *i.v.* Einmalgabe von rekombinantem CTRP9 eine Verringerung der Infarktgröße detektiert werden (Kambara et al., 2012). Weitere Experimente im Infarkt-Mausmodell konnten zeigen, dass eine exogene Supplementierung von CTRP9, gemessen am LVEF

(Links-ventrikuläre Ejektionsfraktion) eine Verbesserung der Herzleistung bewirkt und, mittels TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) bestimmt, eine Reduzierung der apoptotischen Kardiomyozyten hervorgerufen hat (Su et al., 2013). Somit entsteht eine neuartige Perspektive über die Wirkung von z.B. exogen zugeführtem CTRP9 im Kontext bestimmter kardiovaskulärer Erkrankungen.

Kürzlich konnten unabhängige Forschergruppen dem CTRP12, das auch als Adipolin (adipose-derived insulin-sensitizing factor) bezeichnet wird, antidiabetogene Eigenschaften zuschreiben. Folglich stellt CTRP12 für die Wissenschaftler ein neues Zielmolekül für die Entwicklung neuer Therapeutika bei bestehender Insulinresistenz und Diabetes dar (Enomoto et al., 2011; Zhikui et al., 2012).

Durch die Gabe von rekombinantem CTRP13 konnte eine insulinähnliche Glukoseaufnahme und eine Hemmung der Glukoneogenese erzielt werden. Weiter konnte durch eine gleichzeitige Gabe von Insulin und rekombinantem CTRP13 eine vermehrte Glukoseaufnahme in Adipozyten gemessen werden. Diese war höher als dies durch eine Monotherapie mit Insulin oder CTRP13 möglich gewesen wäre (Zhikui et al., 2011). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Insulin und CTRP13 synergistische Effekte besitzen, was ebenfalls neue Möglichkeiten zur Behandlung eines Diabetes mellitus eröffnet.

Betrachtet man die hier aufgeführten Effekte von ausgewählten CTRPs genauer, so sieht man im Mausmodell nicht nur metabolische, sondern auch antiapoptotische, proangiogene und kardioprotektive Effekte. Diese neuesten Ergebnisse sind von großem klinischem Interesse, da neue erfolgsversprechende therapeutische Ansätze entstehen können. Dies verdeutlicht somit die Wichtigkeit weiterer Forschungsarbeiten im Bereich CTRP aktivierten Signalkaskaden auch im Hinblick auf die Frage, ob CTRPs in Situationen mit einem Adiponektin-Defizit z.B. bei Adipositas lokal kompensierend wirken.

7 Zusammenfassung – deutsch

Im Gegensatz zum Adiponektin ist die Expression der CTRPs nicht nur auf das Fettgewebe beschränkt. CTRPs scheinen in verschiedenen Organen exprimiert zu werden, wobei die zellspezifische Expression noch nicht ausreichend untersucht worden ist.

Die mRNA-Expression von CTRPs in Kardiomyozyten, kardialen Endothelzellen und Fibroblasten von erwachsenen Ratten wurde mit RT-PCR untersucht. Die meisten CTRPs sind im linken Ventrikel exprimiert, wobei Kardiomyozyten in erster Linie CTRP9, 12 und 13 exprimieren. Kardiale Endothelzellen weisen eine deutliche mRNA-Expression von CTRP1, 5, 6, 7, 12 und 15 auf, während Fibroblasten weitestgehend alle analysierten CTRPs exprimieren. Zusätzlich wurde in den gleichen Zelltypen die mRNA-Expression von AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin analysiert. Die mRNA-Expression aller drei war in kardialen Endothelzellen am höchsten. Weiterführend wurde die zellspezifische kardiale mRNA-Expression ausgewählter CTRPs in jungen Ratten (6 Monate) mit oder ohne kalorischer Restriktion (-30% kcal für 3 Monate) und alten Ratten (27 Monate) miteinander verglichen. Die Expression von CTRP1, 5 und 9 war in den Endothelzellen der alten Ratten höher wie in den Endothelzellen der jungen. Im Gegensatz dazu ist die Expression von CTRP9 in Kardiomyozyten der jungen Ratten höher als in den der alten Ratten. In den kardialen Fibroblasten scheinen die genannten Faktoren keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der CTRPs zu nehmen.

