

Rolle der C1q/TNF-related Proteins 1-13 im Stoffwechsel

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

vorgelegt von Ling Li
geboren am 12.07.1977
in Kunming Yunnan, China

Gießen (2012)

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

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Susanne Rohrbach

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 08.03.2013

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das metabolische Syndrom | 1 |
| 1.1.1 | Definition | 1 |
| 1.1.2 | Adipositas in der Pathogenese des metabolischen Syndroms | 1 |
| 1.1.3 | Die Bedeutung des Fettgewebes | 2 |
| 1.2 | Die C1q/TNF Proteinfamilie | 2 |
| 1.2.1 | Adiponektin, Adiponektinrezeptoren und metabolische Funktionen des Adiponektins | 3 |
| 1.2.2 | Die Adiponektin-Paraloge | 6 |
| 1.3 | Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) | 7 |
| 1.4 | Der Glukosetransporter | 8 |
| 1.5 | Fragestellung | 10 |
| 2. | Material | 11 |
| 2.1 | Verwendete Reagenzien | 11 |
| 2.2 | Primer | 13 |
| 2.3 | <i>Escherichia coli</i> Stämme | 14 |
| 3. | Methoden | 14 |
| 3.1 | Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion | 14 |
| 3.2 | Elektrophorese und Gelextraktion der PCR-Produkte | 15 |
| 3.3 | Klonierungsreaktion | 16 |
| 3.4 | Plasmidpräparation (Mini) | 17 |
| 3.5 | Restriktionsanalysen isolierter Plasmide | 17 |
| 3.6 | Sequenzierung | 18 |
| 3.7 | Plasmidpräparation (Midi) | 19 |
| 3.8 | LR-Rekombination | 19 |

| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.9 | Proteinexpression in <i>E. coli</i> mit Histidin-Tag und Isolierung des Proteins mittels Nickel-Säulen | 21 |
| 3.10 | Proteinexpression in <i>E. coli</i> mit Hilfe eines MBP-Fusionsproteins und Proteinisolierung mit Hilfe der Amylose-Säulen | 22 |
| 3.11 | Zellkultur und Zellstimulation | 22 |
| 3.12 | Transfektion in H9C2-Zellen | 23 |
| 3.13 | Gesamtproteinisolationen aus HEK293- und H9C2-Zellen | 24 |
| 3.14 | Isolation der Membranfraktion von H9C2-Zellen | 24 |
| 3.15 | Proteinelektrophorese und Western Blot | 25 |
| 3.16 | Konfokale Mikroskopie | 27 |
| 3.17 | Messung der Glukoseaufnahme | 28 |
| 3.18 | Statistische Verfahren | 29 |
| 4. | Ergebnisse | 30 |
| 4.1 | Identifizierung des Expressionsmusters von Adiponektin und der CTRP's in verschiedenen Rattengeweben | 30 |
| 4.2 | Generierungen rekombinanter CTRP-Protein in <i>E. coli</i> Zellen | 31 |
| 4.3 | Einfluss ausgewählter CTRP's auf die AMPK-Aktivierung in HEK293-Zellen | 33 |
| 4.4 | Einfluß der CTRP's auf die ACC-Phosphorylierung in HEK293-Zellen | 35 |
| 4.5 | Einfluß der CTRP's auf die AMPK- und ACC-Phosphorylierung in H9C2-Zellen | 37 |
| 4.6 | Einfluss einer AMPK-Hemmung auf die Wirkung von CTRP 7 und 9 in H9C2-Zellen | 39 |
| 4.7. | Einfluss von CTRP 7 und 9 auf die Translokation des Glukosetransporters 1 in H9C2-Zellen | 41 |
| 4.8 | Einfluss von CTRP 7 und 9 auf die Translokation des Glukosetransporters 4 in H9C2-Zellen | 44 |
| 4.9 | Einfluss von CTRP 7 und 9 auf die Glukoseaufnahme in H9C2-Zellen | 47 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.10 | Bedeutung des Adiponektinrezeptors 1 für die CTRP-Effekte in H9C2-Zellen | 49 |
| 5. | Diskussion | 52 |
| 5.1 | Die <i>in vivo</i> Verteilung von Adiponektin und CTRP's | 52 |
| 5.1.1 | Die Expression von Adiponektin und CTRP's in verschiedenen Geweben | 52 |
| 5.1.2 | Die Einflussfaktoren der Verteilung von Adiponektin und CTRP's | 53 |
| 5.2 | Die <i>in vitro</i> Wirkung der CTRP's auf AMPK und ACC | 54 |
| 5.2.1 | Die Veränderung der Phosphorylierung der AMPK und der ACC nach Stimulation mit CTRP's | 54 |
| 5.2.2 | Mögliche Regulationsmechanismen der AMPK und der ACC | 57 |
| 5.3 | CTRP's und metabolische Effekte | 58 |
| 5.3.1 | Versuchsbedingung | 58 |
| 5.3.2 | Wirkung von CTRP's auf der Translokation der Glukosetransporter und die Glukoseaufnahme | 60 |
| 5.4 | CTRP's und Adiponektinrezeptoren <i>in vitro</i> | 62 |
| 6. | Schlussfolgerungen | 64 |
| 7. | Zusammenfassung | 65 |
| 7. | Summary | 66 |
| 8. | Abkürzungsverzeichnis | 67 |
| 9. | Literatur | 69 |
| 10. | Publikationen und Kongressbeiträge | 76 |
| 10.1 | Publikationen in Zeitschriften mit Peer Review Verfahren | 76 |
| 10.2 | Kongressbeiträge | 76 |
| 11. | Eidesstattliche Erklärung | 78 |
| 12. | Danksagung | 79 |

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

1.1.1 Definition

Die ständige Verfügbarkeit und veränderte Zusammensetzung der Nahrung sowie die unzureichende körperliche Aktivität prägen den Lebensstil vieler Menschen in den Industrienationen. Diese Lebensweise führt zum sogenannten metabolischen Syndrom, welches verschiedene Risikofaktoren für kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen zusammenfasst (Meigs 2004; Bergman, Kim et al. 2007). Die Charakterisierung des metabolischen Syndroms unterscheidet sich jedoch in den unterschiedlichen Fachgesellschaften. Durch die internationale Diabetes-Föderation (IDF) wurde das metabolische Syndrom 2005 wie folgt definiert: ein erhöhter Bauchumfang (≥ 94 cm bei Männern bzw. ≥ 80 cm bei Frauen), verminderte Glukosetoleranz (Nüchternblutzuckerwert > 110 mg/dl), Hypertonie (> 130 mm Hg systolisch bzw. > 85 mm Hg diastolisch) oder erhöhte Triglyzeridwerte (> 150 mg/dl) und erniedrigtes HDL-Cholesterin (< 40 mg/dl bei Männern bzw. < 50 mg/dl bei Frauen) (Huang 2009).

1.1.2 Adipositas in der Pathogenese des metabolischen Syndroms

Das metabolischen Syndrom begünstigt die Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen. Aufgrund des bewegungsarmen Lebensstiles bei fett- und energiereicher Ernährung spielt Adipositas weltweit eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom. Wenn ein Body Mass Index (BMI) über 30 kg/m^2 vorliegt, spricht man von Adipositas (Bruffaerts, Demyttenaere et al. 2008). Zunehmende Adipositas ist mit verkürzter Lebenserwartung und mit einem besonders hohen kardiovaskulären Risiko assoziiert. Die Fettverteilung ist dabei für die Entwicklung von Folgeerkrankungen relevant. Die Zunahme des viszeralen Fettgewebes ist sowohl für metabolische Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes mellitus (Freemantle, Holmes et al. 2008) als auch kardiovaskuläre Veränderungen wie

Atherosklerose (Phillips and Prins 2008) von pathogenetischer Bedeutung. So wurde gezeigt, dass die Entfernung von viszeralem Fett die Insulinresistenz verbessern konnte, während die Entfernung von subkutanem Fett keine Verbesserung bewirkte (Fisher, Hoffstedt et al. 2002; Klein, Fontana et al. 2004).

1.1.3 Die Bedeutung des Fettgewebes

Das Fettgewebe wird in weißes und braunes Fettgewebe unterteilt. Braunes Fettgewebe, das eine hohe Zahl an Mitochondrien enthält, hat die Funktion der Wärmegeneration vor allem bei Neugeborenen. Beim Erwachsenen sind jedoch nur noch geringe Mengen braunes Fettgewebe nachweisbar (Fruhbeck 2008).

Fettgewebe besteht neben den Adipozyten aus stroma-vaskulärem Gewebe mit Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Präadipozyten. Es kann freie Fettsäuren aus der Nahrung speichern und während einer Hungerphase freisetzen. Neben der Funktion im Stoffwechsel hat Fettgewebe jedoch auch eine Funktion als endokrinologisches und immunmodulierendes Organ, welche insbesondere in den vergangenen Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt ist. Es sezerniert eine Vielzahl von Adipokinen, einer Gruppe von Hormonen und Proteinen, die z.B. am Glukose- und Lipidstoffwechsel oder an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Das erste entdeckte Fettgewebshormon ist das Leptin, das im Jahr 1994 erstmals beschrieben wurde und ein Peptidhormon mit einer Größe von 16 kDa ist (Zhang, Proenca et al. 1994). Massives Übergewicht führt zu einer Veränderung im Adipokinprofil, die zur Progredienz von Arteriosklerose und Insulinresistenz beitragen kann. Dies ist insbesondere durch eine verminderte Freisetzung protektiver Adipokine bedingt (Hajer, van Haefen et al. 2008).

1.2 Die C1q/TNF Proteinfamilie

Adiponektin, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu Vertretern der Tumor Necrosis Factor (TNF) Familie zeigt, ist das am stärksten vom Fettgewebe exprimierte Hormon. Die Bildung dieses Adipokins wird von der Fettgewebsmasse beeinflusst. Viele

Mitglieder der TNF-Familie weisen strukturelle Homologien zur C1q-Komplement-Familie auf. Deshalb werden beide Proteinfamilien als C1q/TNF-Superfamilie zusammengefasst (Shapiro and Scherer 1998). C1q ist das Schlüsselprotein des klassischen Weges des Komplementsystems. Die Struktur des C-terminalen Endes findet sich nicht nur bei C1q sondern auch bei Proteinen außerhalb des Komplementsystems wie z.B. einigen Kollagenisoformen oder Adiponektin. Die C1q/TNF Proteinfamilie zeichnet sich vor allem durch die C-terminale, globuläre Kopf-Domäne (gC1q-Domäne), die aus 140 Aminosäuren besteht, aus (Shapiro and Scherer 1998). Das C1q-Protein ist ein 460 kDa Protein mit 18 Polypeptidketten. Das Protein beinhaltet drei Untereinheiten, A, B, C, wobei sich jede Untereinheit aus einer kurzen N-terminalen Region und einer anschließenden Kollagendomäne zusammensetzt (Kishore and Reid 1999). Die gC1q-Domäne ist für die Reaktion von C1q mit dem Antigen-gebundenen Antikörper und das Auslösen der Komplementkaskade verantwortlich (Kojouharova, Reid et al. 2010).

1.2.1 Adiponektin, Adiponektinrezeptoren und metabolische Funktionen des Adiponektins

Kurz nach der Entdeckung von Leptin wurde das Adiponektin im Jahr 1995 beschrieben. Auch dieses ist ein Peptidhormon und hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Adiponektin besteht aus 247 Aminosäuren und besitzt eine C1q Domäne. Es weist vier verschiedene strukturelle Komponenten auf: Eine C-terminale globuläre Domäne, eine variable Region, eine Kollagendomäne und eine N-terminale Signalsequenz (Scherer, Williams et al. 1995; Trujillo and Scherer 2005). Beim humanen Adiponektin handelt es sich um eine Reihe verschiedener Isoformen. Adiponektin kommt im Serum als Low Molecular Weight (LMW), Medium Molecular Weight (MMW) und High Molecular Weight (HMW) Form vor (Waki, Yamauchi et al. 2003). Die LMW Form besteht als Grundeinheit aus einem Homotrimer (90 kDa). Mehrere Homotrimere können sich durch Disulfidbrücken, deren Ausbildung aus der Bindung zwischen den Kollagendomänen zweier Homotrimere am Cystein besteht, zu multimeren Isoformen

zusammenlagern. Die Bildung der LMW Form wird durch Cystein in der globulären Domäne stabilisiert, während die Formation der MMW und HMW Adiponektinisoformen durch Cystein im Bereich der Kollagen-Domäne erfolgt (Scherer, Williams et al. 1995; Waki, Yamauchi et al. 2003). Die MMW-Isoform des Hormons liegt als Hexamer mit einem Molekulargewicht von 180 kDa vor. Mit einer Größe von mehr als 400 kDa besteht die HMW-Isoform aus vier bis sechs Homotrimeren. Diese drei Komplexe machen nahezu 0,01% des gesamten Serumproteins aus und haben unterschiedliche biologische Aktivität und Funktion (Whitehead, Richards et al. 2006). Im Jahr 2003 wurden zwei Adiponektinrezeptoren (Yamauchi, Kamon et al. 2003), AdipoR1 und AdipoR2, identifiziert. Diese besitzen sieben Transmembran-Domänen, ähnlich wie die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wobei das C-terminale Ende extrazellulär und das N-terminale Ende im Zytoplasma lokalisiert ist. AdipoR1 kommt hauptsächlich in der Skelettmuskulatur vor. Hingegen wird AdipoR2 vor allem in der Leber exprimiert. Während an den AdipoR1 überwiegend globuläres Adiponektin bindet, dient AdipoR2 als Rezeptor sowohl für das globuläre als auch für das Adiponektin der vollen Länge. Neben AdipoR1 und AdipoR2 wurde ein dritter Rezeptor für Adiponektin, das T-Cadherin, entdeckt. T-Cadherin bindet HMW Adiponektin und findet sich vor allem in Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Hug, Wang et al. 2004). T-Cadherin wird als Co-Rezeptor für die Adiponektinbindung angesehen. In HEK293-Zellen, die mit T-Cadherin transfiziert wurden, konnte eine deutlich gesteigerte Adiponektin-Wirkung nachgewiesen werden (Denzel, Scimia et al. 2010). Dies lässt vermuten, dass Adiponektin zuerst an T-Cadherin bindet und dann via AdipoR1 und AdipoR2 intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Adiponektin bindet auch direkt an die C-terminale, extrazelluläre Domäne der Adiponektinrezeptoren. Das N-terminale, intrazelluläre Ende der Adiponektinrezeptoren interagiert mit APPL1 (Adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucine zipper motif) (Zhou, Deepa et al. 2009). Über APPL1 werden die intrazellulären Signalkaskaden wie Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) ausgelöst. Interessanterweise zeigte sich, dass APPL2, eine Isoform von APPL1, unter basalen Bedingungen an den

Adiponektinrezeptor 1 bindet und die Interaktion zwischen Adiponektinrezeptor 1 und APPL1 blockiert. Sobald Adiponektin mit dem Adiponektinrezeptor interagiert, wird APPL2 vom Adiponektinrezeptor 1 entfernt und APPL1 kann binden (Wang, Xin et al. 2009). Durch die Aktivierung der AMPK durch Phosphorylierung am Thr172 und die Phosphorylierung der ACC am Ser79 durch die AMPK in der Leber und im Muskel sinken die Malonyl-CoA-Spiegeln, einem negativen Regulator der Fettsäureoxidation. Damit wird die Betaoxidation in Muskelzellen und Kardiomyozyten erhöht (Tomas, Tsao et al. 2002; Li, Wu et al. 2007). Nach Stimulation mit Adiponektin kann auch die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase über Adiponektinrezeptoren aktiviert werden. Die aktivierte AMPK und p38 MAPK induzieren die Glukoseaufnahme in Herz- und Skelettmuskel. Dabei aktiviert die p38 MAPK den Peroxisome Proliferator-aktivierten Rezeptor Alpha (PPAR α), was wiederum zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation in der Leber und im Muskel führt (*Abb.1*) (Yamauchi, Kamon et al. 2001). Die Adiponektin induzierte Regulation von PPAR α ist in Muskel und Leber unterschiedlich. Im Muskel wird PPAR α via AdipoR1 von p38 MAPK und AMPK aktiviert (Yamauchi, Kamon et al. 2003), während die PPAR α Aktivierung in der Leber via AdipoR2 und p38 MAPK erfolgt und AMPK-unabhängig ist (Yamauchi, Nio et al. 2007).

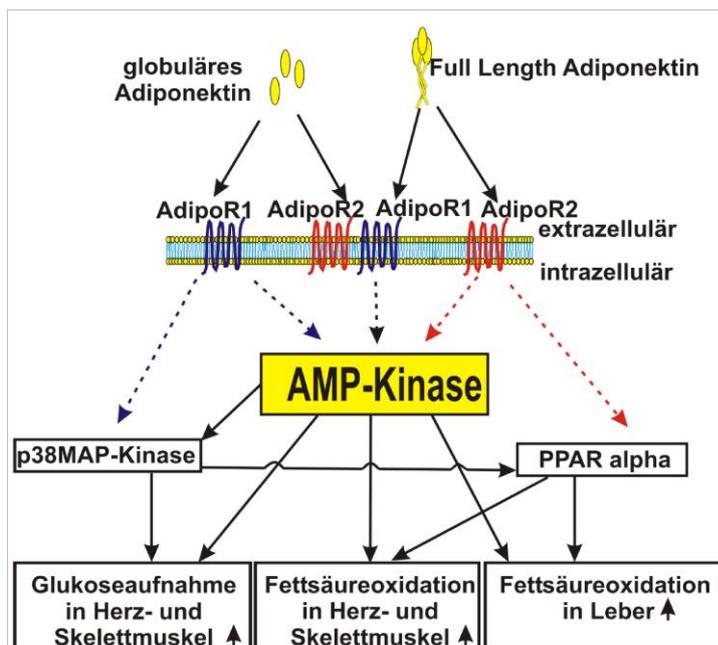


Abb.1 Adiponektin Signalweg in Herz-, Skelettmuskel und Leber

1.2.2 Die Adiponektinparaloge

Im Jahre 2004 wurde eine neue Proteinfamilie von Adiponektinparalogen entdeckt, die sogenannten C1q/TNF-related Proteins (CTRP's) (Wong, Wang et al. 2004). CTRP's können in verschiedenen Organen wie Fettgewebe, Herz, Skelettmuskel, Leber, Lunge und Nieren detektiert werden. Die CTRP's sind hochkonserviert. So zeigt die N-terminale variable Region zwischen murinen und humanen CTRP's eine Aminosäurehomologie von 53-100% und eine Sequenzhomologie der C-terminalen, globulären Domäne von 82-99%. Die C-terminalen globulären Domänen der CTRP's sind auch innerhalb der C1q/TNF Superfamilie konserviert. Dabei liegt die Aminosäurehomologie unter den verschiedenen CTRP's zwischen 27%-73%. Das murine CTRP 2 und das murine CTRP 7 zeigen eine Aminosäurehomologie in der C-terminalen globulären Domäne zum murinen Adiponektin zwischen 42%-43% (Wong, Wang et al. 2004), während die C-terminale globuläre Domäne von CTRP 9 mit 51% die höchste Aminosäurehomologie zum Adiponektin besitzt (Wong, Krawczyk et al. 2009). Die hohe Konservierung könnte bei den funktionellen Eigenschaften der CTRP's im Vergleich zum Adiponektin eine große Rolle spielen.