Adulte Rattenkardiomyozyten wurden mit rekombinantem Adiponektin und CTRP1, 2, 3, 6, 7, 9, 10 in Abhängigkeit der Zeit und Konzentration stimuliert. Adiponektin und die meisten der untersuchten CTRPs konnten die AMPK und die ACC phosphorylieren. Die zeitabhängige Phosphorylierung dieser beiden war signifikant unterschiedlich. Die konzentrationsabhängige Phosphorylierung von AMPK und ACC war i.d.R. bei einer Konzentration von 2 µg/ml der verwendeten CTRPs signifikant. Mit der Verwendung von spezifischer siRNA konnte in adulten Kardiomyozyten ein signifikanter Knockdown der mRNA-Expression von AdipoR1 und AdipoR2 erzielt werden.

Obwohl die Erstbeschreibung der CTRPs keine zehn Jahre zurückliegt, konnte bereits einigen CTRPs u.a. eine insulinresistente und kardioprotektive Eigenschaft zugeschrieben werden. Weitere Untersuchungen müssen allerdings folgen, um die genaue Rolle der CTRPs bei der Entstehung der Adipositas und des Metabolischen Syndroms zu erklären.

8 Zusammenfassung – englisch

Unlike adiponectin the CTRP expression is not restricted to the adipose tissue. CTRPs seem to be widely expressed in different rat organs. The cell specific expression has not been conclusively investigated. Differential expression of most of the CTRPs was analyzed in adult rat cardiomyocytes, cardiac endothelial cells and fibroblast. Most CTRPs are expressed in the left ventricle, but cardiomyocytes express mainly CTRP9, 12 and 13 and only low levels of CTRP2, 5, 7 and 15. Endothelial cells demonstrate high levels of CTRP1, 5, 6, 7, 12 and 15, while fibroblasts express all analysed CTRPs with the exception of CTRP9 and 13. In addition to these data we analyzed the expression of AdipoR1, AdipoR2 and T-Cadherin in the same cell types. All of the three were most highly expressed in endothelial cells. However, the expression of AdipoR1 is quite similar to cardiomyocytes and endothelial cells. Furthermore, the cardiac expression of selected CTRPs was compared in these cell types isolated from left ventricles of young (6 months) and old rats (27 months), receiving either control diet or caloric restriction (-30%) for 3 months. The expression of CTRP1, 5 and 9 is higher in cardiac ECs from old rats compared to ECs from young rats but not modified after caloric restriction. The expression of CTRP9 in cardiomyocytes is higher in young rats compared to cardiomyocytes from old rats, while no major age or diet-related expressional changes were observed in cardiac fibroblast.

Adult rat cardiomyocytes were stimulated with full-length CTRP1, 2, 3, 6, 7, 9, 10 or recombinant adiponectin in a time- and dose-dependent manner. Adiponectin and most of the investigated CTRPs were able to phosphorylate AMPK at Thr172 and ACC at Ser79. The time-course of AMPK and ACC activation was significantly different between the CTRPs. The dose-dependent AMPK and ACC phosphorylation was mostly significant at a dose of 2 µg/ml of the used CTRPs.

We conducted preliminary tests and suppressed the expression of AdipoR1- and AdipoR2-mRNA in adult cardiomyocytes by using siRNA oligonucleotides.

However, in contrast to the numerous studies on adiponectin, the metabolic and clinical significance of CTRPs is essentially unknown. Thus, future basic science- and clinical investigations are required to clarify the association between these CTRPs and various disease processes as metabolic syndrome.

9 Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktureller Aufbau des C1q-Moleküls. Modifiziert nach Kishore et al., 2004	10
Abbildung 2: Einfluss von Adiponektin in Skelettmuskelzellen. Modifiziert nach Tadashi et al., 2009.	14
Abbildung 3: Strukturelle Organisation der CTRPs. Modifiziert nach Schaeffler und Buechler, 2012.....	15
Abbildung 4-40: Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche	