CTRP's besitzen auch die strukturelle Organisation des Adiponektins, das sich in vier Domänen unterteilen lässt (*Abb.2*). Am N-terminalen Ende befindet sich eine Signalpeptidstruktur. Es folgt eine kurze variable Region und eine kollagene Domäne mit Wiederholungen der Aminosäuresequenz Gly-X-Y. Die C-terminale globuläre Domäne bildet schließlich eine Struktur, die Homologien zum Komplementfaktor C1q und zu TNF- α zeigt. Cysteinreste der globulären Domäne dienen wie beim Adiponektin der Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken. Drei globulären Domänen der CTRP's binden über die Cysteinreste miteinander. Dabei entsteht die Struktur eines Trimers. Die Grundstruktur der CTRP's sind Trimere. CTRP 3, 5, 6 und 10 wurden auch als Hexamer beschrieben. Als Heterooligomer wurden CTRP 1 mit CTRP 6, CTRP 2 mit Adiponektin und CTRP 7, CTRP 9 mit Adiponektin detektiert (Wong, Krawczyk et al. 2008). Das zuletzt beschriebene Mitglied der CTRP-Familie, das CTRP 13, liegt als HMW-Form und Heterooligomer mit CTRP 10 vor (Wei, Peterson et al.2011).

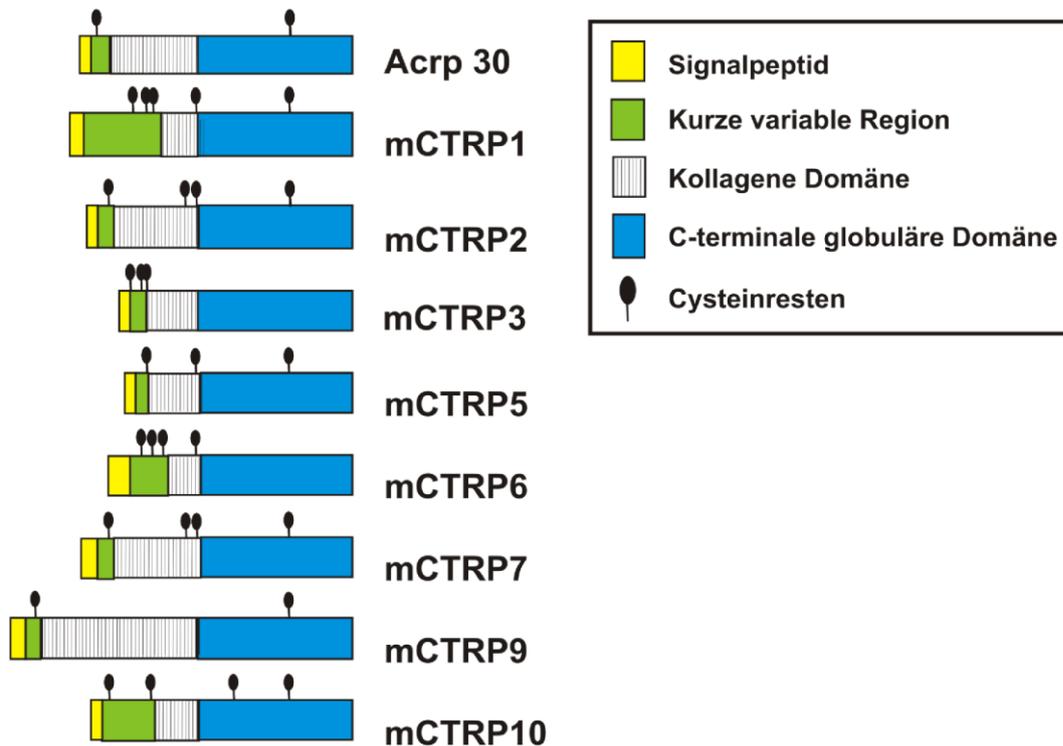


Abb. 2 Darstellung der Strukturen von Adiponektin und CTRP's

1.3 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Steigt das Verhältnis von AMP zu ATP, wird die AMP-aktivierte Proteinkinase aktiviert. Das Thr172 ist ein wichtiges regulatorisches Element und befindet sich im „activation loop“ des Enzyms. In der phosphorylierten Form führt es zur Aktivierung der AMPK (Hawley, Davison et al. 1996). Die AMPK kann auch hormonell aktiviert werden und kann dann an der Regulation des Gesamtkörper-Metabolismus beteiligt sein. Leptin und Adiponektin, zwei wichtige Fettgewebshormone, können die Phosphorylierung und die Aktivität der AMPK im Muskel und in der Leber steigern (Minokoshi, Kim et al. 2002; Yamauchi, Kamon et al. 2002). Die α 1-Isoform der AMPK kann in nahezu allen Geweben detektiert werden, während die α 2-Isoform im Herz- und Skelettmuskel nachweisbar ist.

Zu den Downstream Targets der AMPK gehören die Acetyl-CoA-carboxylase (ACC) (Vavvas, Apazidis et al. 1997), das mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (Cheng,

Fryer et al. 2004), der Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Coactivator 1-alpha (PGC-1a) (Jager, Handschin et al. 2007), die Elongation Factor-2 (eEF2) Kinase (Horman, Browne et al. 2002), die 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA) (Clarke and Hardie 1990), der Glukosetransporter 4 (GLUT4) (Kurth-Kraczek, Hirshman et al. 1999; Zheng, MacLean et al. 2001) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS) (Chen, Mitchelhill et al. 1999). Die aktivierte AMPK führt zu einer erhöhten Phosphorylierung und damit Inaktivierung eines wichtigen Downstream Targets, der ACC, die in sinkenden Malonyl-CoA-Spiegeln resultiert und damit zu einer Enthemmung der Carnitin:Palmitoyl-CoA Transferase-1 (CPT-1) führt. CPT-1 vermittelt den Transport langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien und eine damit verbundene erhöhte Fettsäureoxidation (Kudo, Barr et al. 1995). Akutes körperliches Training erhöht die AMPK- und ACC-Phosphorylierung im Herzen. Die $\alpha 2$ -Isoform der AMPK wird dabei stärker aktiviert als die $\alpha 1$ -Isoform (Coven, Hu et al. 2003). mTOR ist ein Schlüsselregulator der Proteintranslation. Die Aktivierung der AMPK führt zur Phosphorylierung von mTOR am Thr2446 (Cheng, Fryer et al. 2004), wobei die Proteintranslation reduziert wird. Aktivierte AMPK aktiviert außerdem die eEF2 Kinase, die eEF2 am Thr56 phosphoryliert. Dies führt zur Inaktivierung von eEF2 und resultiert ebenfalls in einer Verminderung der Proteinsynthese (Horman, Browne et al. 2002). Ein weiteres wichtiges Target ist die eNOS. Durch die Phosphorylierung am Ser1177 wird sie u.a. in Kardiomyozyten aktiviert (Chen, Mitchelhill et al. 1999). Die Aktivierung der AMPK führt nicht nur zur direkten Phosphorylierung metabolischer Enzyme sondern auch zur Regulation der Genexpression wie z.B. einer Erhöhung der Expression des Glukosetransporters GLUT4 (Zheng, MacLean et al. 2001).

1.4 Glukosetransporter

Neben einer erhöhten GLUT4 Transkription wird durch AMPK-Aktivierung außerdem die Translokation des GLUT4 gesteigert und so der Glukoseverbrauch erhöht (Marsin, Bertrand et al. 2000). Die Struktur eines Glukosetransporters wurde erstmals 1985 gezeigt (Mueckler, Caruso et al. 1985). Als Glukosetransporter (GLUT) werden

transmembranäre Transportproteine bezeichnet, die 12 transmembranäre Helices haben und die Aufnahme der Glukose über die Zellmembran katalysieren. Die C- und N-terminalen Enden der Glukosetransporter sind im Zytoplasma lokalisiert. 14 verschiedene Typen von Glukosetransportern sind bekannt (Manolescu, Witkowska et al. 2007). GLUT1 reguliert ubiquitär die basale Glukoseaufnahme und versorgt die Zelle konstitutiv mit Glukose. Die GLUT4-Isoform ist ein insulinabhängiger Transporter. Nach Insulinstimulation wird die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert, die die Exozytose des GLUT4 in die Plasmamembran auslöst (Holman and Kasuga 1997). Die Translokation von GLUT4 verursacht die schnelle Glukoseaufnahme in kardiale Muskelzellen, Skelettmuskelzellen und Adipozyten (Bell, Kayano et al. 1990).

Die Signalkaskaden der AMPK-induzierten Zunahme der Glukoseaufnahme sind nur unvollständig geklärt. Die AMPK-vermittelte gesteigerte Glukoseaufnahme wird im Gegensatz zum Insulin nicht durch PI3K vermittelt (Russell, Bergeron et al. 1999). Durch Stimulation der AMPK mit 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -riboside (AICAR) wird die Glukoseaufnahme durch GLUT4-Membrantranslokation in isolierten ventrikulären Rattenpapillarmuskeln gesteigert. Die von Metformin aktivierte AMPK inhibiert die Endozytose von GLUT4 in Kardiomyozyten (Yang and Holman 2006). AKT Substrate 160 (AS160), ein Rab-GTPasen-aktivierendes Protein (Rab-Gap), spielt bei der GLUT4-Translokation in Adipozyten und im Skelettmuskel eine wichtige Rolle (Karlsson, Zierath et al. 2005; Larance, Ramm et al. 2005). AS160 inhibiert die Fusion von GLUT4-Vesikeln mit der Plasmamembran und hält die GLUT4-Vesikel im Zytosol zurück. Überexpression von AS160 führte zur Hemmung der Insulin-stimulierte GLUT4-Translokation (Sano, Kane et al. 2003; Zeigerer, McBrayer et al. 2004). Insulin und AMPK-Aktivierung induzieren im Skelettmuskel die Phosphorylierung von AS160 (Eguez, Lee et al. 2005; Treebak, Glund et al. 2006), was zu einer Hemmung von AS160 führt. *In vivo* wurde nachgewiesen, dass die Insulin-stimulierte AS160-Phosphorylierung bei Typ 2-Diabetikern reduziert ist (Karlsson, Zierath et al. 2005).

1.5 Fragestellung

Über das Adipokin Adiponektin konnten in den letzten Jahren viele Erkenntnisse über Aufbau und Funktion gewonnen werden. Die CTRP's werden als eine neue Proteinfamilie von Adiponektinparalogen bezeichnet. Die aktuelle Datenlage lässt vermuten, dass die CTRP's ähnliche Wirkungen wie das Adiponektin vermitteln. Es gibt bisher jedoch keine Untersuchungen an kardialen Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende Schwerpunkte untersucht:

- Welche Wirkungen haben die CTRP's auf intrazelluläre Signaltransduktionswege (AMPK und ACC) in H9C2-Kardiomyoblasten?
- Können die CTRP's eine Translokation der Glukosetransporter (GLUT1 und GLUT4) in H9C2-Kardiomyoblasten verursachen?
- Induzieren die CTRP's eine Steigerung der Glukoseaufnahme in H9C2-Kardiomyoblasten?
- Werden die Wirkungen der CTRP's ebenso wie die Adiponektineffekte über Adiponektinrezeptoren vermittelt?

2. Material

2.1 Verwendete Reagenzien

| | |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamidlösung | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Agarose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ammonium persulfate (APS) | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumacetat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Borsäure | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| Chloroform, minimum 99% | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| p-Coumarsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| D(+)-Glucose anhydrous | Fluka Chemie AG, Buchs (CH) |
| Dimethyl sulfoxide (DMSO), $\geq 99,9\%$ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| dNTP-Mix | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | PAA Laboratories GmbH, Pasching (Austria) |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Riedel-deHaën, Seelze |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Roth, Karlsruhe |
| FBS | PAA Laboratories GmbH, Pasching (Austria) |
| Glukose | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Glycerol | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| GoTaq® DNA Polymerase | Promega, Mannheim |
| Hefe-Extrakt | Roth, Karlsruhe |
| Isotone Natriumchloridlösung | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Isopropylthio- β -galactoside (IPTG) | Applichem, Darmstadt |
| Kaliumacetat | Roth, Karlsruhe |
| Lysogeny broth (LB) Medium | Roth, Karlsruhe |
| Luminol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Lysogeny broth (LB) Agar | Roth, Karlsruhe |
| Lysogeny broth (LB) (Lennox) | Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Merck, Darmstadt |

| | |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 2-(N-morpholino)- Ethanesulphonic Acid (MES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck, Darmstadt |
| Oxalacetat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| PBS Tablets | GIBCO™ Invitrogen Corporation, Scotland (UK) |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom KG, Berlin |
| <i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase | Stratagene, Heidelberg |
| Ponceau S | Merck, Darmstadt |
| Primer (diverse) | Invitrogen, Karlsruhe |
| 2-Propanol | Fluka Chemie AG, Buchs (CH) |
| Restriktionsenzyme (diverse) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| RNase A | Roth |
| RNase Out | Invitrogen |
| Salzsäure | Riedel-deHaën, Seelze |
| SDS ultrapur | Roth, Karlsruhe |
| N, N, N', N'- Tetramethyldiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| TRI-Reagent | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan (Tris) | Roth, Karlsruhe |
| Trockenmilch | Milbona, Neckarsulm |
| Trypsin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trypan-Blau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β- D- Galactopyranoside (X-Gal) | AppliChem, Darmstadt |

2.2 Primer

Die Primer, die für die entsprechenden PCR-Fragmente verwendet wurden, sind in der nachfolgenden Übersicht aufgeführt (Tab.1).

| Name des Primers | | Sequenz (5'→3') | Fragment-Länge (bp) |
|------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| CTRP#1 HA (Maus) | sense | <u>CACCATGTACCCCTACGACGTGCCCG</u> <u>ACTACGCCGCCTCCTGTGCACAG</u> | 897 |
| | antisense | GAGTGTCCACTAGGGCTCAGA | |
| CTRP#1 (Ratte) | sense | ACGAGTTCAGGAGAACAACA | 544 |
| | antisense | GCAGGTAGGTCTCCTTCTGGT | |
| CTRP#2 HA (Maus) | sense | <u>CACCATGTACCCCTACGACGTGCCCG</u> <u>ACTACGCCACAATTTTAAAAAGGTG</u> ACAAC | 395 |
| | antisense | TTTGCCCTTAGGTCCCTTC | |
| CTRP#2 (Ratte) | sense | GGACCTAAGGGCAAGAAAGG | 162 |
| | antisense | GTAGTGGCCTCCCTCATTCA | |
| CTRP#3 HA (Maus) | sense | <u>CACCATGTACCCCTACGACGTGCCCG</u> <u>ACTACGCCCTCGGGAGGCAGCGC</u> | 768 |
| | antisense | TGTCACTTAGTTTTCAAAGAGCAGAA | |
| CTRP#3 (Ratte) | sense | TCCACAAGCTGGAGGACTG | 537 |
| | antisense | TGCATGGTTGCTGGATGTAT | |
| CTRP#4 (Ratte) | sense | ATGCTGCAGCTCGACTACG | 535 |
| | antisense | TACTTGCCGTGGTTGCTGT | |
| CTRP#5 (Ratte) | sense | GTGCCCCACGATCAGCCTTC | 431 |
| | antisense | AGCGAAGACTGGGGAGCTGT | |
| CTRP#6 HA (Maus) | sense | <u>CACCATGTACCCCTACGACGTGCCCG</u> <u>ACTACGCCAGGGTCATCATGGGGATA</u> | 822 |
| | antisense | GCGGAGCTCAGTTGTCCTCT | |
| CTRP#6 (Ratte) | sense | AGGTCAGGCCGTACATCAAC | 341 |
| | antisense | GTGCACATTGAGGCTGAAGA | |
| CTRP#7 HA (Maus) | sense | <u>CACCATGTACCCCTACGACGTGCCCG</u> <u>ACTACGCCATTGTCCTGCTCTACGTG</u> | 897 |
| | antisense | CAGCTCATCATCCTCTGATATAGAATC | |
| CTRP#7 (Ratte) | sense | GGGATGGTAGAGATGGCAGA | 362 |
| | antisense | CCCTGTTGCAGGGTTGTAGT | |
| CTRP#9 (Maus) | sense | CACCATGAGGATTTGGTGGCTTCTG | 1002 |
| | antisense | CCACGTGCAGAGTCCTTGTG | |
| CTRP#10 (Maus) | sense | CACCATGGCACTGGGGCTGCT | 864 |
| | antisense | GCTCCCCACTTGAATGTTTCG | |
| CTRP#13 (Ratte) | sense | AGAGCCCGGACCACCGGG | 147 |
| | antisense | GCGATCTTGGGCACCGTGCT | |

Tab 1. Zur Klonierung eingesetzte Primer. Die unterstrichene Sequenz entspricht der Basenfolge des Hämagglutinin-Tags.

2.3 *Escherichia coli* Stämme

Mit folgenden *E. coli* Stämmen wurde gearbeitet: (Tab. 2)

| Stamm | Genotyp | Bezugsquelle |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| BL21(DE3) BL21 (AI) | <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT</i> <i>hsdS</i> (r _B m _B) <i>gal λ</i> (DE3) [pLysS Cam ^r] | Stratagene, Heidelberg |
| Top 10 | <i>F-mcrAΔ(mrr-hs RMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 deoR recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu) 7697</i> <i>galU galK rpsL (StrR)</i> <i>endA1 nupG</i> | Invitrogen, Darmstadt |

Tab 2. Verwendete *E. coli* Stämme mit Genotyp und Bezugsquelle

3. Methoden

3.1 Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion

Die RNA kann nicht direkt als Template in einer PCR eingesetzt werden. Sie musste zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden (Reverse Transkription, RT), um im Anschluss daran in einer PCR spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Für diese Reaktion stehen die Reversen Transkriptasen zur Verfügung. Eingesetzt wurde ein 10 µl Ansatz (500 ng konzentrierte RNA in DEPC-Wasser), der bei 72°C für 3 min denaturiert wurde, um vorhandene Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Anschließend wurde ein RT-Mix, bestehend aus 5 µl RT-Puffer, 1 µl 12,5 mM dNTP, 3 µl Random-Primer (1:100), 0,25 µl RNase-Inhibitor, 0,25 µl reverse Transkriptase und 5,50 µl DEPC-Wasser, in jedes Tube pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 42°C und es schloss sich Inaktivierung der Transkriptase für 1 min bei 95°C an. Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:1 mit sterilem Wasser verdünnt und konnte als Template in der PCR-Reaktion eingesetzt werden. Die DNA-Amplifikation durch PCR erfolgte mit der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase. Als Template wurden 2 µl Maus- oder Ratten-cDNA eingesetzt. Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Reagenzien verwendet: 2,5 µl 10 x PfuUltra-II-Reaktionspuffer, 1 µl 6

mM Desoxynucleotide, 0,5 µl 10 pmol Primer, 1,5 µl Quick solution, 0,1 µl PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase. Der Ansatz wurde mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Nach einmaligem Denaturierungsschritt der Template-DNA für 2 min bei 95°C, schloss sich ein Denaturierungsschritt für 30 s bei 95°C, und ein Annealing-Schritt bei 60°C ± 10°C für 30 s, je nach Schmelztemperatur des eingesetzten Primers an. Die Synthese erfolgte bei 72°C für 1 min. Je nach Expressionsstärke der zu synthetisierenden DNA wurde der Zyklus 20-40-mal wiederholt. Die zur Herstellung der Konstrukte verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

3.2 Elektrophorese und Gelextraktion der PCR-Produkte

Nach der PCR wurden die Proben in einem 1%igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels GelRed™ (Biotium) sichtbar gemacht. Die Agarose wurde 1% w/v in 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (89 mM Tris-HCl, pH 8,0; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA, pH 8,0) durch Erhitzen gelöst und anschließend mit GelRed™ (1:50.000) versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 Vol. Probenpuffer (50% (v/v) 1 x Tris-EDTA(TE)-Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0]; 50% (v/v) Glycerol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau) gemischt. Die im Gelträger erstarrte Agarose wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und mit Größenstandard und den Proben beladen. Je nach Größe des Gels betrug die Spannung zwischen 80-140 Volt. GelRed™ fluoresziert nach UV-Anregung und anhand des Größenstandards (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus #1331, Fermentas) wurden die Fragmentlängen bestimmt. Zur Gewinnung eines reinen DNA-Fragments wurde das Gel-Extraktions-Kit (Genomed, Löhne) verwendet. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Pro 100 mg Gelstück wurden 300 µl Puffer L1 (NaClO₄, Na-Acetat und TBE) hinzugegeben und für 10 min bei 55°C inkubiert. Die im Puffer gelöste Agarose wurde in eine Jetquick-Spin Säule überführt und für 1 min bei > 12.000 g zentrifugiert. Mit Puffer L2 (Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl) schloss sich ein Waschschrift an. Die Säule wurde mit 500 µl

Waschpuffer beladen und für 1 min bei > 12.000 g zentrifugiert. Zum Trocknen wurde die Säule nochmals bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde die Jetquick-Spin Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und 40 μ l warmes steriles Wasser auf die Matrix der Säule gegeben. Nach kurzer Inkubation wurde die Säule anschließend 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem DNA-Elutionsschritt konnte das aufgereinigte DNA-Fragment für weitere Experimente verwendet oder bei -20 C gelagert werden.

3.3 Klonierungsreaktion

Um direkt ein PCR-Produkt in einen Eingangsvektor (Entry) des Gateway Systems zu klonieren, wurde der pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit verwendet. Dabei wurde die aufgereinigte DNA-Fragment in den pENTR™ TOPO®-Vektor ligiert (Tab. 3). Der Ansatz wurde gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis gestellt und die Transformation in kompetente *E. coli* Top 10 vorgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 20 μ l der elektrokompenten Zellen mit 1 μ l Ligationsansatz gemischt. Nach 1 Minute Inkubation auf Eis wurde dieser Ansatz in eine Küvette für die Elektroporation (BioRad) gegeben. Der Plus (1,85 kV bei 200 Ω und 25 μ F) wurde ausgelöst, wodurch ein Teil der kompetenten Zellen mit dem Plasmid transformiert wurde. Danach wurde 250 μ l LB-Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf selektiven LB-Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum (Kanamycin) enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

| Reagenzien | Menge/Ansatz |
|----------------------------|--------------|
| Frisches PCR-Produkt | 2 μ l |
| Verdünnte Salzlösung (1:4) | 0,5 μ l |
| TOPO-Vektor | 0,5 μ l |
| Endvolumen | 3 μ l |

Tab. 3 Zusammensetzung der TOPO®-Klonierungsreaktion für elektrokompente *E. coli*-Zellen

3.4 Plasmidpräparation (Mini)

Zunächst erfolgte die Bakterienkultur aus einer Einzelkolonie von der Agarplatte, für die 4 ml LB-Medium in einem geeigneten 15 ml Tube mit entsprechendem Antibiotikum (für Eingangsvektor: 50 µg/ml Kanamycin oder für Zielvektor: 100 µg/ml Ampicillin) versetzt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert wurde. 2 ml der Übernachtskultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 10 min bei 6.000g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde durch Vortexen in 200 µl Puffer A (10 mM EDTA, 50 mM TRIS (pH 8), 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Das vollständige Resuspendieren der pelletierten Bakterien war für gute Plasmiderträge von entscheidender Bedeutung. Zur Lyse der Bakterien wurden 200 µl Puffer B (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) verwendet und durch mehrmaliges Schwenken des Tubes gemischt bis ein klares Lysat entstand. Unter Umständen konnte auch noch eine zusätzliche zweiminütige Inkubation bei RT erforderlich sein. Das klare Lysat wurde mit 200 µl Puffer C (3 M Kaliumacetatlösung pH 5,5) neutralisiert und durch mehrmaliges Schwenken gemischt bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat bildete. Um Proteine und Zelltrümmer abzutrennen, wurde bei 13.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Überführung des klaren Überstandes in eine neue Tube, folgten die Zugabe des gleichen Volumens an 100% Isopropanol sowie eine Zentrifugation (30 Minuten, 13.000 rpm, Raumtemperatur). Durch Waschen mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol konnte die DNA von Salzen und anderen wasserlöslichen Substanzen gereinigt werden. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur). Anschließend wurde der Alkohol vorsichtig abgegossen und das Pellet kurz getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl sterilem Wasser gelöst.

3.5 Restriktionsanalysen isolierter Plasmide

Es wurden pro Ansatz 10 µl Plasmid-DNA mit 0,1 µl Restriktionsenzym und 2 µl Enzym-Puffer, 7,9 µl H₂O gemischt und bei 37°C für 1 h inkubiert und die Lösung wurde mit 5 µl Stopplösung gemischt und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel mit GelRed™ aufgetragen. Entsprechend der Vektorkarten konnten so positive Klone

identifiziert werden, in welchen das entsprechende Insert in pENTR integriert war.

3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurde mit Hilfe der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.*, auch Didesoxyribonukleosid-Triphosphatmethode genannt (Sanger, Nicklen et al. 1977), nachgewiesen.

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI). Bei dieser speziellen PCR werden 2', 3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingebaut, welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

| | |
|---------------------|--------------|
| Plasmid-DNA | 300 – 400 ng |
| Primer (10 pmol/µl) | 1 µl |
| Premix | 4 µl |
| Puffer | 2 µl |
| H ₂ O | ad 20 µl |

Folgendes Programm wurde verwendet:

- | | | | |
|----|------|---------|-------------|
| 1. | 96°C | 1 min. | |
| 2. | 96°C | 30 sec. | } 30 Zyklen |
| 3. | 58°C | 15 sec. | |
| 4. | 60°C | 4 min. | |
| 5. | 4°C | Pause | |

Anschließend wurden 4 µl Ammoniumacetat (4 M) sowie 65 µl Ethanol (96%) zur Fällung hinzugegeben und die Tube 20 Minuten bei -20°C eingefroren. Nach einer 40-minütigen Zentrifugation bei 4°C (14.000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 10 Minuten (4°C, 14.000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Sequenzierungsreaktion wurde im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Weiterstadt) ausgewertet. Mit den bekannten Zielsequenzen der DNA-Datenbanken (NCBI) konnte die Identität der Sequenzen verglichen werden.

3.7 Plasmidpräparation (Midi)

Wurden durch den Sequenzvergleich Klone erkannt, die das Insert ohne Mutationen und in richtiger Richtung enthielten, wurde eine Bakterien-Kultur für eine größere Plasmid-Präparation (Midi) angesetzt. Dazu wurde ein Klon in 150 ml LB-Medium mit dem selektiven Antibiotikum überführt. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 37°C über Nacht. Zur Langzeitlagerung der transformierten Bakterien wurden Glycerolstocks angelegt. Dazu wurden 150 µl der Bakteriensuspension in 150 µl Glycerol (30%) überführt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden sie bei -80°C gelagert.

Je nachdem, ob das präparierte Plasmid für Rekombinationen oder direkt in der Zellkultur verwendet werden sollte, wurde entweder das PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) oder das Plasmid Midi Kit (Qiagen) entsprechend der Angaben der Herstellerfirma verwendet. Das System von Qiagen hat einen höheren Reinigungseffekt in Bezug auf Endotoxine und wurde deshalb für Präparationen gewählt, bei denen das präparierte Plasmid später in Zellen transfiziert werden sollte.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde in einem angemessenen Volumen an Wasser aufgenommen, die Konzentration mittels Photometer bestimmt und die Plasmid DNA bei -20°C gelagert.

3.8 LR-Rekombination

Ende der 90er Jahre wurden Methoden entwickelt, die eine Klonierung ohne Hilfe von Restriktionsenzymen und DNA-Ligasen ermöglichten. Die Gateway Technologie (Invitrogen) basiert auf den seitenspezifischen Rekombinationseigenschaften des

Bakteriophagen Lambda (Landy 1989). Dieses System zeichnet sich als ein schnelles und leistungsfähiges Verfahren aus, mit dem DNA-Sequenzen in multiple Vektorsysteme zur funktionellen Analyse eingeschleust werden können (Hartley, Temple et al. 2000). Um einen Expressionsvektor (attB-sites) zu generieren, wurde eine LR-Rekombinationsreaktion zwischen den attL-sites des Eingangsvektors (pENTR) mit dem uns interessierenden Gen und den attR-sites des Zielvektors (pDEST 17 oder pMAL c2× DEST) durchgeführt mit anschließender Transformation in einen geeigneten *E. coli*-Wirt (Abb. 3). Die folgenden Komponenten wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß bei RT angesetzt: 50 ng Eingangsvektor; 75 ng Zielvektor; 1 µl LR-Klonase™ II Enzyme Mix (5×) und auf 4 µl mit TE-Puffer (pH 8,0) aufgefüllt. Der Mix wurde bei 25°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss daran wurde 1 µl Proteinase K-Lösung zugeben und 30 min bei 37°C inkubiert.

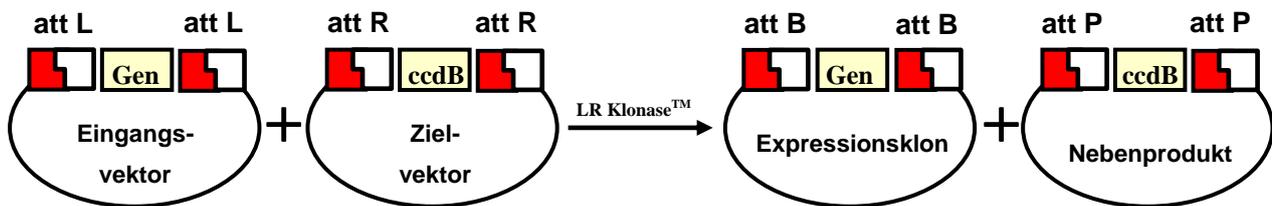


Abb. 3 Gateway Rekombinationsreaktionen

Nach der Gateway Klonierung befand sich das gewünschte Insert des Eingangsvektor (pENTR™/TEV/D-TOPO) im Zielvektor (pDEST 17 oder pMAL c2× DEST). Im Anschluss erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* Zellen und das Ausplattieren auf Agarplatten nach Auswahl der entsprechenden Antibiotikaresistenz des Expressionsvektors.

3.9 Proteinexpression in *E. coli* mit Histidin-Tag und Isolierung des Proteins mittels Nickel-Säulen

Für die heterologe Expression des pDEST 17 Vektors wurden BL21 AI Bakterien einer Übernachtskultur 1:20 mit 1% Antibiotika, 0,2% Glukose, und 0,5% Hefeextrakt versetztem LB-Flüssigmedium (500 ml) verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0.4 - 0.8 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der inkubierten Bakterienkultur, die sich anschließende Isolierung des Fusionsproteins bestehend aus einem Histidinprotein (His-Tag) und einem CTRP wurde durch Zugabe von 0,3 mM IPTG und 0,2% Arabinose eingeleitet.

Bei idealer Temperatur wurde die Probe bis zur gewünschten Induktionszeit geschüttelt. Nach Ablauf der Induktionszeit wurde der gesamte Ansatz bei 6.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml PBS resuspendiert, und bei -20°C über Nacht eingefroren. Das Aufbrechen der Proben erfolgte mittels Ultraschall für 2 min. Die Zellrückstände wurden bei 14.000 rpm, 4°C für 20 min abzentrifugiert. Die Nickel-Säule (Ni) war aus einer mit Nickel-Affinity-Gel (Amocol) gefüllten 2 ml Zentrifugensäule aufgebaut. Der Überstand von 20 ml wurden nach dem Zentrifugieren mit einer Geschwindigkeit von 6 ml/h über 3 Stunden auf die Ni-Säule gegeben. Danach wurde die Ni-Säule mit 12 ml PN-Puffer (20 mM Phosphate; 500mM NaCl pH 7,4) mit 5 ml/h über 2 h gewaschen. Zur Elution des Fusionsproteins aus dem Ni-Affinity-Gel wurden dem Ansatz 4 ml Elutionspuffer (20 mM Phosphate; 500mM NaCl; 500mM Imidazole pH 7,4) mit einer Volumengeschwindigkeit von 4 ml/h über 1 h hinzugefügt. Das eluierte Protein wurde gegen PBS über Nacht dialysiert. Um Endotoxine zu entfernen, wurde das eluierten Protein nach erfolgreicher Dialyse mit Hilfe des EndoTrap Red Kit aufgereinigt.

3.10 Proteinexpression in *E. coli* mit Hilfe eines MBP-Fusionsproteins und Proteinisolierung mit Hilfe von Amylose-Säulen

Die heterologe Expression von pMAL c2× DEST in *E. coli* und die sich anschließende Isolierung des Fusionsproteins bestehend aus einem Maltose-bindenden Protein (MBP) erfolgte in Anlehnung an die Vorschriften des pMAL™ Protein Fusion und Purification Systems (New England BioLab). Anzucht der Bakterien und Induktion der Proteinexpression erfolgte wie zuvor für die His-Fusionsproteine beschrieben. Die Isolierung der im Zellaufschluß enthaltenen Fusionsproteine erfolgte über Amylose-Säulen. Zur Vorbereitung der Proteinisolierung mit Hilfe von Säulen wurden 2 ml Zentrifugensäulen (Pierce) mit je 1 ml Amylose-Resin (New England BioLab) gefüllt. Anschließend wurde der aufzutrennende Proteinansatz auf die vorbereitete Säule aufgetragen (7 ml/h über 3 Stunden) und die Säule nach Durchfluss der Probe mit Column-Puffer (20 mM TrisHCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT) gewaschen (7 ml/h). Das Fusionsprotein wurde schließlich mit 2 ml 10 mM Maltose-Elutionspuffer von der Säulenmatrix eluiert (4 ml/h). Das eluierte Protein wurde gegen PBS über Nacht dialysiert und mit Hilfe des EndoTrap Red Kit von Protein kontaminierenden Endotoxine befreit.

3.11 Zellkultur und Zellstimulation

Die Zellen der Linien H9C2 und HEK293 (American Type Culture Collection) wurden mit DME-Medium unter Zusatz von 4,5 g/l Glucose, 10% FBS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 2 mM Glutamat und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Vor Durchführung der Stimulationsexperimente wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit einer 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung überschichtet. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C löste sich der Zellrasen vom Boden der Schale ab und konnte in ein 50 ml Gefäße überführt werden. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde die Zellsuspension mit den doppelten Mengen an vorgewärmtem Medium gemischt und bei 1.500 rpm 5 Minuten zentrifugiert,

das Medium vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und ca. 1.000.000 HEK293-Zellen und 500.000 H9C2-Zellen in neue 60×10 mm Kulturschalen ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgesetzt und im Ausschluss daran durch die Zugabe des eluierten Proteins mit jeweils 4 µg/ml CTRP's stimuliert. Die Stimulationszeit der HEK-Zellen betrug 5, 10, 20, 40, 80 Minuten und 24 Stunden. Die H9C2-Zellen wurden 5, 10, 20, 40, 80 Minuten mit CTRP 7, und mit CTRP 9 stimuliert, für die Analyse der Phosphorylierung der AMPK und ACC sowie GLUT1- und GLUT4-Translokation. Für die weiteren Versuche wurden die Stimulationszeiten entsprechend angepasst.

3.12 Transfektion von H9C2-Zellen

Die Methode der Lipofektion wurde für die Transfektion der H9C2-Zellen verwendet um heterologe DNA in die Zellen einzuschleusen. Das gewünschte Plasmid wurde dabei zuerst mit den Liposomen gemischt, anschließend auf die Zellen gegeben und inkubiert. Um die Translokation von GLUT4 zu untersuchen, wurde das Transfektionsreagenz Jetprime™ (Polyplus Transfection) benutzt und die jeweiligen Mengen und Arbeitsschritte wie vom Hersteller beschrieben eingesetzt und durchgeführt. Die siRNA-Oligonukleotide (Invitrogen) wurden durch das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMax in H9C2-Zellen transfiziert. Hier wurden ebenfalls die vom Hersteller empfohlenen Mengen und Protokoll verwendet. Opti-MEM®I wurde als Transfektionsmedium benutzt, welches als proteinarmes Medium für höhere Transfektionsraten sorgt. Nach Transfektion der Zellen wurde am zweiten Tag auf DME-Medium, welches 4,5 g/l Glucose, 10% FBS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 2 mM Glutamat und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin enthielt, gewechselt. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten H9C2-Zellen auf serumfreies Medium gesetzt und mit den CTRP's stimuliert.