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1a: Primäre Antikörper.....	21
Tab. 1b: Sekundärer Antikörper.....	21
Tab. 2: Verwendete Primer.....	22
Tab. 3: Verwendete siRNA.....	23
Tab. 4: Herstellung vom Vor- und Ausplattiermedium.....	24
Tab. 5: Herstellung des CCT-Mediums.....	25
Tab. 6: Transfektionsansatz.....	27
Tab. 7a: 1. Reaktionsansatz für cDNA-Synthese.....	29
Tab. 7b: 2. Reaktionsansatz für cDNA-Synthese.....	29
Tab. 8: Ansatz für Standard-PCR und 18S.....	30
Tab. 9: PCR-Schritte.....	30
Tab. 10: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.....	32
Tab. 11: Ansatz für TBS-T, Lauf- und Blotpuffer.....	33
Tab. 12: Herstellung des primären und sekundären Antikörpers.....	33
Tab. 13: Herstellung der ECL-Lösung.....	34

10 Literaturverzeichnis

- Adams J., Chen Z.P., Van Denderen B.J., Morton C.J., Parker M.W., Witters L.A., Stapleton D., Kemp B.E. „Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site.“ *Protein Sci.* 13(1): (2004): 155-65.
- Arad M., Seidman C.E., Seidman J.G. „AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease.“ *Circulation research* 100 (2007): 474–488.
- Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Hotta K., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T., Matsuzawa Y. „Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.“ *Biochem Biophys Res Commun*, 1999: 79-83.
- Ausubel F. M. „Current Protocols in Molecular Biology.“ 1987, Media, Pa. Greene Publishing Associates J. Wiley.
- Ayyagari R., Nawajes A. M., Athanasios J. K., Lianchun C., N. C., McLaren, M. Lichter, D. T. Wong, P. F. Hitchcock, Rafael C. C. S. E. M., Irene H. M. and Paul A. S. „Late-onset macular degeneration and long anterior lens zonules result from a CTRP5 gene mutation.“ *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2005: 3363–3371.
- Blüher, M. „The distinction of metabolically healthy from unhealthy obese individuals.“ *Current Opinion in Lipidology*, 2010: 38-43.
- Boucher P., Herz J. „Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond.“ *Biochem Pharmacol.* 81(1) (2011): 1-5.
- Chavali V.R., Khan N.W., Cukras C.A., Bartsch D.U., Jablonski M.M., Ayyagari R. „A CTRP5 gene S163R mutation knock-in mouse model for late-onset retinal degeneration.“ *Human Molecular Genetics*, 2011: 2000-2014.
- Chen Z.P., Mitchelhill K.I., Michell B.J., Stapleton D., Rodriguez-Crespo I., Witters L.A., Power D.A., Ortiz de Montellano P.R., Kemp B.E. „AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase.“ *FEBS Lett.* 443(3): (1999): 285-9.
- Cheng S.W., Fryer L.G., Carling D., Shepherd P.R. „Thr2446 is a novel mammalian

- target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status.“ *J Biol Chem.* 279(16): (2004): 15719-22.
- Combs T. P., A. H. Berg, S. Obici, P. E. Scherer, and L. Rossetti. „Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30.“ *J Clin Invest*, 2001: 1875-1881.
- Compton, S.A. and Cheatham, B. „CTRP-3: blocking a toll booth to obesity-related inflammation.“ *Endocrinology*, 2010: 5095–5097.
- Cooper J. D, Smyth D.J., Smiles A.M., Plagnol V., Walker N.A., Allen J., Downes K., Barrett J.C., Healy B., Mychaleckyj J.C., Warram J.H. and Todd J.A. „Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci.“ *Nature Genetics*, 2008: 1399-1401.
- Daimon M., Oizumi T., Saitoh T., Kameda W., Hirata A., Yamaguchi H., Ohnuma H., Igarashi M., Tominaga M., Kato T., und Funagata Study. „Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study.“ *Diabetes Care* 26(7): (2003): 2015-20.
- Di Stefano V., Giacca M., Capogrossi M.C., Crescenzi M., Martelli F. „Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle.“ *J Biol Chem.* 286(10): (2011): 8644-54.
- Enomoto T., Ohashi K, Shibata R., Higuchi A., Maruyama S., Izumiya Y, Walsh K., Murohara T. and Ouchi N. „Adipolin/C1qdc2/CTRP12 Protein Functions as an Adipokine That Improves Glucose Metabolism.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2011: 34552–34558.
- Eyre S., Hinks A., Bowes J., Flynn E., Martin P., Wilson A.G., Morgan A.W., Emery P., Steer S., Hocking L.J., Reid D.W., Worthington J., Barton A. „Overlapping genetic susceptibility variants between three autoimmune disorders: rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and coeliac disease.“ *Arthritis Research & Therapy*, 2010: 6.
- Fain J.N., Madan A.K., Hiler M.L., Cheema P., and Bahouth S.W. „Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese human.“ *Endocrinology*, 2004: 2273-2282.
- Fried S.K., Bunkin D.A., Greenberg A.S. „Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid.“ *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998): 847–850.
- Fruebis J., Tsao T.S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M.R., Yen F.T., Bihain