3.13 Gesamtproteinisolation aus HEK293- und H9C2-Zellen

Nach dem Ernten der Zellen mit RIPA-Puffer (50 mM Tris (pH 7,4); 1% NP40; 150mM NaCl; 1 mM EDTA; Protease-Inhibitor 1:500; Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1:200) wurden die Proben entweder sofort aufgearbeitet oder kurzzeitig bei -80°C gelagert. Das Aufbrechen der Proben erfolgte mittels Ultraschall. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Proben bei 13.000 rpm, 4°C für 20 min zentrifugiert. Die Proteinmessung der Lysate wurde entsprechend der Anleitung für Mikrotiterplatten mit dem BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Bonn) durchgeführt. Die Aliquots bestimmter Proteinmengen (z.B. 50 µg) in 6 x SDS-Probenpuffer (350 mM Tris, pH 6,8, 30% Glycerin, 3 mM SDS, 60 mM DTT) wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt oder bei -20°C gelagert.

3.14 Isolation der Membranfraktion von H9C2-Zellen

Zur Aufarbeitung der H9C2-Zellen wurden die Zellen mit HES-Puffer (20 mM HEPES, (pH=7,4); 1 mM EDTA; 0,25 M Sucrose) geerntet und mittels Ultraschall homogenisiert. Zur Isolation von Zytosol- und Membranfraktion wurde eine differenzielle Zentrifugation der Proben durchgeführt. Dazu wurde das Homogenisat zur Reinigung zunächst bei 800 g, 4°C, 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bei 16.000 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt enthielt die Zytosolfraktion und wurde bis zur Untersuchung aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde das Pellet aus dem zweiten Zentrifugationsschritt mit HES-Puffer versetzt und gut gemischt. Die im HES-Puffer gelöste Probe wurde auf ein 1,25 M Sucrosekissen gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 60 Minuten bei 100.000 g und 4°C konnte so die Membranfraktion gewonnen werden. Bei den Zytosol- und Membranfraktionen wurden die Proteinmengen bestimmt und die Proben aliquotiert. Die Aliquots wurden mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzt bis zur Verwendung gelagert.

3.15 Proteinelektrophorese und Western Blot

Die Methode der diskontinuierlichen, denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde verwendet (mit Hilfe der Bio-Rad Mini Protein II Gel Apparatur, Fa. Bio-Rad), um die Proteinproben elektrophoretisch aufzutrennen. Die Proteinproben, nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BSA Protein Assay Kit (Pierce, USA), wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert, um sie anschließend entsprechen der Größe aufzutrennen zu können. Das Molekulargewicht der Proteine wurde mit Hilfe der erwähnten parallel aufgetrennten Proteinstandards mit bekannten Molekulargewichten (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus SM 1811; Fermentas) bestimmt. Mit einer Spannung von zunächst 80 V konnten die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch das Sammelgel und anschließend bei 140 V im Trenngel zum Pluspol wandern.

Die Gele wurden folgendermaßen hergestellt (Tab. 4):

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

Tab. 4 Übersicht zur Zusammensetzung der Western Blot Reagenzien

Mit dem Western Blot können definierte Proteine durch Antikörper nachgewiesen werden. Um die nach Größe aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran zu übertragen, wurde das Nass-Blot Verfahren angewandt. Der Transfer der Proteine bei 100 V für 1 h erfolgte nach Equilibrierung der Schwämme, des Whatman-Papiers und der Nitrocellulose-Membran in Blotpuffer (Tab. 5). Danach

konnte die Bloteffizienz überprüft werden, indem die Membranen mit Ponceau-Färbelösung (*Tab. 5*) gefärbt wurden. Das Ponceau wurde nach Markierung mit Wasser wieder abgespült. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur 1h mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver in 1xTBS-T (*Tab. 5*) blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (*Tab. 6*), in 2,5% (w/v) Trockenmilchpulver 1xTBS-T, 0,01% Natriumazid gelöst, erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen in 1xTBS-T für jeweils 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*Tab. 7*), gelöst in 2,5% Trockenmilchpulver 1xTBS-T, welcher mit HRPO (Horseradish Peroxidase) konjugiert war, für ca. 1-2 h bei Raumtemperatur. Weitere drei Waschschrte folgten, danach wurden die Membranen mit frischer ECL-Lösung (100 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,225 mM p-Coumarsäure, 1,25 mM Luminol, 0,009% (v/v) H₂O₂) beschichtet und für 1 min inkubiert, um die Peroxidasereaktion zu starten. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Fusion FX7 (von Peqlab, Erlangen Deutschland). Zur Auswertung wurden die Signale mit der FUSION-CAPT™ Software (Peqlab, Erlangen Deutschland) fotografiert und mit der Quantity One Software (BioRad, München Deutschland) ausgewertet.

| | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 10 x Laufpuffer | 250 mM Tris 2 M Glycin 35 mM SDS Dest. H ₂ O |
| Blotpuffer | 25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol Dest. H ₂ O |
| TBS-T | 100 mM NaCl 10 mM Tris 0,2% (v/v) Tween 20 Dest. H ₂ O |
| Ponceau-Färbelösung | 0,5 g Ponceau S 1% (v/v) Essigsäure dest. H ₂ O |

Tab. 5 Auflistung der Puffer- und Lösungszusammensetzungen

| Antikörper | Firma | Spezies | Eingesetzte Verdünnung |
|---------------------------------|---------------------------------|---------|------------------------|
| phospho-ACC (Ser79) | Cell Signaling Technology, Inc. | Rabbit | 1: 500 |
| phospho-AMPK α (Thr172) | Cell Signaling Technology, Inc. | Rabbit | 1:1.000 |
| GAPDH | Abcam, UK. | Rabbit | 1:2.000 |
| His (Histidin) | Cell Signaling Technology, Inc. | Maus | 1:1.000 |
| MBP (Maltose-bindendes Protein) | New England BioLab, Inc. | Maus | 1:1.000 |
| GLUT1 | Santa-Cruz biotechnology Inc. | Goat | 1:1.000 |
| HA (Hämagglutinin) | Sigma-Aldrich Co. | Maus | 1:1.000 |
| phospho-AS160 | Cell Signaling Technology, Inc. | Rabbit | 1:1.000 |
| AS160 | Cell Signaling Technology, Inc. | Rabbit | 1:1.000 |

Tab. 6 verwendete primäre Antikörper mit entsprechenden Verdünnungen

| Antikörper | Firma | Eingesetzte Verdünnung |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Anti-rabbit IgG HRP-linked | Santa-Cruz biotechnology Inc. | 1:5.000 |
| Anti-mouse IgG HRP-linked | Santa-Cruz biotechnology Inc. | 1:5.000 |
| Anti-Goat IgG HRP-linked | Santa-Cruz biotechnology Inc. | 1:5.000 |
| Anti-Goat IgG Cy3-linked | Sigma-Aldrich Co. | 1:1000 |
| Anti-Mouse IgG Cy3-linked | Sigma-Aldrich Co. | 1:1000 |

Tab. 7 verwendete sekundäre Antikörper

3.16 Konfokale Mikroskopie

H9C2-Zellen wurden in 35 × 10 mm Platten, auf deren Boden sich ein Deckgläschen befand, ausgesät und für ca. 24 h kultiviert. Für GLUT4-Analyse wurden H9C2-Zellen mit pQBI-HA-GLUT4-Plasmid transfiziert. Das pQBI-HA-GLUT4-Plasmid enthält eine Nukleotidinsertion, die für ein HA-Tag innerhalb der ersten

extrazytoplasmatischen Domäne des GLUT4 kodiert. Für die GLUT1 Analysen wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 5, 10, 20, 40, 80 Minuten mit jeweils 4 µg/ml CTRP 7 und CTRP 9 stimuliert. Nach einer Fixierung der Zellen mit 3,7% Formaldehyd für 20 Minuten wurden die Zellen auf dem Deckgläschen mit 0,2% Triton-X100 permeabilisiert. Die Blockierung der Zellen erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% NCS (Newborn calf serum) und 5% BSA (Bovine Serum Albumin). Die Zellen wurden im 1:100 verdünnten primären Antikörper, der in Blockierungslösung gelöst wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1xPBS für jeweils 15 min erfolgte die Inkubation über eine Stunde mit dem 1:1000 in 1xPBS verdünnten Sekundärantikörper, der an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt war. Nach 15 Minuten Waschen folgte die Kernfärbung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (Invitrogen Topro 642/661 1:200 in PBS verdünnt). Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde ein Tropfen AF2 Medium (Citifluor, London England) auf das Deckgläschen gegeben und die gewendeten Deckgläschen auf Objektträger gelegt. Zur Analyse der fluoreszierenden Signale in Zellen wurde ein LSM 510 konfokales *Laser-Scanning* Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland) benutzt. Dieses Mikroskop verfügte über einen Argon Laser. Zur Anregung des Signals von Cy3 wurde die 543 nm Linie des Argon-Ionen Lasers verwendet. Der Emmissionsstrahlengang für Cy3 bestand aus einem 560/615 nm Bandpaßfilter. Durch die 630 nm Linie der Argon-Ionen Laser wurde das Signal von Topro 642/661 angeregt. Zur Detektion von Topro 642/661 wurde ein 650 nm Bandpaßfilter verwendet.

3.17 Messung der Glukoseaufnahme

Die Glukoseaufnahme der Zellen wurde mittels der Aufnahme von Tritium-markierter 3-O-Methyl-D-Glucose (OMG) im Szintillationsmessgerät (Beckmann Coulter) bestimmt. Die H9C2-Zellen wurden dazu zunächst in 6-Well-Platten ausgesät und 24 h vor Versuchsbeginn in serum- und glukosefreiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden dann 30 Minuten mit CTRP 7 und 9 (4 µg/ml) in 1 ml Medium ohne Glukose stimuliert. Danach wurde dem glukosefreien Medium 10 mM OMG und 1 µCi 3H-OMG zugesetzt

und die Inkubation bei 37°C für 1h fortgesetzt. Die Zellen wurden anschließend 3x mit eiskaltem PBS gewaschen, danach mit 0,5 ml 500 mM NaOH pro Well versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 µl des Zelllysates in die Szintillationsgefäße überführt. Pro Gefäß wurden 4 ml Szintillationslösung (Ultima Gold Cocktail, PerkinElmer) zugegeben. Die Radioaktivität wurde im β -Counter (Beckmann Coulter) in die Zellen gemessen. Die Aufnahme der tritiumversetzten Glukose in die Zellen wurde in Bezug auf die Proteinmenge der analysierten Probe berechnet.

3.18 Statistische Verfahren

Die Zusammenfassung der einzelnen Experimente erfolgte über die Berechnung von Mittelwerten \pm Standardabweichung mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Stat Version 3.5. Signifikanzanalysen wurden mit dem t-Test bzw. One Way ANOVA durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung des Expressionsmusters von Adiponektin und der CTRP's in verschiedenen Rattengeweben

Die Expression von Adiponektin und der bisher beschriebenen CTRP's wurde mit Hilfe von RT-PCR in verschiedenen Rattenorganen untersucht (*Abb. 4*). Erwartungsgemäß ließ sich vor allem im Fettgewebe Adiponektin nachweisen. Es zeigte sich, dass CTRP 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10 und 13 anders als Adiponektin ubiquitär exprimiert waren. Im linken Ventrikel (LV) und Skelettmuskel zeigten alle CTRP's, außer CTRP 4 und 5, eine deutliche Expression. CTRP 1, 2, 3, 7 und 9 waren im Hoden, der Lunge und der Milz vorherrschend. In Gehirn, Muskel und Milz schien CTRP 10 stärker exprimiert zu sein als in den anderen Geweben. CTRP 13 zeigte in Darm, Gehirn, Lunge, LV und Skelettmuskel eine starke Expression. CTRP 6 wurde in allen untersuchten Rattenorganen exprimiert und war in der Milz am stärksten ausgeprägt. Die CTRP's unterschieden sich stark in den Fettgeweben: CTRP 1 und 2 waren im subkutanen Fettgewebe, während CTRP 3, 7, 10, und 13 stärker im viszeralen Fettgewebe exprimiert waren (*Abb. 4*).

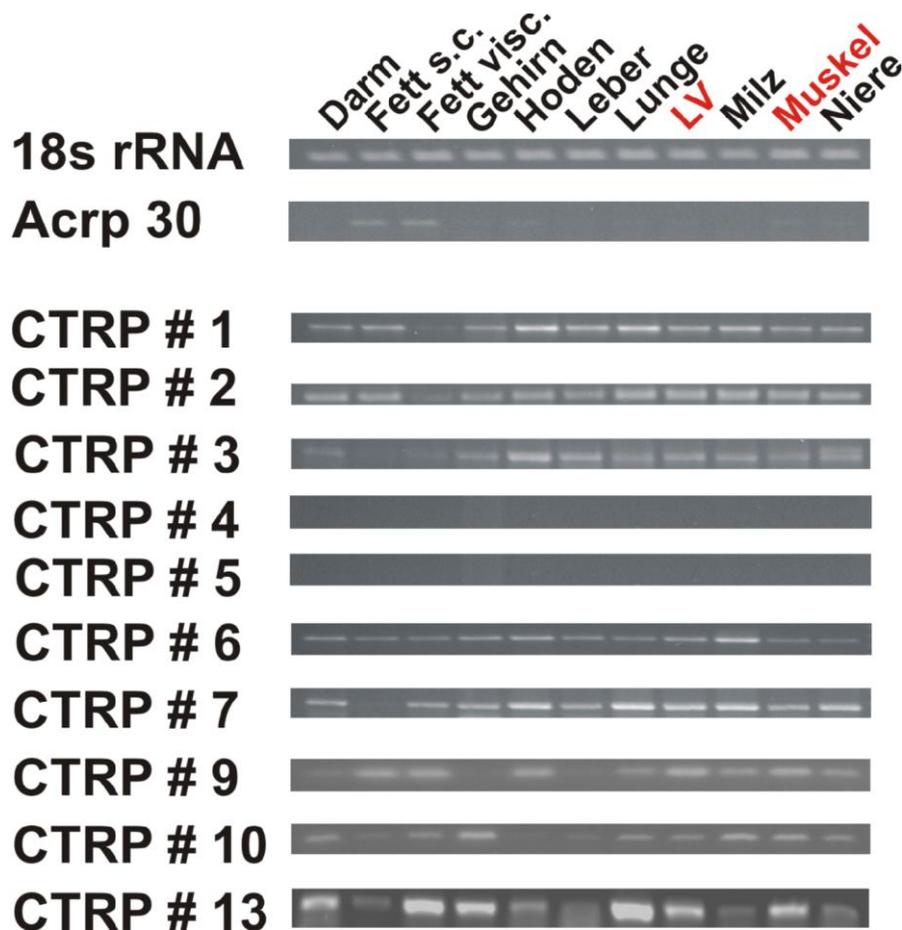


Abb. 4 Semiquantitative PCR zum Nachweis des mRNA-Expressionsmusters von Adiponektin und der CTRP's in unterschiedlichen Geweben der Ratte

4.2 Generierungen rekombinanter CTRP-Protein in *E. coli* Zellen

Zur Untersuchung der zellulären Effekte der CTRP's wurden diese als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert und im Anschluss aufgereinigt. Die verwendeten Plasmide für die CTRP's sind so konzipiert, dass N-terminal an das Protein ein Histidin-Tag (His) (Vektor pDEST 17) oder Maltose-bindendes Protein-Tag (MBP) (Vektor pMAL c×2 DEST) angehängt wird, welches dann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden kann sowie zur Aufreinigung genutzt werden kann. In den aktuellen Arbeiten wurden die Plasmide pDEST 17 CTRP 1, 2, 3, 7 und 9 und pMAL c2×DEST CTRP 6 und 10 verwendet. Die gleiche Plasmidkultur, welche keine Arabinose und IPTG zur Induktion der Proteinexpression erhielt, wurde als Kontrolle benutzt. Die Aliquots aus den Kulturen wurden 2, 4, und 6 h nach der IPTG-Induktion abgenommen und im

Anschluss im Western Blot analysiert, um die Induktion des Proteins zu vergleichen. Es wurden Antikörper verwendet, die das Histidin in pDEST 17 CTRP 1, 2, 3, 7, und 9 oder das Maltose-bindende Protein in pMAL c2×DEST CTRP 6 und 10 detektieren und somit einen Nachweis der induzierten Proteine in den Lysaten von *E. coli* ermöglichen. Der Test der Induktionsbedingungen stellt einen wichtigen Vorversuch für die CTRP-Proteinproduktion dar. Durch ihn kann festgestellt werden, bei welcher Temperatur und zu welchem Zeitpunkt die Proteine massiv induziert werden können. Nach der IPTG-Induktion zeigte sich sowohl bei 20°C als auch bei 37°C eine Proteinexpression für CTRP 2, 3, 7, 10 nach 2 h Inkubation, die nach 4 und 6 h nicht gesteigert wurde (*Abb.5*). Die Induktion von CTRP 7 bei 37°C erfolgte bereits nach 2 h, während sie nach 4 h und 6 h deutlich reduziert war. Sowohl für CTRP 1 als auch für CTRP 6 zeigte sich lediglich bei 20°C eine geringe Induktion nach 2 h bis 6 h. Dagegen waren die Expressionen von CTRP 1 und CTRP 6 bei 37°C deutlich sichtbar. Bei einer Kultivierungstemperatur von 20°C wurde CTRP 9 innerhalb 2 h bis 6 h induziert, und bei 37°C wurde keine Induktion von CTRP 9 gesehen (*Abb. 5*). Die Expression der CTRP's erfolgte in den weiteren Experimenten entsprechend den ermittelten optimalen Induktionsbedingungen. Die Induktionszeit und -temperatur sind in der nachfolgenden Übersicht aufgeführt (*Tab. 8*).

| Expressionsklon | Induktionszeit | Induktionstemperatur |
|-----------------------|----------------|----------------------|
| pDEST 17 CTRP 1 | 6 h | 37°C |
| pDEST 17 CTRP 2 | 4 h | 16°C |
| pDEST 17 CTRP 3 | 6 h | 37°C |
| pDEST 17 CTRP 7 | 6 h | 16°C |
| pDEST 17 CTRP 9 | 6 h | 16°C |
| pMAL c2× DEST CTRP 6 | 6 h | 37°C |
| pMAL c2× DEST CTRP 10 | 6 h | 16°C |

Tab. 8 Induktionsbedingungen für pDEST 17 und pMAL c2× DEST

Um die Funktion der CTRP's in kultivierten Zellen zu untersuchen, wurden die CTRP's aufgereinigt (siehe Kapitel 3.9 und 3.10) und mit Hilfe von BSA zur Lagerung bei -20°C stabilisiert. Zuvor war die Proteinkonzentration ermittelt worden und die Lösung auf eine Konzentration von 1,0 oder 0,5 µg/µl eingestellt worden.

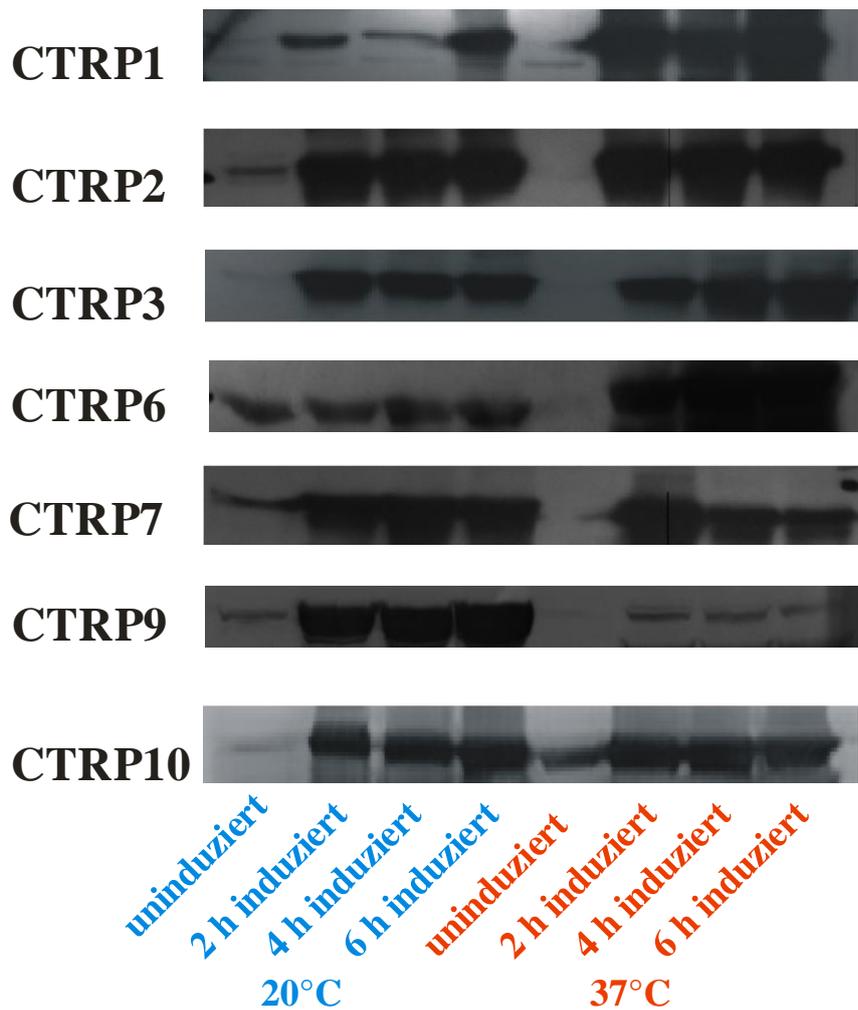


Abb. 5 Western Blot Nachweis der Proteinexpression rekombinanter CTRP's in IPTG-induzierten und nicht induzierten *E.coli*

*Detektion des His-Tags oder MBP-Tags mittels Anti-His- oder Anti-MBP-Antikörper und HRPO-gekoppeltem sekundären Antikörper nach Überexpression in BL21-AI *E.coli*. Uninduziert, Transfektion mit Plasmid ohne IPTG und Arabinose; induziert, Transfektion mit Plasmid mit 0,3 mM IPTG und 0,2% Arabinose.*

4.3 Einfluss ausgewählter CTRP's auf die AMPK-Aktivierung in HEK293-Zellen

Für die hier beschriebenen Vorversuche wurde eine Tumorzelllinie (HEK293) verwendet. Zunächst wurde ein Zeitversuch durchgeführt, bei dem HEK-Zellen zu unterschiedlichen Stimulationszeiten (5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min und 24 h) mit 4 µg/ml CTRP-Protein behandelt wurden. Die verwendeten Konzentrationen

wurden entsprechend den Angaben in der Literatur ausgewählt. Die Phosphorylierung der α -Untereinheit der AMPK am Thr172 als Zeichen der AMPK-Aktivierung in den Zellen wurde mit Hilfe von Western Blot nachgewiesen. Nach Zugabe von CTRP 2 wurde eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der AMPK ab 10 Minuten nachgewiesen. Dieser Effekt blieb bis 80 Minuten stabil, nach 24 Stunden war dieser Effekt vollständig aufgehoben (Abb. 6A). CTRP 3 verursachte nach 5 Minuten und 10 Minuten keine Veränderung der AMPK-Phosphorylierung. Eine signifikant erhöhte Phosphorylierung der AMPK wurde nach 40 Minuten und nach 80 Minuten nachgewiesen (Abb. 6A).

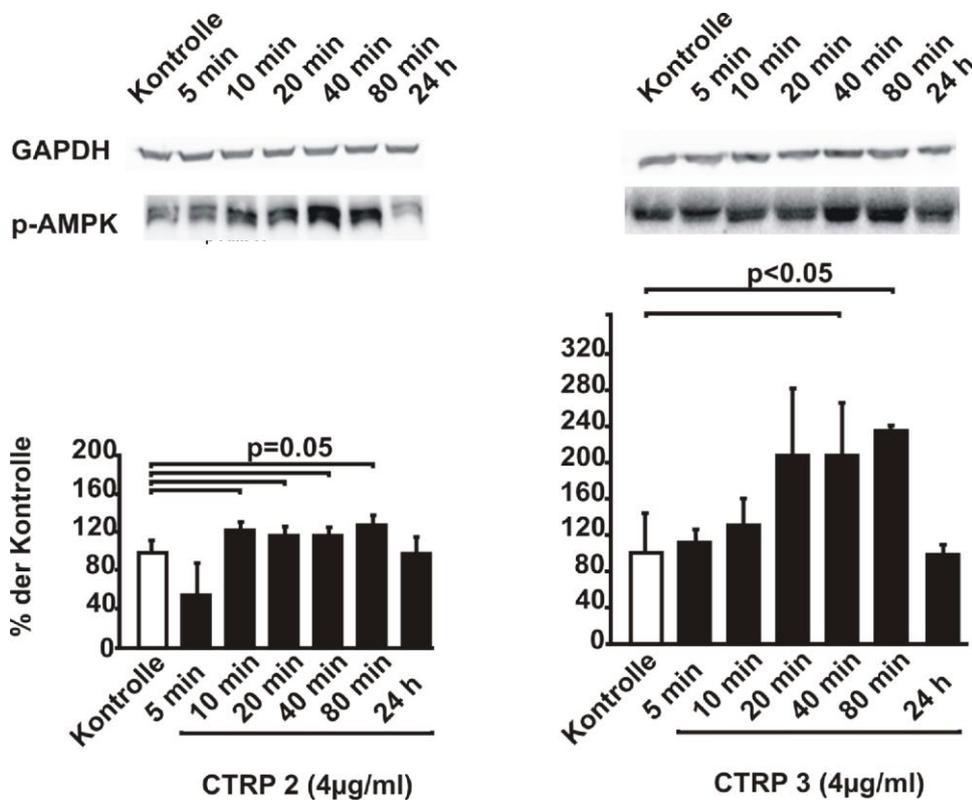


Abb. 6A AMPK-Aktivierung in mit CTRP 2 und 3 stimulierten und nicht stimulierten Zellen

Die Analysen wurden mit Western Blot durchgeführt. Als Kontrolle dienten HEK-Zellen, welche mit dem Puffer behandelt wurden, in welchem die CTRP's gelöst wurden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

Der maximale Effekt von CTRP 7 wurde nach 5 Minuten erreicht, welcher bis 20 Minuten stabil blieb. Nach 40- und 80-minütiger Inkubation mit CTRP 7 konnte eine fast vollständige Reduzierung der AMPK-Aktivierung erreicht werden. Nach 24

Stunden stieg die AMPK-Phosphorylierung wieder an (Abb. 6B). Die Inkubation mit CTRP 9 führte erst nach 80 Minuten in HEK-Zellen zu einer deutlichen Aktivierung der AMPK. Nach 24 Stunden war die AMPK-Phosphorylierung noch signifikant gesteigert im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 6B). CTRP 1, 6 und 10 induzierten zu den entsprechenden Zeitpunkten in einer Konzentration von 4 µg/ml keine signifikante Veränderung der AMPK-Phosphorylierung in HEK293-Zellen (ohne Abbildung).

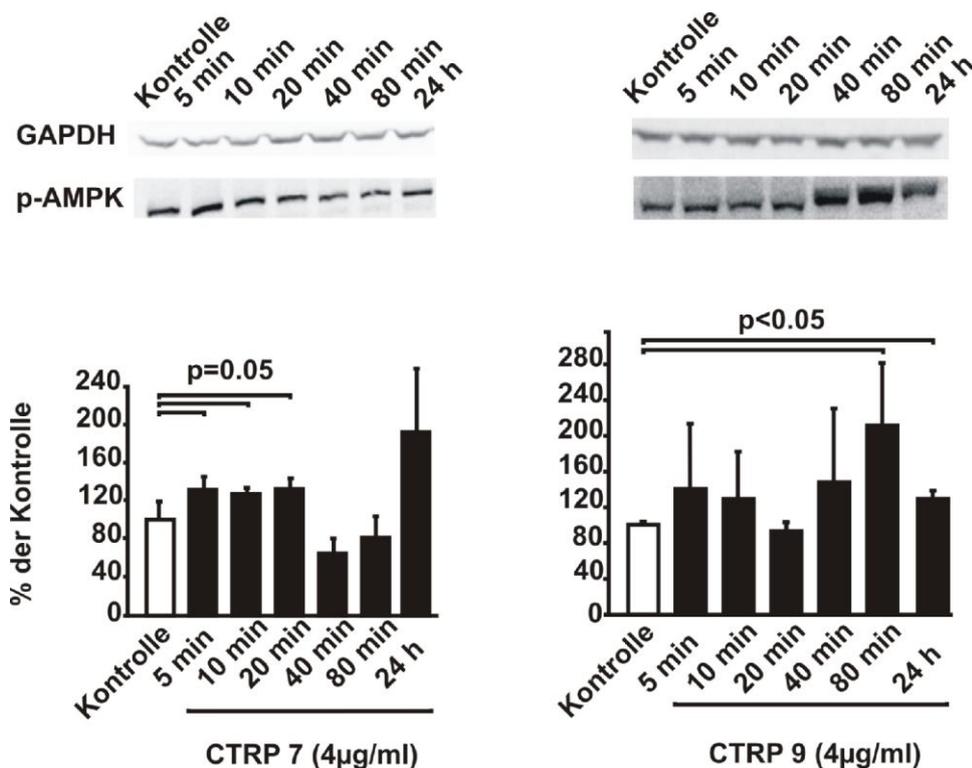


Abb. 6B AMPK-Aktivierung in mit CTRP 7 und 9 stimulierten und nicht stimulierten Zellen

Die Analysen wurden mit Western Blot durchgeführt. Als Kontrolle dienten HEK-Zellen, welche mit dem Puffer behandelt wurden, in welchem die CTRP's gelöst wurden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

4.4 Einfluss der CTRP's auf die ACC-Phosphorylierung in HEK293-Zellen

Mittels Western Blot wurde auch der Phosphorylierungszustand der ACC nach 4 µg/ml CTRP-Stimulation in HEK-Zellen analysiert. Eine verstärkte Phosphorylierung der ACC bewirkt eine Inaktivierung des Enzyms. Sowohl CTRP 2 als auch CTRP 9 führten nach 5 Minuten und 10 Minuten zu einer stark erhöhten Phosphorylierung der ACC,

nach 20 und 40 Minuten war die Phosphorylierung jedoch deutlich reduziert. Nach 80 Minuten trat die Steigerung der ACC-Phosphorylierung besonders stark nach der Stimulation mit CTRP 9 wieder auf (Abb. 7A und 7B). Ein Effekt von CTRP 3 auf die ACC-Phosphorylierung konnte lediglich nach 24 Stunden nachgewiesen werden (Abb. 7A). CTRP 7 verursachte bereits nach 5 und 10 Minuten eine starke Phosphorylierung der ACC und erreichte nach 20 und 40 Minuten wieder das Niveau der Kontrollzellen, um nach 80 Minuten und 24 h wieder anzusteigen (Abb. 7B). Hingegen induzierten CTRP 1, 6 und 10 keine Änderung der ACC Phosphorylierung in HEK293-Zellen.

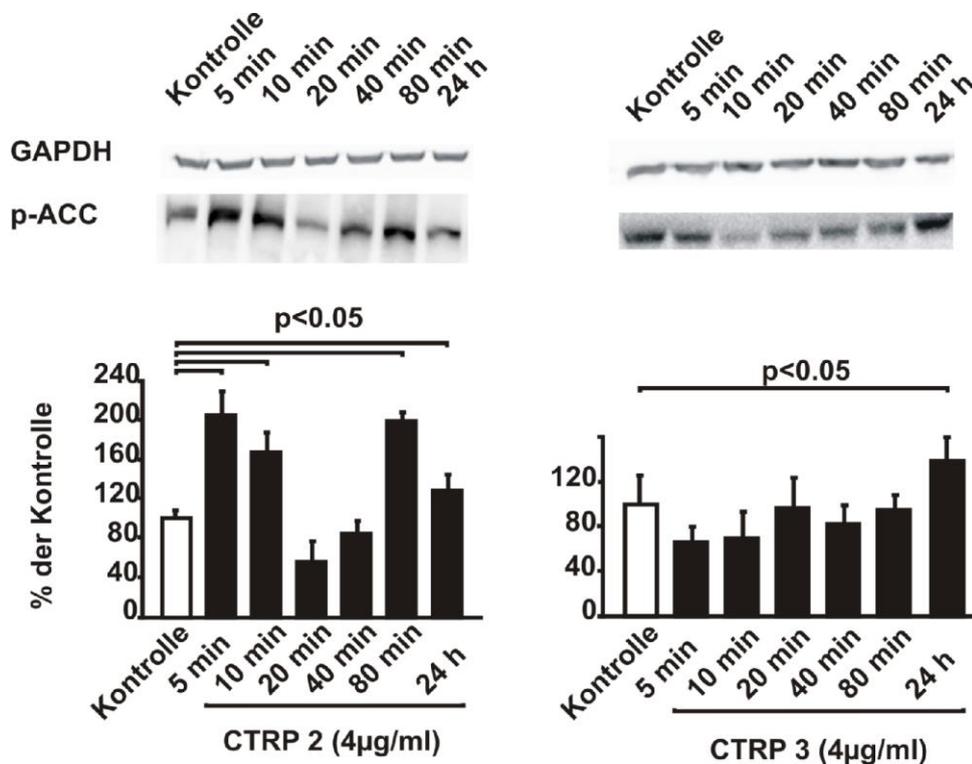


Abb. 7A Western Blot Nachweis der Phosphorylierung der ACC in mit CTRP 2 und 3 stimulierten und nicht stimulierten Zellen

Als Kontrolle dienten HEK-Zellen, welche mit dem Puffer behandelt wurden, in welchen die CTRP's gelöst wurde. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

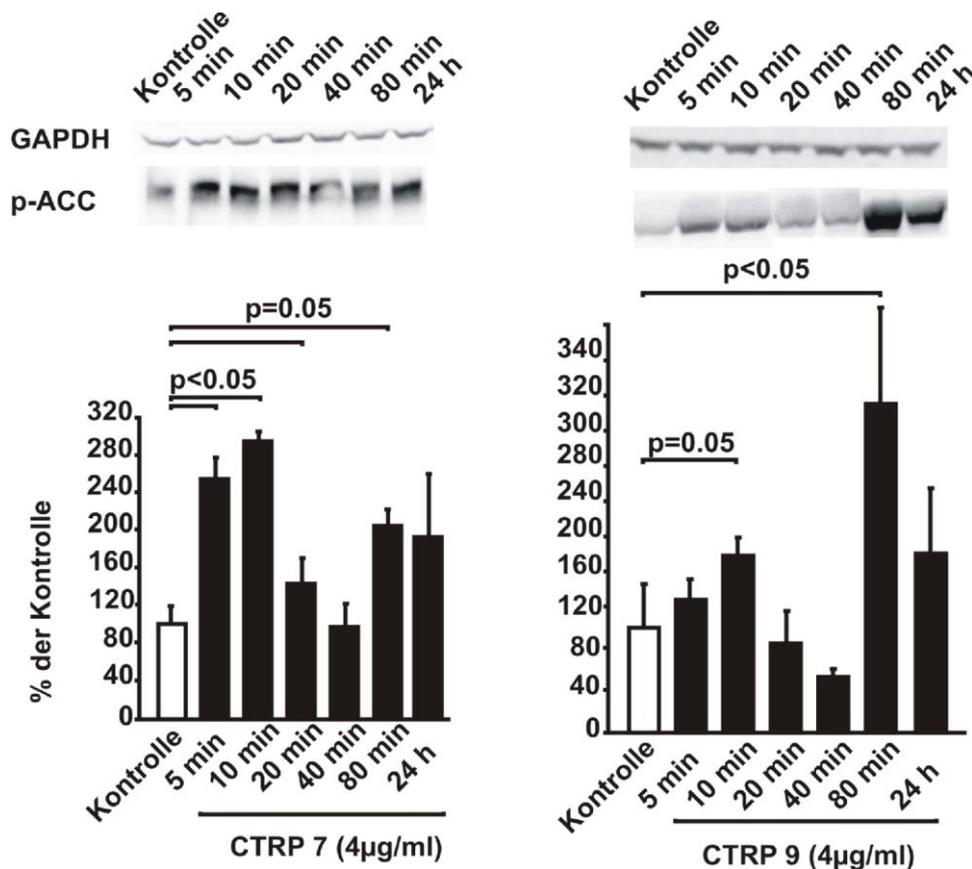


Abb. 7B Western Blot Nachweis der Phosphorylierung der ACC in mit CTRP 7 und 9 stimulierten und nicht stimulierten Zellen

Als Kontrolle dienten HEK-Zellen, welche mit dem Puffer behandelt wurden, in welchen die CTRP's gelöst wurde. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

4.5 Einfluss der CTRP's auf die AMPK- und ACC-Phosphorylierung in H9C2-Zellen

Nachdem die Wirksamkeit der CTRP's in HEK293-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden die weiteren Untersuchungen an H9C2-Zellen durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Muskelzellen die Translokation der Glukosetransporter verursacht und hierdurch den Glukosetransport beeinflusst (Musi, Hayashi et al. 2001). Analoge Untersuchungen zur Aktivierung der AMPK, der ACC sowie zum gesteigerten Glukosetransport durch CTRP's wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals an Herzzellen durchgeführt.

Die Behandlung mit CTRP 2, 3, 7 und 9 hatte in HEK-Zellen die Phosphorylierung von

AMPK und ACC induziert. Im Gegensatz zur Tumorzelllinie HEK293 ließ sich jedoch in den H9C2 Kardiomyoblasten unter dem Einfluss von CTRP 2 und CTRP 3 keine Veränderung der Phosphorylierung von AMPK oder ACC nachweisen. Daher wurde in H9C2-Zellen der Einfluss von CTRP 7 und 9 (4 µg/ml), die interessanterweise auch die größte Strukturhomologie zum Adiponektin aufweisen, untersucht. Durch die Stimulation mit CTRP 7 zeigte sich nach 20 Minuten eine Induktion von p-AMPK und innerhalb von 5 Minuten von p-ACC in H9C2-Zellen (Abb. 8).