- B.E., and Lodish H.F. „Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001: 2005-2010.
- Gold L.I., Eggleton P., Sweetwyne M.T., Van Duyn L.B., Greives M.R., Naylor S.M., Michalak M., Murphy-Ullrich J.E. „Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease.“ *FASEB J.* 24: (2010): 665–683.
- Greenwood M.R.C., Johnson, P.R. „The adipose tissue.“ *Histology, Cell and Tissue Biology. In: Weiss, L. (Ed.)*, Nr. 5: (1983): 178–199.
- Guerre-Millo, M. „Extending the glucose/fatty acid cycle: a glucose/adipose tissue cycle.“ *Biochemical Society Transactions*, 2003: 1161-1164.
- Ha J., Daniel S., Broyles S.S., Kim K.H. „Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity.“ *J Biol Chem.* 269(35): (1994): 22162-8.
- Hardie, D.G. „The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status.“ *Endocrinology* 144(12): (2003): 5179-83.
- Hawley S.A., Davison M., Woods A., Davies S.P., Beri R.K., Carling D., Hardie D.G. „Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which phosphorylates AMP-activated protein kinase.“ *J Biol Chem.* 271 (44): (1996): 27879-87.
- Hotta K., Funahashi T., Arita Y., Takahashi M., Matsuda M., Okamoto Y., Iwahashi H., Kuriyama H., Ouchi N., Maeda K., Nishida M., Kihara S., Sakai N., Nakajima T., Hasegawa K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Nakamura T., Yamashita S., Hanafusa T., Matsuzawa Y. „Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients.“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000: 1595-1599.
- Hu E., Liang P., Spiegelman B.M. „AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.“ *J Biol Chem*, 1996: 10697-10703.
- Hug C., Wang J., Ahmad N.S., Bogan J.S., Tsao T-S, and Lodish H.F. „T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004: 10308-10313.
- Jun Ho Jeon, Kun-yong Kim, Jae Hyeong Kim, Ahmi Baek, Hyungin Cho, Young Ho Lee, Jong Wan Kim, Dohee Kim, Seung Hyun Han, Jong-Seok Lim, Keun Il Kim, Do Young Yoon, Soo-Hyun Kim, Goo Taeg Oh, Eunjoon Kim, and Young Yang. „A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production.“ *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2008: 1502-15011.

- Kadowaki T., Yamauchi T. „Adiponectin and adiponectin receptors.“ *Endocrine Reviews*, 2005: 439-451.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. „Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.“ *J Clin Invest*, 2006: 1784-1792.
- Kambara T., Ohashi K., Shibata R., Ogura Y., Maruyama S., Enomoto T., Uemura Y., Shimizu Y., Yuasa D., Matsuo K., Miyabe M., Kataoka Y., Murohara T., Ouchi N. „CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent mechanism.“ *J Biol Chem*. 287(23): (2012): 18965-73.
- Kannel W.B. „Lipids, diabetes and coronary heart disease: insights from the Framingham Study.“ *American Heart Journal* 110 (1985): 1100–1107.
- Kershaw E.E., and J.S. Flier. „Adipose Tissue as an Endocrine Organ.“ *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004: 2548–2556.
- Kim Kun-yong, Hwa Young Kima, Jae Hyeong Kima, Chul-Ho Leeb, Do-Hyung Kimc, Young Ho Leed, Seung Hyun Hane, Jong-Seok Lima, Dae Ho Choa, Myeong-Sok Lee, Sukjoon Yoona, Keun Il Kima, Do-Young Yoonf, Young Yanga. „Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increases CTRP1 expression in adipose tissue.“ *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2006: 3953-3960.
- Kim Mi-Jin, Wan Lee, Eun-Ju Park, Seung-Yoon Park. „C1qTNF-related protein-6 increases the expression of interleukin-10 in macrophages.“ *Molecules and Cells*, 2010: 59-64.
- Kishore U., and Reid K.B. „Modular organization of proteins containing C1q-like globular domain.“ *Immunopharmacology* 42(1-3) (1999): 15-21.
- Kishore U., Gaboriaud C., Waters P., Shrive A.K., Greenhough T.J., Reid K.B., Sim R.B., Arlaud G.J. „C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility.“ *Trends Immunol*, 2004: 551-561.
- Kopp A., Bala M., Buechler C., Falk W., Gross P., Neumeier M., Schölmerich J., Schäffler A. „C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue.“ *Endocrinology* 151 (2010): 5267–5278.
- Lasser G., Guchhait P., Ellsworth J.L., Sheppard P., Lewis K., Bishop P., Cruz M.A.,