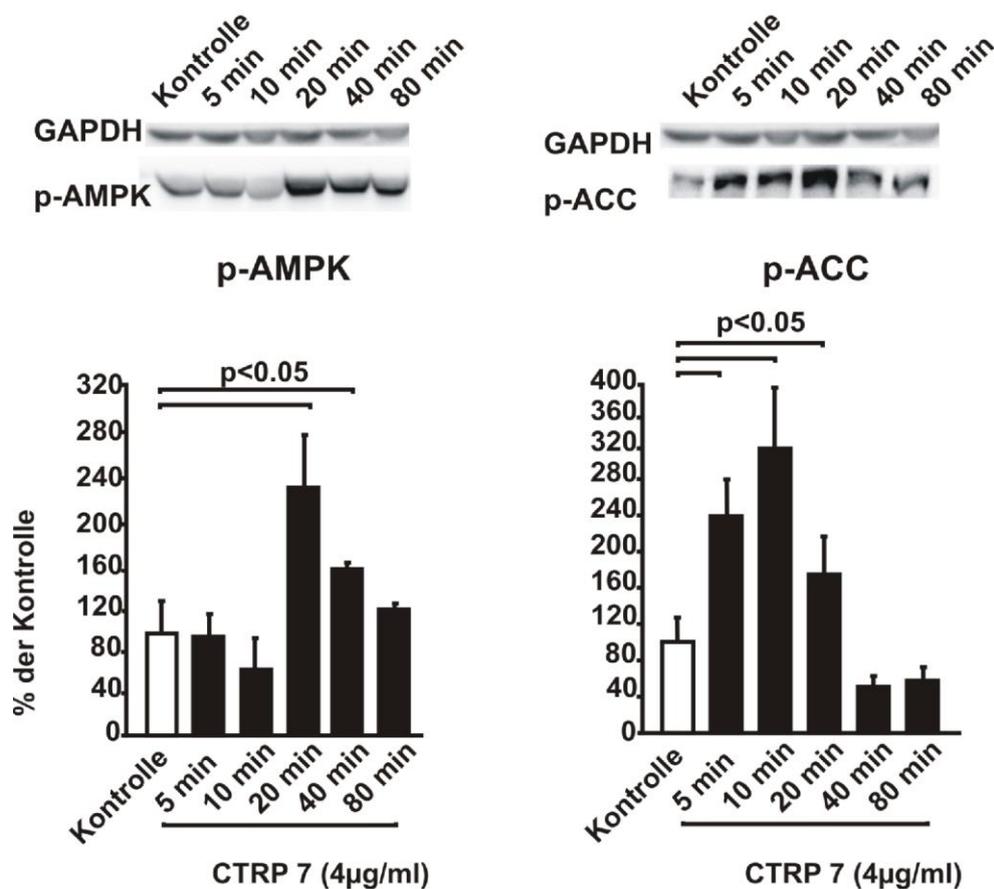


Abb. 8 Western Blot Analyse für CTRP 7-Stimulation von H9C2-Zellen

Repräsentativer Blot für den Nachweis der phosphorylierten AMPK (pAMPK) und phosphorylierten ACC (pACC) in mit dem Puffer behandelten (K, Kontrolle) oder in mit CTRP 7 stimulierten H9C2-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

CTRP 9 führte nach 40 Minuten zu einer deutlichen Steigerung der Phosphorylierung der AMPK. Die Phosphorylierung der ACC war nach Stimulation mit CTRP 9 nach 5

Minuten sehr deutlich gesteigert, erreichte maximale Effekte nach 10 Minuten und war nach 20 Minuten bereits aufgehoben. Nach 40 Minuten trat die Steigerung der ACC-Phosphorylierung wieder auf (Abb. 9).

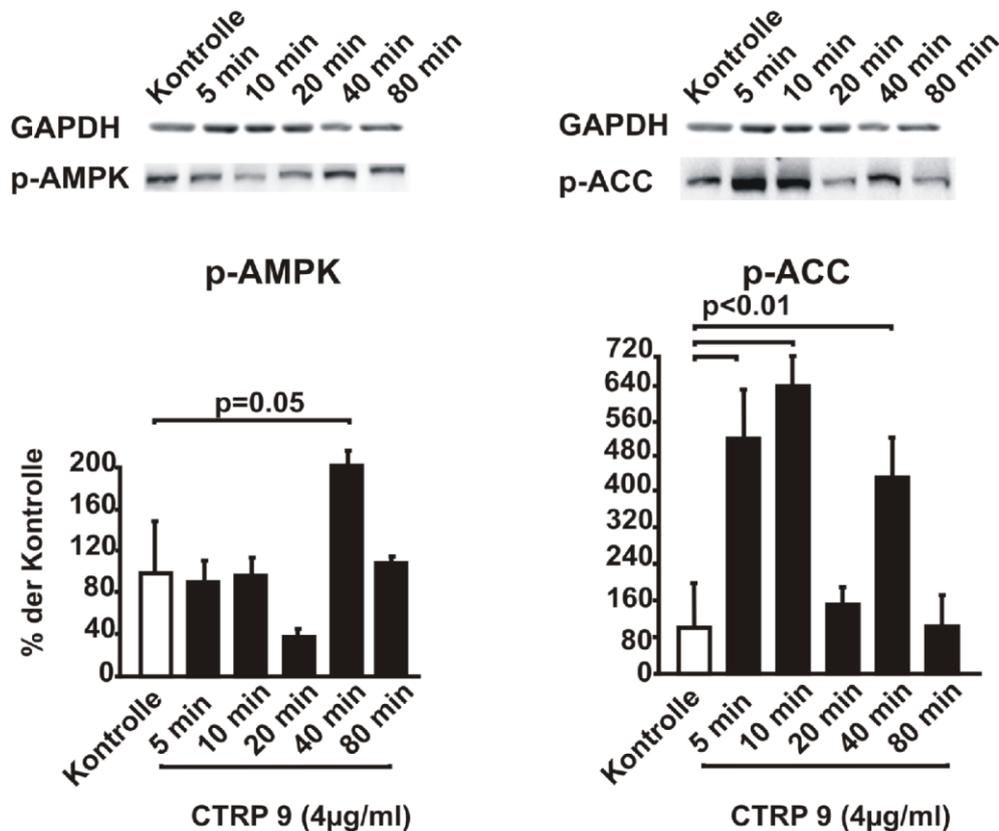


Abb. 9 Western Blot Analyse für CTRP 9-Stimulation von H9C2-Zellen

Repräsentativer Blot für den Nachweis der phosphorylierten AMPK (pAMPK) und phosphorylierten ACC (pACC) in mit dem Puffer behandelten (K, Kontrolle) oder in mit CTRP 9 stimulierten H9C2-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

4.6 Einfluss einer AMPK-Hemmung auf die Wirkung von CTRP 7 und CTRP 9 in H9C2-Zellen

Um die Beziehung zwischen AMPK und ACC zu prüfen, wurde der Einfluss des AMPK-Inhibitors Adenine-9-P-D-arabinofuranoside (Ara A), welcher ein AMP-Analogon ist, in H9C2-Zellen untersucht. Die Zellen wurden zunächst für 30 min mit DMSO oder mit in DMSO gelöstem Ara A (1 mM) behandelt und danach für 20 min

mit CTRP 7 (4 µg/ml) oder für 40 min mit CTRP 9 (4 µg/ml) behandelt. Diese Zeitpunkte mussten entsprechend der Ergebnisse der Vorversuche so gewählt werden, da die maximale AMPK-Aktivierung bzw. ACC-Aktivierung im Zeitfenster zwischen 10 und 40 Minuten für die verschiedenen CTRP's lag. CTRP 7 und 9 allein führten zu einer gesteigerten Phosphorylierung der AMPK und der ACC. Während die von CTRP 7 und 9 hervorgerufene Phosphorylierung der AMPK nach Präinkubation mit Ara A komplett aufgehoben wurde, konnte die Induktion der p-ACC nur moderat gehemmt werden (Abb. 10). Dies lässt eine Phosphorylierung der ACC durch einen AMPK-unabhängigen Signalweg vermuten.

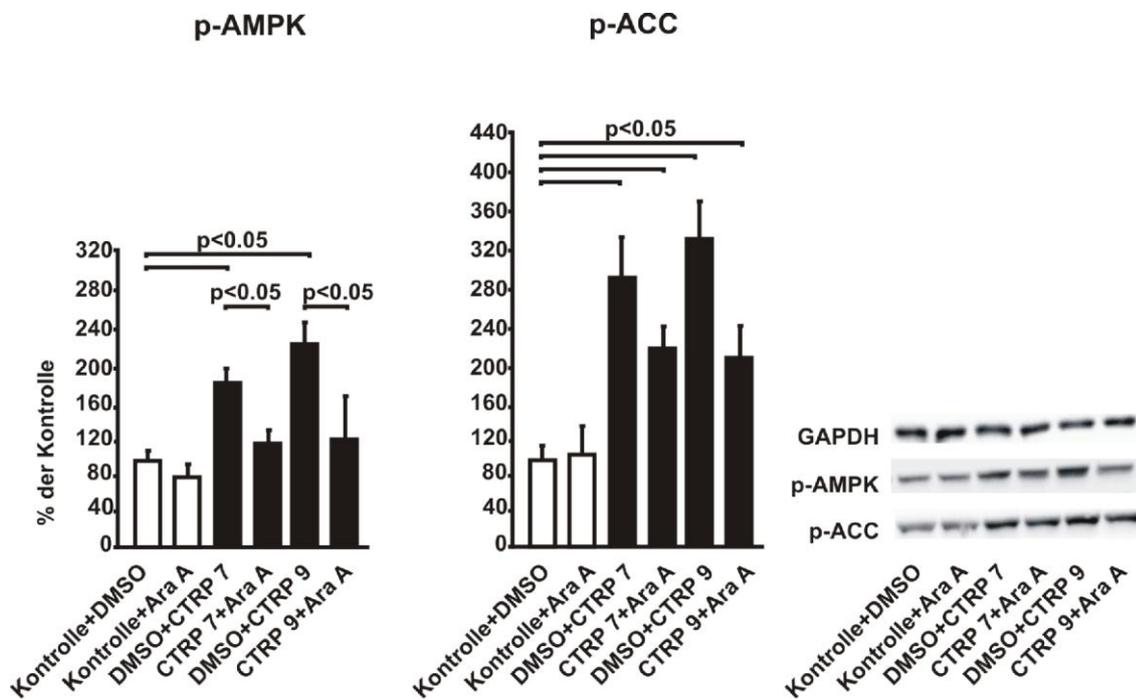


Abb. 10 Western Blot Analyse nach Stimulation von H9C2-Zellen mit CTRP7 oder CTRP9 mit oder ohne AraA Präinkubation

Repräsentativer Blot für den Nachweis der phosphorylierten AMPK (pAMPK) und der phosphorylierten ACC (pACC) nach 30 min Präinkubation mit DMSO oder Ara A (1 mM) und anschließender Stimulation mit Puffer (Kontrolle) oder für 20 min mit CTRP7 oder für 40 min mit CTRP9. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 pro Gruppe.

Um zu untersuchen, welcher der beiden Peaks bei der Phosphorylierung der ACC unter CTRP 9-Stimulation tatsächlich AMPK vermittelt ist, wurde der Zeitverlauf der ACC Aktivierung unter Hemmung der AMPK durch Ara A wiederholt. Wie in Abbildung 11

zu sehen ist, konnte die Phosphorylierung der ACC nach CTRP 9 Gabe nach 5 und 10 Minuten nicht gehemmt werden, während der 2. Peak nach ca. 40 Minuten signifikant vermindert war. Daraus kann man schlussfolgern, dass die CTRP 9-vermittelte AMPK Aktivierung nicht an der schnellen Inaktivierung der ACC beteiligt ist. Dies passt gut zum Zeitverlauf der AMPK Aktivierung durch CTRP 9, welche ebenfalls nach ca. 40 Minuten ihr Maximum erreicht in H9C2 Zellen (Abb. 9).

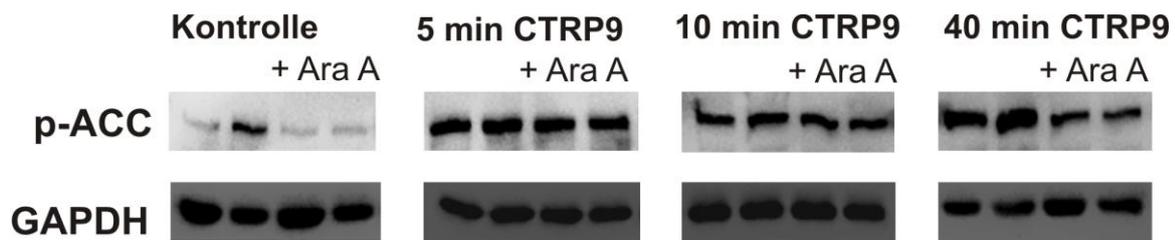


Abb. 11 Western Blot Analyse für die CTRP 9-Stimulation von H9C2-Zellen

Repräsentativer Blot für den Nachweis der phosphorylierten ACC (pACC) nach 30 min Präinkubation mit DMSO oder Ara A (1 mM) und anschließender Stimulation mit CTRP 9 für 5, 10 oder 40 Minuten in H9C2-Zellen. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

4.7 Einfluss von CTRP 7 und 9 auf die Translokation des Glukosetransporters 1 in H9C2-Zellen

Glukose wird über die Glukosetransporterproteine (GLUT), die aus dem Zytosol in die Zellmembran translozieren, energieunabhängig in die Zelle aufgenommen. Glukose diffundiert durch die transmembranären Glukosetransporter (im Herzen GLUT1 und GLUT4) entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle hinein. AMPK steigert die Translokation der Glukosetransporter und somit die Glukoseaufnahme. Um die Zustandsveränderung der Glukosetransporter nach der CTRP-Stimulation zu untersuchen, wurde die Lokalisation des GLUT1-Proteins mittels Immunzytochemie nachgewiesen. Die Lokalisation und der Nachweis von GLUT1 in H9C2-Zellen wurden nach Stimulation mit CTRP 7 und CTRP 9 für 5, 10, 20, 40, 80 Minuten durchgeführt. Der Versuch zeigte, dass das GLUT1-Protein nach der 5-minütigen CTRP 7-Stimulation vermehrt in die Membran translozierte. Nach 20 Minuten ließ sich ein Maximaleffekt nachweisen, während nach 40 Minuten der Effekt weitgehend

aufgehoben war (Abb.12).

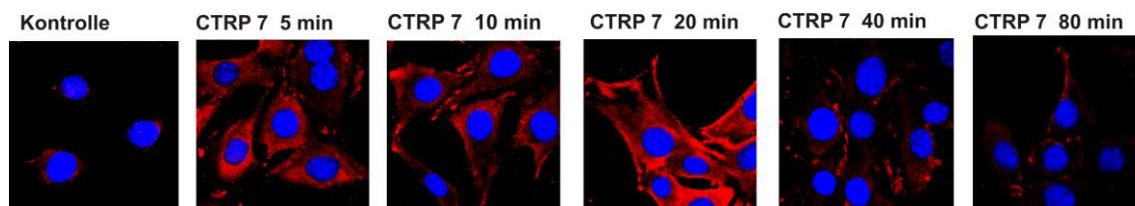


Abb. 12 Immunfluoreszenz für GLUT1-Translokation in den mit CTRP 7 stimulierten H9C2-Zellen
Die H9C2-Zellen wurden mit dem Puffer oder 4 $\mu\text{g/ml}$ CTRP 7 stimuliert. Der Kern wurde mit Topro 642/661 (1:200) gefärbt. Der Cy3 markierte GLUT1 wurde mit einem Argon-Ionen Laser detektiert. (Anregungsstrahlengang: 543 nm Emissionsstrahlengang: 560/615 nm)

Die Zugabe von CTRP 9 zeigte nach 10 Minuten eine signifikant gesteigerte Translokation von GLUT1 in den behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen. Die Translokation von GLUT1 bei der Stimulation mit CTRP 9 zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie bei der Stimulation mit CTRP 7. (Abb. 13)

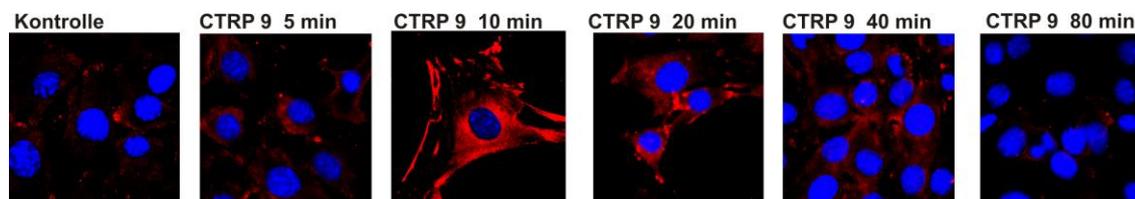


Abb. 13 Immunfluoreszenz für GLUT1-Translokation in den mit CTRP 9 stimulierten H9C2-Zellen
Die H9C2-Zellen wurden mit dem Puffer oder 4 $\mu\text{g/ml}$ CTRP 9 stimuliert. Der Kern wurde mit Topro 642/661 (1:200) gefärbt. Der Cy3 markierte GLUT1 wurde mit einem Argon-Ionen Laser detektiert. (Anregungsstrahlengang: 543 nm Emissionsstrahlengang: 560/615 nm)

Um die Bedeutung der AMPK-Aktivierung für die GLUT1-Translokation zu untersuchen wurden die Zellen wie zuvor beschrieben ausgesät und inkubiert. Die Lokalisation von GLUT1 in H9C2-Zellen wurde jedoch nur nach der 30-minütigen Präinkubation mit Ara A und anschließender Stimulation mit CTRP 7 (4 $\mu\text{g/ml}$) für 20 min oder CTRP 9 (4 $\mu\text{g/ml}$) für 10 min analysiert. Es zeigte sich, dass die Hemmung der AMPK durch Ara A eine deutliche Reduktion der von CTRP 7 und 9 induzierten GLUT1-Translokation bewirkte (Abb. 14).

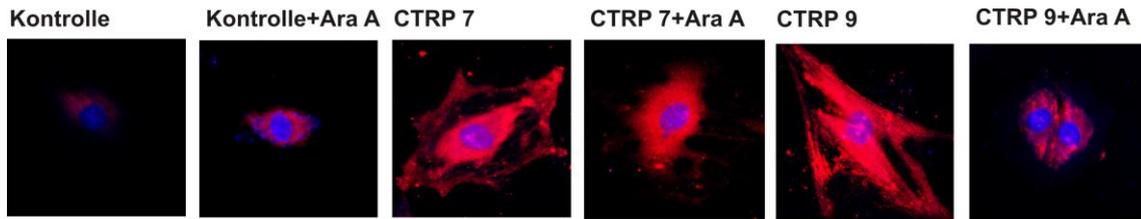


Abb. 14 Immunfluoreszenz für GLUT1-Translokation in den mit CTRP 7 oder CTRP9 stimulierten H9C2-Zellen

Die H9C2-Zellen wurden für 30 min mit DMSO oder Ara A (1 mM) präinkubiert, dann mit Puffer oder 20 min mit 4 µg/ml CTRP7 oder 10 min mit 4 µg/ml CTRP 9 stimuliert. Der Kern wurde mit Topro 642/661 (1:200) gefärbt. Der Cy3 markierte GLUT1 wurde mit einem Argon-Ionen Laser detektiert. (Anregungsstrahlengang: 543 nm, Emmissionsstrahlengang: 560/615 nm)

Neben dem Nachweis der GLUT1 Translokation mittels Immunzytochemie, wurde in Membranfraktionen GLUT1 nachgewiesen. Die H9C2-Zellen wurden mit CTRP 7 für 20 Minuten oder mit CTRP 9 für 10 Minuten stimuliert. Die isolierte Membranfraktion wurde mittels Western Blot analysiert. Die Stimulation mit CTRP 7 für 20 Minuten und mit CTRP 9 für 10 Minuten führte zu einer signifikanten Steigerung von GLUT1 in der Membran im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 15).

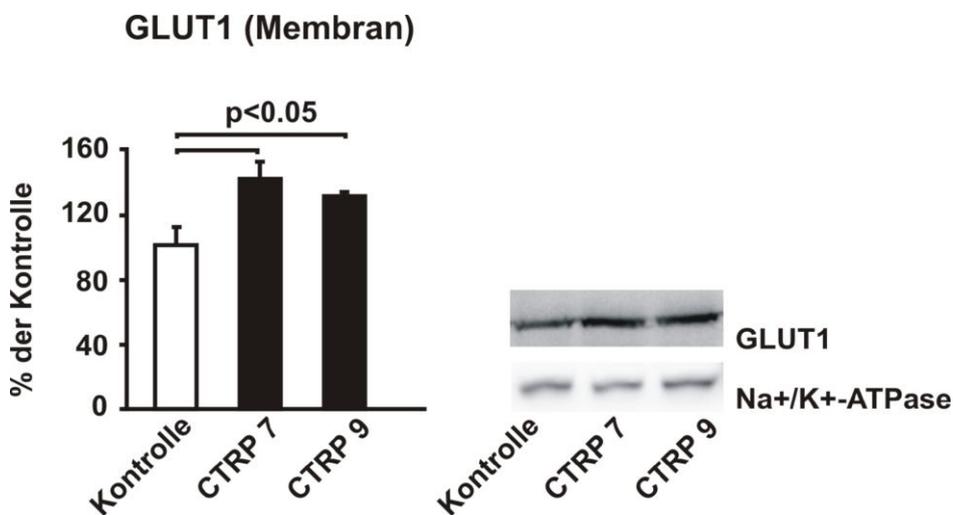


Abb. 15 Western Blot Nachweis von GLUT1 in der Membran der H9C2-Zellen nach CTRP7- und CTRP 9-Behandlung

Repräsentativer Blot für den Nachweis von GLUT1 in unbehandelten (K, Kontrolle) oder in mit CTRP 7 und CTRP 9 (4 µg/ml) behandelten H9C2-Zellen. Na⁺/K⁺ ATPase zum Vergleich der Proteinbeladung der SDS-PAGE-Gele. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 pro Gruppe.

4.8 Einfluss von CTRP 7 und 9 auf die Translokation des Glukosetransporters 4 in H9C2-Zellen

Im Vorversuch ergab sich kein guter Nachweis des nativen Glukosetransporters GLUT4 in der kardialen H9C2-Muskelzelllinie in der Immunzytochemie. Diese Problematik ist in der Literatur auch von anderen Arbeitsgruppen für Muskelzelllinien beschrieben worden. In unserer Arbeitsgruppe wurden deshalb die H9C2-Zellen mit pQBI-HA-GLUT4-Plasmid (von Prof. Samuel W. Cushman, NIDDK, National Institutes of Health, USA) transfiziert, um eine stabile GLUT4-Überexpression herzustellen. Das pQBI-HA-GLUT4-Plasmid enthält eine Nukleotideinsertion, die für ein Hämagglutinin-Tag (HA) innerhalb der ersten extrazytoplasmatischen Domäne des GLUT4 kodiert. Nur wenn das überexprimierte GLUT4 in die Membran transloziert, kann das HA-Tag in den nicht permeabilisierten Zellen nachgewiesen werden. Die transfizierten Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion in serumfreien Medium inkubiert. Um den Einfluss der CTRP's auf die Zellen zu analysieren, wurden die Zellen für 5, 10, 20, 40, 80 Minuten mit 4 µg/ml CTRP 7 oder CTRP 9 behandelt. Die Translokation von GLUT4 wurde mit Hilfe eines anti-Hämagglutinin (HA)-Antikörpers nachgewiesen. Es zeigte sich in der Immunzytochemie, dass CTRP 7 ab 10 Minuten eine stärkere Darstellung von HA-GLUT4 hervorrief (*Abb. 16*). Nach 20 Minuten führte CTRP 7 in H9C2-Zellen zu einem schwächeren Signal, um nach 40 Minuten wieder anzusteigen.

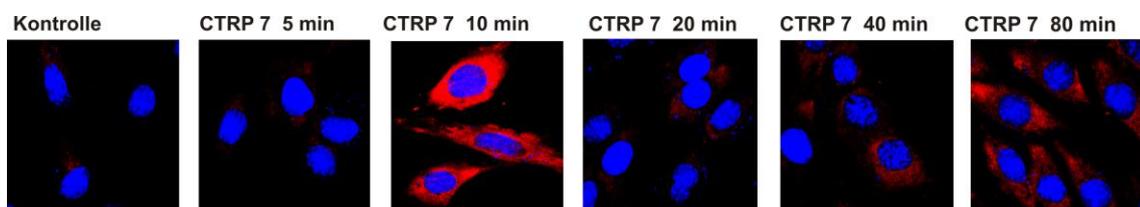


Abb. 16 Immunfluoreszenz für GLUT4-HA-Translokation in den mit CTRP 7 stimulierten H9C2-Zellen

Die H9C2-Zellen wurden mit pQBI-HA-GLUT4 Plasmid transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem Puffer oder 4 µg/ml CTRP 7 stimuliert. Der Kern wurde mit Topro 642/661 (1:200) gefärbt. Das Cy3 markierte HA wurde mit einem Argon-Ionen Laser detektiert. (Anregungsstrahlengang: 543 nm Emissionsstrahlengang: 560/615 nm)

Nach Stimulation mit CTRP 9 trat in H9C2-Zellen nach 5 Minuten eine erhöhte Translokation von HA-GLUT4 auf (Abb. 17). Diese Translokation war nach 10 Minuten deutlich abgeschwächt. Nach 20 Minuten war der erhöhte Wert der Translokation von HA-GLUT4 wieder nachweisbar und blieb erhalten. Nach 80 Minuten erreichte CTRP 9 maximale Effekte auf die Translokation von GLUT4 in die Zellmembran.

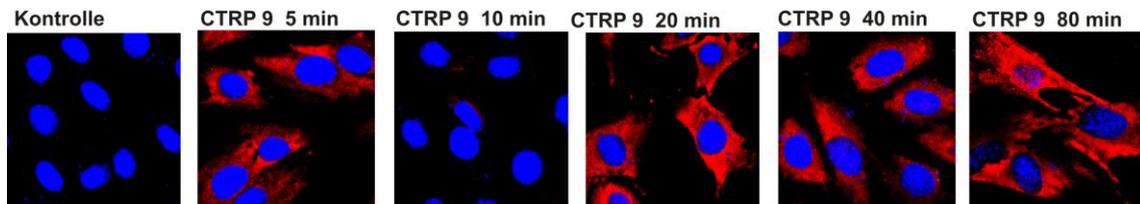


Abb. 17 Immunfluoreszenz für GLUT1-Translokation in den mit CTRP 9 stimulierten H9C2-Zellen
 Die H9C2-Zellen wurden mit pQBI-HA-GLUT4 Plasmid transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem Puffer oder 4 µg/ml CTRP 9 stimuliert. Der Kern wurde mit Topro 642/661 (1:200) gefärbt. Das Cy3 markierte HA wurde mit einem Argon-Ionen Laser detektiert. (Anregungsstrahlengang: 543 nm Emissionsstrahlengang: 560/615 nm)

Um den Einfluss der AMPK auf die Translokation von GLUT4 zu untersuchen, wurden die mit GLUT4-HA transfizierten H9C2-Zellen zunächst 30 min mit Ara A inkubiert und anschließend für 80 min mit CTRP 7 und 9 stimuliert. Während die Präinkubation mit Ara A eine deutliche Reduktion der durch CTRP 7 induzierten GLUT4-Translokation ergab, führte diese Präinkubation mit Ara A nur zu einer moderaten Verminderung der durch CTRP 9 induzierten GLUT4-Translokation (Abb. 18).

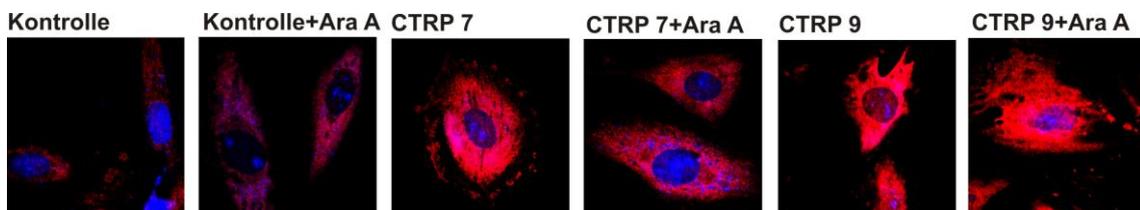


Abb. 18 Immunfluoreszenz für GLUT4-Translokation in den mit CTRP 9 stimulierten H9C2-Zellen
 Die H9C2-Zellen wurden mit pQBI-HA-GLUT4 Plasmid transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in 30 min mit DMSO oder Ara A (1 mM) präinkubiert, dann mit dem Lösungsmittel oder in 80 min mit 4 µg/ml CTRP 7 oder CTRP 9 stimuliert. Der Kern wurde mit Topro 642/661 (1:200) gefärbt. Das Cy3 markierte HA wurde mit einem Argon-Ionen Laser detektiert. (Anregungsstrahlengang: 543 nm Emissionsstrahlengang: 560/615 nm)

Akt substrate of 160 kDa (AS160) kann durch Phosphorylierung inaktiviert werden. Phosphoryliertes AS160 kann dann die GLUT4 Translokation zur Plasmamembran nicht mehr hemmen (Sano, Kane et al. 2003; Zeigerer, McBrayer et al. 2004). Hierbei zeigte sich nach 20-minütigen Stimulation mit CTRP 7 und CTRP 9 eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung von AS160 in H9C2 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (*Abb. 19*).

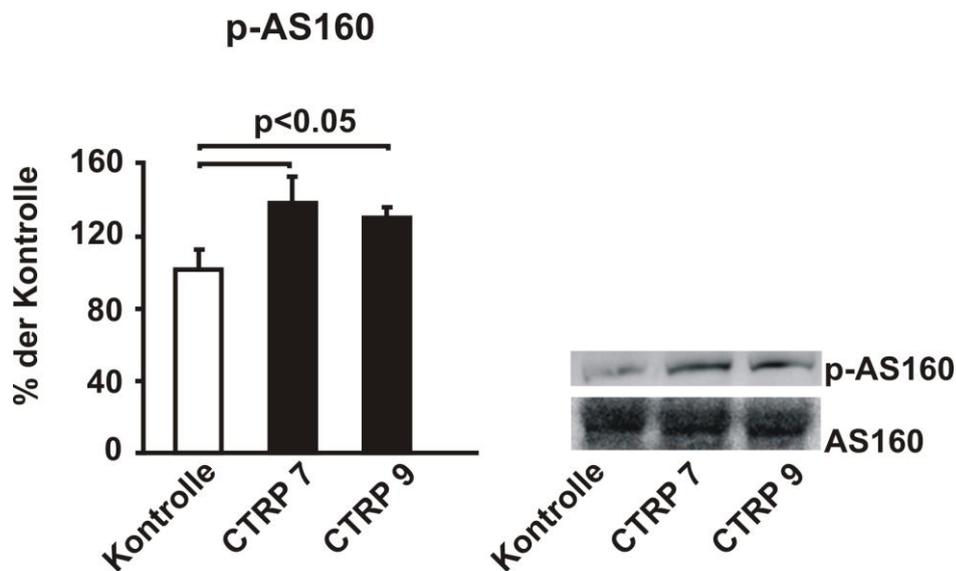


Abb. 19 Western Blot Analyse nach Stimulation von H9C2-Zellen mit CTRP 7 oder CTRP 9

Repräsentativer Blot für den Nachweis der AKT Substrate 160 (AS160) und der phosphorylierten AKT Substrate 160 (p-AS160) nach 20 min Stimulation mit Puffer (Kontrolle) oder CTRP 7 und CTRP 9. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

Neben dem Nachweis von p-AS160 mittels Western Blot wurde die isolierte Membranfraktion der mit pQBI-HA-GLUT4 Plasmid transfizierten H9C2-Zellen untersucht. Die Darstellung von GLUT4 in der Membran wurde mit Hilfe von anti-HA-Antikörper durchgeführt. Es zeigte sich, dass CTRP 7 und 9 in 80 Minuten eine deutliche Steigerung von GLUT4 in der Membran im Vergleich zu Kontrollzellen induzierten (*Abb. 20*).

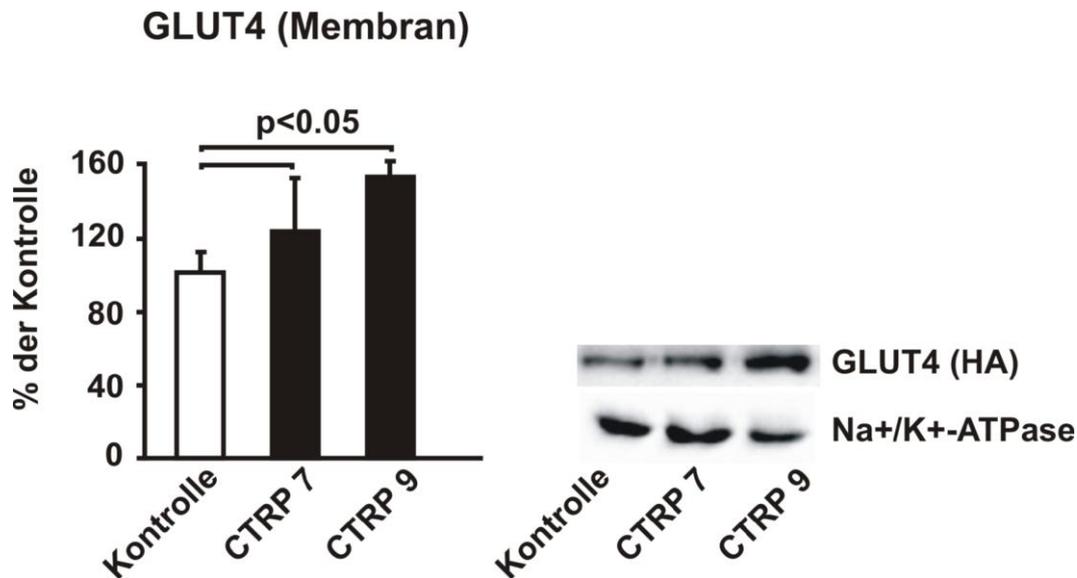


Abb. 20 Western Blot Nachweis von GLUT4 in der Membran der H9C2-Zellen nach CTRP7- und CTRP 9-Behandlung

Die H9C2-Zellen wurden mit pQBI-HA-GLUT4 Plasmid transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem Puffer oder 4 µg/ml CTRP 7 stimuliert. Repräsentativer Blot für den Nachweis von HA in unbehandelten (K, Kontrolle) oder in mit CTRP 7 und CTRP 9 (4 µg/ml) behandelten H9C2-Zellen. Na⁺/K⁺ ATPase zum Vergleich der Proteinbeladung der SDS-PAGE-Gele. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 pro Gruppe.

4.9 Einfluss von CTRP 7 und 9 auf die Glukoseaufnahme in H9C2-Zellen

Über die Messung der Glukoseinkorporation sollte untersucht werden, ob CTRP 7 und 9 durch die vermehrte Translokation der Glukosetransporter einen Einfluss auf die Glukoseaufnahme von H9C2-Zellen ausüben. Die Zellen wurden vor dem eigentlichen Versuch für 12 h im serum- und glukosefreien Medium kultiviert und für 30 min mit DMSO oder Ara A (1 mM) präinkubiert. Die Messung der Glukoseaufnahme erfolgte nach Stimulation mit CTRP 7 und 9 (4 µg/ml) für 90 min. Durch Behandlung mit CTRP 7 und 9 zeigte sich eine Steigerung der Glukoseaufnahme im Vergleich zu Kontrollzellen, welche mit DMSO (Lösungsmittel für Ara A) behandelt wurden. Dieser Effekt wurde durch Präinkubation mit Ara A verhindert (Abb. 21). Diese Steigerung der Glukoseaufnahme könnte durch GLUT1 vermittelt sein.

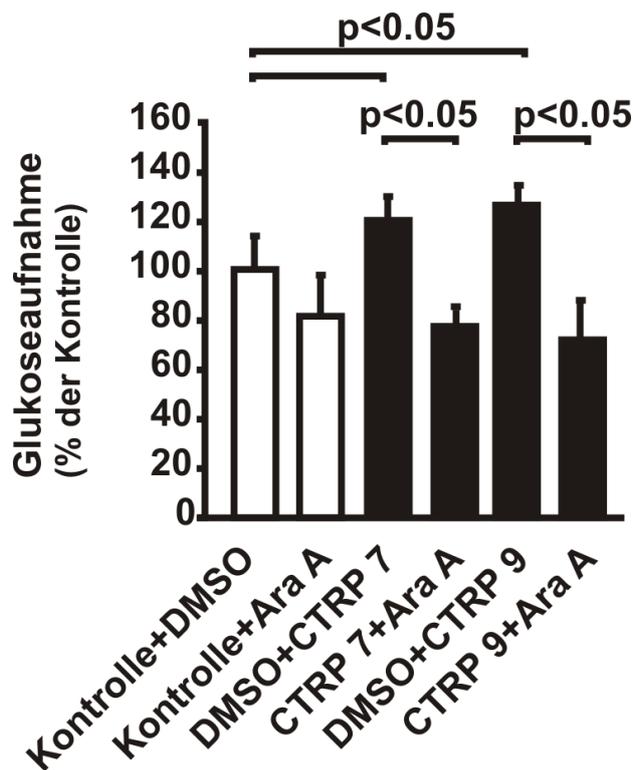


Abb. 21 Bestimmung der Glukoseaufnahme von H9C2-Zellen

Die H9C2-Zellen wurden für 30 min mit DMSO oder Ara A (1 mM) präinkubiert. Danach erfolgte für 90 min die Stimulation entweder mit Puffer oder mit CTRP 7 oder CTRP 9 (4 µg/ml). Die Aufnahme der tritiumversetzten Glukose wurde in Bezug auf die Proteinmenge berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 pro Gruppe.