- Lopez J.A., Fruebis J. „C1qTNF-related protein-1 (CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen.“ *Blood*, 2006: 423–430.
- Lee S., and Kwak H-B. „Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease.“ *J Exerc Rehabil.* 10(2): (2014): 54–59.
- Maeda K., Okubo K., Shimomura I., Funahashi T., Matsuzawa Y., Matsubara K. „cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1).“ *Biochem Biophys Res Commun*, 1996: 286-289.
- Maeda N., Takahashi M., Funahashi T., Kihara S., Nishizawa H., Kishida K., Nagaretani H., Matsuda M, Komuro R., Ouchi N., Kuriyama H., Hotta K., Nakamura T., Shimomura I., Matsuzawa Y. „PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein.“ *Diabetes* 50(9): (2001): 2094-9.
- Maeda T., Makoto A., Kojiro K., Akitoshi J. and Souhei F. „Molecular cloning and characterization of a novel gene, CORS26, encoding a putative secretory protein and its possible involvement in skeletal development.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2001: 3628-3634.
- Matsubara M., K. Namioka, and S. Katayose. „Decreased plasma adiponectin concentrations in women with low-grade C-reactive protein elevation.“ *Eur J Endocrinol.* 148 (2003): 657-62.
- Muoio C.B., Newgard D.M. „Obesity-related derangements in metabolic regulation.“ *Annual Review of Biochemistry*, 2006: 367-401.
- Nakano Y., Tobe T., Choi-Miura N.H., Mazda T., Tomita M. „Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma.“ *J Biochem*, 1996: 803-812.
- Okamoto, Y., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and P. Libby. „Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome.“ *Clinical Science*, 2006: 267-278.
- Ouchi N., Ohishi M., Kihara S., Funahashi T., Nakamura T., N. H, K. M., O. K., O. Y., N. H., K. K, M. K., N. A., K. H., H. H., K. N., K. M., R. H., Ogihara T., Matsuzawa Y., „Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity.“ *Hypertension*, 2003: 231-4.
- Ouchi N., S. Kihara, T. Funahashi, T. N., M. N., M. K., Y. O., K. O., H. N., K. K., H. N.,

- N. M., H. K., H., H., und Y. Matsuzawa. „Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue.“ *Circulation* 107 (2003): 671-4.
- Park S.H., Gammon S.R., Knippers J.D., Paulsen S.R., Rubink D.S., Winder W.W. „Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle.“ *Journal of Applied Physiology*, 2002: 2475-82.
- Park S.H., Choi J.H, Ryu H.S., Pak Y.K., Park K.S., Lee H.K. „C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2009: 27780-27789.
- Peterson J. M., Wei Z., and Wong G.W. „C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3): a novel adipokine that regulates hepatic glucose output.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2010: 39691-39671.
- Peterson J.M., Aja S., Wei Z., Wong G.W. „CTRP1 protein enhances fatty acid oxidation via AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibition.“ *J Biol Chem.* 287(2): (2012): 1576-87.
- Piñeiro R., Iglesias M.J., Gallego R., Raghay K., Eiras S., Rubio J., Diéguez C., Gualillo O., González-Juanatey J.R., Lago F. „Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes.“ *FEBS* 579(23): (2005): 5163-9.
- Piper H.M., Probst I., Schwartz P., Hutter F.J., Spieckermann P.G. „Culturing of Calcium stable adult cardiac myocytes.“ *Journal of molecular and cellular cardiology* 14: (1982): 397-412.
- Pischon T., Girman C.J., Hotamisligil G.S., Rifai N., Hu F.B., Rimm E.B. „Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men.“ *JAMA* 291(14) (2004): 1730-7.
- Pradhan A.D., Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. „C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.“ *JAMA* 286 (2001): 327–334.
- Reid K.B., Kishore U. „Modular organization of proteins containing C1q-like globular domain.“ *Immunopharmacology*, 1999: 15-21.
- Schäffler A., Ehling A., Neumann E., Herfarth H., Tarner I, Gay I., Schölmerich J., Müller-Ladner U. „Genomic organization, chromosomal localization and adipocytic expression of the murine gene for CORS-26 (collagenous repeatcontaining sequence of 26 kDa protein).“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003: 64-70.

- Schäffler A., Weigert J., Neumeier M., Schölmerich J., Buechler C. „Regulation and function of collagenous repeat containing sequence of 26-kDa protein gene product "cartonectin".“ *Obesity*, 2007: 303-313.
- Schäffler A, Buechler C. „CTRP family: linking immunity to metabolism.“ *Cell*, 2012: 194-204.
- Scherer P.E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, und H.F. Lodish. „A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes.“ *J Biol Chem.*, 1995: 26746-26749.
- Scherer P.E., Shapiro L. „The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor.“ *Current Biology*, 1998: 335-338.
- Schrier, R.W. „Optimal care of autosomal dominant polycystic kidney disease patients.“ *Nephrology (Carlton)*, 2006: 124–130.
- Seldin M. M., Peterson J.M., Byerly M.S., Wei Z., and Wong G.W. „Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 2012: 11968-11980.
- Spranger J., Kroke A., Möhlig M., Bergmann M.M., Ristow M., Boeing H., Pfeiffer A.F. „Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus.“ *Lancet* 361(9353): (2003): 226-8.
- Su H., Yuan Y., Wang X-M, Lau W.B., Wang Y., Wang X., Gao E., Koch W.J., Ma X-L. „Inhibition of CTRP9, a novel and cardiac-abundantly expressed cell survival molecule, by TNF α -initiated oxidative signaling contributes to exacerbated cardiac injury in diabetic mice.“ *Basic Research in Cardiology*, 2013: 1-12.
- Takemura Y., Ouchi N., Shibata R., Aprahamian T., Kirber M.T., Summer R.S., Kihara S., Walsh K. „Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies.“ *J Clin Invest.*, 2007: 375–86.
- Tarr J.M., Winyard P.G., Ryan B., Harries L.W., Haigh R., Viner N., Eggleton P. „Extracellular calreticulin is present in the joints of rheumatoid arthritis patients and inhibits FasL (CD95L) mediated apoptosis of T cells.“ *Arthritis & Rheumatism*, 2010: 2919-29.
- Tsuchida A., Yamauchi T., Ito Y., Hada Y., Maki T., Takekawa S., Kamon J., Kobayashi M., Suzuki R., Hara K., Kubota N., Terauchi Y., Froguel P., Nakae J., Kasuga M., Accili D., Tobe K., Ueki K., Nagai R., Kadowaki T. „Insulin/Foxo1 pathway

- regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 2004: 30817–30822.
- Wan Lee, Mi-Jin Kim, Eun-Ju Park, Young-Jin Choi, Seung-Yoon Park. „C1qTNF-related protein-6 mediates fatty acid oxidation via the activation of the AMP-activated protein kinase.“ *Federation of American Societies for Experimental Biology Letters*, 2010: 968-972.
- Wei Z., Peterson J.M., Lei X., Cebotaru L., Wolfgang M.J., Baldeviano G.C. and Wong G.W. „C1q/TNF-related Protein-12 (CTRP12), a Novel Adipokine that Improves Insulin Sensitivity and Glycemic Control in Mouse Models of Obesity and Diabetes.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 2012: 10301-10315.
- Wei Zhikui, Jonathan M. Peterson and G. William Wong. „Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation of AMP-activated protein kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling.“ *J. Biol. Chem.*, 2011: 15652–15665.
- Wong G.W., Wang J., Hug C., Tsao T.S., Lodish H.F. „A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004: 10302-10307.
- Wong G.W., Krawczyk S.A., Kitidis-Mitrokostas C., Revett T., Gimeno R., Lodish H.F. „Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions.“ *Biochemical Journal*, 2008: 161-177.
- Wong G.W., Krawczyk S.A., Kitidis-Mitrokostas C., Ge G., Spooner E., Hug C., Gimeno R., Lodish H.F. "Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin." *The FASEB Journal*, 2009: 241–258.
- Yamauchi T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. A., O. G., C. V., M. L. R., H. K., K. S., M. Y., Y. N., K. T., R. N., S.K., K. T., R. N., S.K., M. T., P. F., and T. Kadowaki. „The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity.“ *Nature Medicin* 7 (2001): 941-946.
- Yamauchi T., Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H,... Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R., Kadowaki T. „Cloning of

- adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.“ *Nature* 2003, 2003: 762-769.
- Yamauchi T., Nio Y., Maki T., Kobayashi M., Takazawa T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., Kawamoto S., Kubota N., Kubota T., Ito Y., Kamon J., Tsuchida K., Kumagai H., Kozono Y., Hada H., Ogata K., Tokuyama, Tsunoda M., Ide T.,... and Kadowaki T. „Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions.“ *Nature Medicine*, 2007: 332-339.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y et al. „Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.“ *Nat Med* 2002, 2008: 1288-1295.
- Yan Q., Murphy-Ullrich J.E., Song Y. „Structural insight into the role of thrombospondin-1 binding to calreticulin in calreticulin-induced focal adhesion disassembly.“ *Biochemistry*, 2010: 3685–3694.
- Yatagai T., Nagasaka S., Taniguchi A., Fukushima M., Nakamura T., Kuroe A., Nakai Y., Ishibashi S. „Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus.“ *Metabolism*, 2003: 1274-8.
- Yokota T., Kenji Oritani, Isao Takahashi, Jun Ishikawa, Akifumi Matsuyama, Noriyuki Ouchi, Shinji Kihara, Tohru Funahashi, Andrea J. Tenner, Yoshiaki Tomiyama and Yuji Matsuzawa. „Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages.“ *Blood*, 2000: 1723-1732.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. „Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.“ *Nature*, 1994: 425-432.
- Zheng Q., Yuan Y., Yi W., Lau W.B., Wang Y., Wang X., Sun Y., Lopez B.L., Christopher T.A., Peterson J.M., Wong G.W., Yu S., Yi D. and Ma X-L. „C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway.“ *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 2011: 2616–2623.
- Ziemke F., Mantzoros C.S. „Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research.“ *Am J Clin Nutr.*, 2010: 258-261.

11 Publikationsverzeichnis

11.1 Postervortrag:

Jakob Hanna, Ling Li, Benedikt Siegler, Bernd Niemann, Susanne Rohrbach
Characterization of expressional patterns and signaling pathways activated by
CTRP's in cardiac tissue. 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie
– Herz- und Kreislaufforschung e.V., Mannheim, 03.04.-06.04.2013

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Mithilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Diese Promotionsarbeit wurde von Oktober 2010 bis November 2013 im Physiologischen Institut der Justus Liebig Universität unter der Leitung von Prof. Dr. med. S. Rohrbach durchgeführt.

Frau Prof. Dr. med. S. Rohrbach danke ich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Dissertationsthemas und die wissenschaftliche Betreuung. Danken möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die ständige Unterstützung im Laboralltag. Daniela Schreiber möchte ich für die Präparation der Kardiomyozyten danken. Hervorheben möchte ich Frau Dr. L. Li, die mich im ganzen Zeitraum dieser Dissertationsarbeit intensiv betreut hat und ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Frau Prof. Dr. med. S. Rohrbach und Frau Dr. Ling Li möchte ich auch für das Korrekturlesen danken.

Mein höchster Dank gilt meinen Eltern und meiner Ehefrau Schmunie, deren immerwährende Unterstützung mir das Studium und diese Doktorarbeit ermöglichten. Dieser familiäre Rückhalt und das bedingungsloses Vertrauen *hat manche Durststrecke vergessen lassen.*

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**