Um auch den Einfluss der CTRP's auf die Glukoseaufnahme via GLUT4 zu untersuchen, wurden die H9C2-Zellen mit GLUT4-HA transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 12 h im serum- und glukosefreien Medium inkubiert. Nach Präinkubation mit DMSO oder Ara A für 30 min wurden die Zellen für 90 Minuten mit CTRP 7 oder 9 (4µg/ml) stimuliert. Es zeigte sich, dass CTRP 7 und CTRP 9 zu einer deutlichen Steigerung der Glukoseaufnahme führten. Ara A hemmte den Effekt von CTRP 7 auf die Glukoseaufnahme, während die Wirkung von CTRP 9 nur gering modifiziert wurde (Abb. 22), was zu den Ergebnissen der Immunzytochemie passt (Abb. 18).

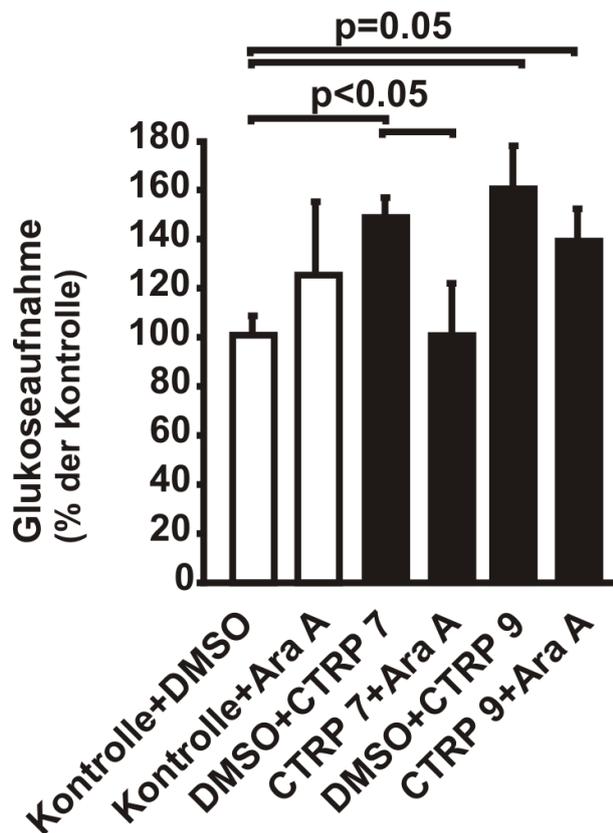


Abb. 22 Bestimmung der Glukoseaufnahme von pQBI-HA-GLUT4 transfizierten H9C2-Zellen

Die H9C2-Zellen wurden für 24 h mit dem pQBI-HA-GLUT4 Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit DMSO oder Ara A (1 mM) präinkubiert und dann für 90 min mit Lösungsmittel oder mit CTRP 7 oder CTRP 9 (4 µg/ml) stimuliert. Die Aufnahme der tritiumversetzten Glukose wurde in Bezug auf die Proteinmenge berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 pro Gruppe.

4.10 Bedeutung des Adiponektinrezeptors 1 für die CTRP-Effekte in H9C2-Zellen

Der Adiponektinrezeptor 1 wird vor allem im Skelettmuskel exprimiert. Eigene Voruntersuchungen haben gezeigt, dass AdipoR1 auch in H9C2-Zellen deutlich stärker exprimiert ist als AdipoR2 (ohne Abbildung). Zur Hemmung der Adiponektinrezeptoren vermittelten Effekte wurde die Methode der RNA-Interferenz gewählt, mit deren Hilfe die Expression von Adiponektinrezeptor 1 und 2 in H9C2-Zellen spezifisch herabreguliert wurde. Voruntersuchungen zeigten, dass eine solche siRNA-Transfektion nach 48 h beispielsweise zu einer ca. 70%-igen Herabregulation von Adiponektinrezeptor 1 führt. Adiponektinrezeptor 2 wurde in den mit AdipoR1-

siRNA behandelten Zellen hingegen nicht beeinflusst (ohne Abbildung). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 20 Minuten mit CTRP 7 und CTRP 9 stimuliert. Die Auswirkungen auf die Proteinexpression wurden mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle dienten Transfektionen mit siRNA-Oligonukleotiden (Mock), welche die gleiche Nukleotidzusammensetzung nicht jedoch Nukleotidreihenfolge wie obige siRNA-Oligos haben, also nicht auf den AdipoR1 wirkten.

Die Zellen zeigten nach 48 Stunden eine deutliche Reduzierung der AdipoR1-Proteine. Die 20-minütige CTRP 7-Stimulation führte zur gesteigerten Phosphorylierung der AMPK und ACC in Kontrollzellen. Die Phosphorylierung der AMPK und ACC wurden nach Transfektion mit AdipoR1-siRNA im Vergleich zu Mock transfizierten Zellen deutlich reduziert (Abb. 23). Die Transfektion von AdipoR2 siRNA beeinflusste die AMPK-Phosphorylierung nach CTRP 7-Stimulation hingegen nicht (ohne Abbildung).

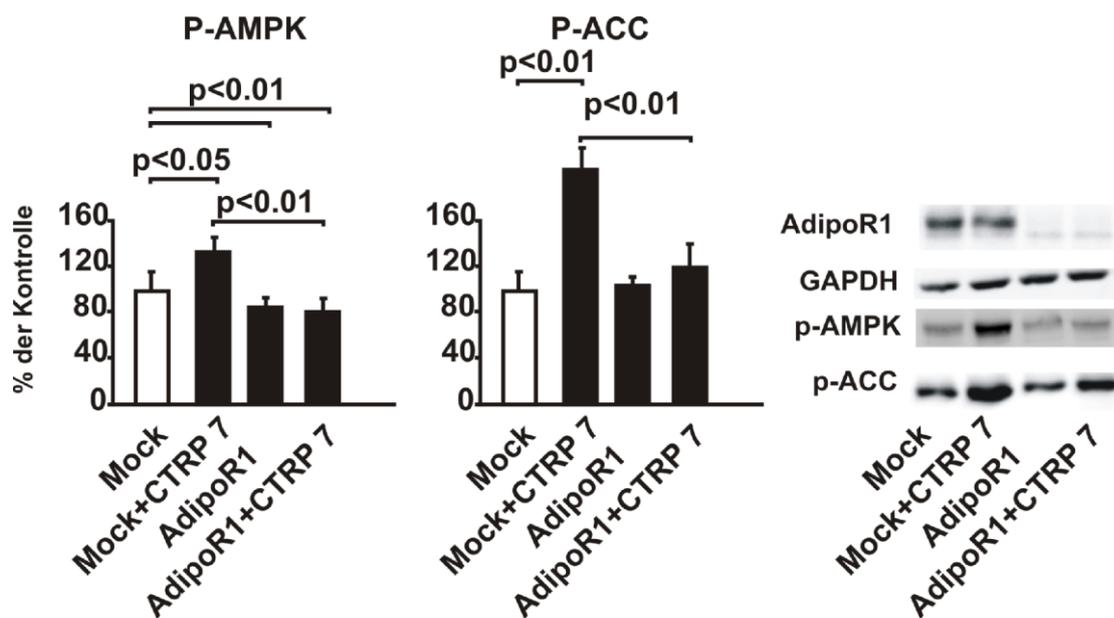


Abb. 23 Nachweis der AMPK- und ACC-Aktivierung in H9C2-Zellen nach 20-minütiger Stimulation mit CTRP 7, siRNA-Knockdown des AdipoR1 bzw. Mock-Transfektion

Repräsentativer Blot für den Nachweis der phosphorylierten AMPK (pAMPK) und phosphorylierten ACC (pACC) in siRNA-transfizierten (AdipoR1), mock-transfizierten (Mock) Zellen, die mit Puffer oder CTRP 7 stimuliert wurden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

CTRP 9 führte nach 40 Minuten in den Mock-transfizierten Zellen zu einer Steigerung

der Phosphorylierung der AMPK und der ACC. Dieser 40-minütige Effekt von CTRP 9 wurde in den mit AdipoR1-siRNA transfizierten Zellen vollständig aufgehoben, nicht jedoch in den AdipoR2-siRNA transfizierten Zellen (ohne Abbildung). AdipoR1-siRNA bewirkte außerdem eine deutliche Reduktion der basalen AMPK- und ACC-Phosphorylierung (Abb. 24).

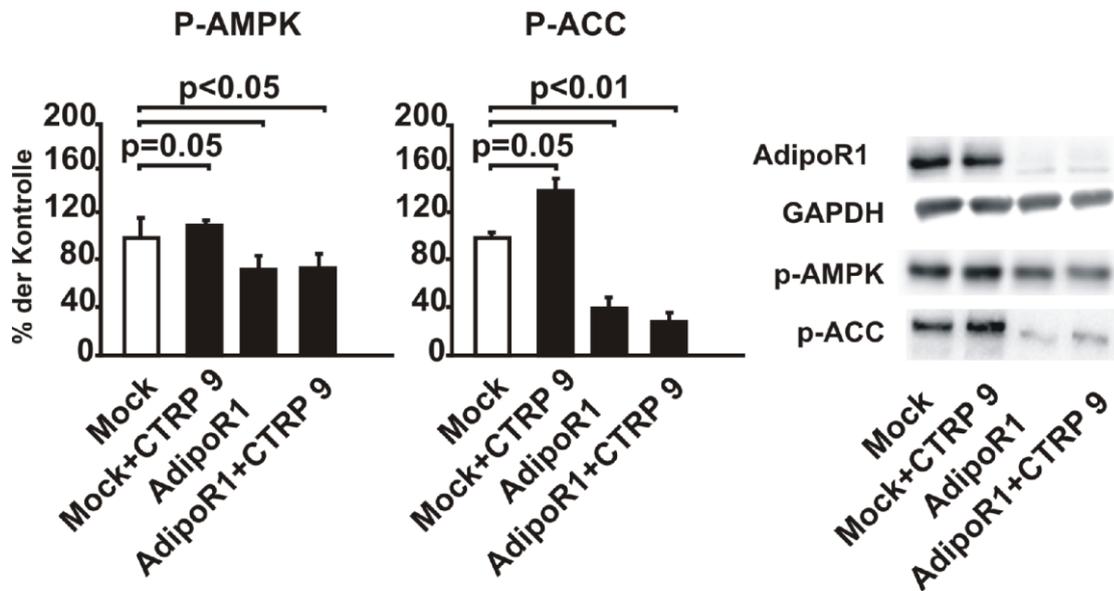


Abb. 24 Nachweis der AMPK- und ACC-Aktivierung in H9C2-Zellen nach 40-minütiger Stimulation mit CTRP 9, siRNA-Knockdown des Adipo. R1 bzw. Mock-Transfektion

Repräsentativer Blot für den Nachweis der phosphorylierten AMPK (pAMPK) und phosphorylierten ACC (pACC) in siRNA-transfizierten (AdipoR1), mock-transfizierten (Mock) Zellen, die mit Puffer oder CTRP 9 stimuliert wurde. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$ pro Gruppe.

5. Diskussion

5.1 Die *in vivo* Verteilung von Adiponektin und der CTRP's

5.1.1 Die Expression von Adiponektin und der CTRP's in verschiedenen Geweben

Das Fettgewebe setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Diese Zusammensetzung scheint für die Expression des Adiponektins und der CTRP's eine wichtige Rolle zu spielen. Neben reifen Adipozyten findet sich im Fettgewebe die Stromavaskuläre Zellfraktion. Diese besteht aus Präadipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen des Immunsystems und macht bis zu 50% der Zellen im Fettgewebe aus (Gustafson 2010; Tilg and Moschen 2006). Adiponektin wird ausschließlich von differenzierten Adipozyten gebildet und ins Serum abgegeben (Hu, Liang et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass Adiponektin präferentiell im Fettgewebe exprimiert wird und in den meisten Organen der Ratte nur geringfügig detektierbar ist. Im Vergleich dazu werden CTRP's überwiegend von den Stromavaskulären Zellen, in niedrigen Mengen aber auch von reifen Adipozyten exprimiert (Davis and Scherer 2008; Wong, Krawczyk et al. 2009). Im Gegensatz zu Adiponektin finden sich CTRP 1, 2, 3, 6, 7, 9 und 10 deshalb nicht nur im Fettgewebe, sondern werden fast ubiquitär exprimiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von CTRP 1, 2, 3, 7, 9, 10 im linken Ventrikel (LV) und im Skelettmuskel höher ist als im Fettgewebe. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass alle CTRP's Glykoproteine sind und dass CTRP 1, 2, 3, 5, 6, 9, und 13 im Serum zirkulieren (Wei, Peterson et al. 2011; Wong, Krawczyk et al. 2008; Wong, Krawczyk et al. 2009). Es wird deshalb angenommen, dass CTRP's nicht nur parakrin oder autokrin, sondern auch als endokrine Hormone wirken (Wong, Krawczyk et al. 2009).

5.1.2 Die Einflussfaktoren der Verteilung von Adiponektin und der CTRP's

Neben unterschiedlich starker Expression des Adiponektins und der CTRP's in verschiedenen Organen scheint auch das Geschlecht sowohl deren Expressionsstärke als auch Serumspiegel zu beeinflussen. So konnten bei Frauen signifikant höhere Adiponektinspiegel im Serum als bei Männern nachgewiesen werden (Tschritter, Fritsche et al. 2003). Dieser Geschlechtsunterschied wurde auch für die CTRP's bei Mäusen beschrieben (Wong, Krawczyk et al. 2008). Hierbei wurde bei weiblichen Wildtypmäusen im Vergleich zu den männlichen Tieren eine erhöhte RNA-Expression von CTRP 6, 9 und 13 detektiert, wobei der Serumspiegel positiv mit der Genexpression korrelierte (Wei, Peterson et al. 2011; Wong, Krawczyk et al. 2008; Wong, Krawczyk et al. 2009). Das Sexualhormon Testosteron (Page, Herbst et al. 2005) sowie das Verhältnis zwischen Androgenen und Östrogenen (Laughlin, Barrett-Connor et al. 2006; Laughlin, Barrett-Connor et al. 2007) scheint dabei die Expressionsstärke des Adiponektins wie auch seiner Paraloge zu beeinflussen.

Daneben verändern auch pathologische Zustände wie beispielsweise Adipositas Expression und Serumspiegel des Adiponektins und der CTRP's. In den letzten Jahren wurden die vielfältigen Wirkungen des Adipokins Adiponektin auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel untersucht. Ältere und übergewichtige Personen weisen ein erhöhtes Risiko auf, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken. Die dabei zunehmende Insulinresistenz, die als verminderte Wirkung des Insulins an seinen Wirkorten in Leber, Fett- und Muskelgewebe definiert wird, führt zu einer reduzierten Glukoseaufnahme (Pessin and Saltiel 2000). Im Mausmodell wurde im Jahr 2001 nachgewiesen, dass die Gabe von Adiponektin die Insulinsensitivität nach einer fettreichen Diät erhöht (Berg, Combs et al. 2001) und in *ob/ob* Mäusen die Insulinresistenz und die bestehende Diabeteserkrankung verbessert (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Das Ausmaß der Adipositas ist negativ mit der Konzentration von Adiponektin, jedoch positiv mit den CTRP-Spiegeln im Serum korreliert. In adipösen Patienten ist Adiponektin im Plasma erniedrigt (Arita, Kihara et al. 1999) und auch im Fettgewebe von Zucker-Diabetic-

Fatty-Ratten (ZDF-Ratten) ist die Proteinexpression des Adiponektins erniedrigt. Dagegen steigt die Proteinexpression von CTRP 2 und 7 im linken Ventrikel (LV) dieser Tiere deutlich an (eigene Vorarbeiten, nicht gezeigt). Bei 8-wöchigen Leptin-defizienten *ob/ob* Mäusen zeigt sich ein reduzierter Adiponektinspiegel (Yamauchi, Hayashi et al. 2003), wohingegen bei diesen Tieren eine signifikant gesteigerte Konzentration von CTRP 3, 5, 9 und 13 im Serum (Wei, Peterson et al. 2011; Wong, Krawczyk et al. 2008; Wong, Krawczyk et al. 2009) sowie eine erhöhte RNA-Expression von CTRP 1, 2, 6, 7, 9, 10 und 13 im Fettgewebe nachgewiesen werden konnte. Zwölf Wochen alte *ob/ob* Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtypmäusen eine erniedrigte RNA-Expression von Adiponektin sowie erniedrigte Adiponektinspiegel im Serum, während die RNA-Konzentration von CTRP 6 (Wong, Krawczyk et al. 2008) im Fettgewebe und Serumspiegel von CTRP 3 (Peterson, Wei et al. 2010) deutlich erhöht war. Bei diesem fortgeschrittenen Übergewicht mit Insulinresistenz könnten in den *ob/ob* Mäusen Kompensationsmechanismen über CTRP 3 und 6 eine wichtige Rolle spielen. Adiponektin-Knockout-Mäuse mit normaler Diät entwickelten kein metabolisches Syndrom (Ma, Cabrero et al. 2002), allerdings konnten erhöhte Konzentrationen von CTRP 1 und 6 im Serum nachgewiesen werden (Wong, Krawczyk et al. 2008). Da die CTRP's ähnliche Funktionen wie das Adiponektin wie beispielsweise Phosphorylierung der AMPK und der ACC, Zunahme der Fettsäureoxidation sowie Steigerung der Glukoseaufnahme in verschiedenen Zelltypen ausüben und eine hohe Aminosäurehomologie zum Adiponektin besitzen, könnten sowohl die gesteigerte Expression als auch erhöhte Serumspiegel der CTRP's einen kompensatorischen Mechanismus in Zuständen verminderter Adiponektin-Verfügbarkeit wie beispielsweise Adipositas oder Diabetes mellitus auf lokaler Ebene darstellen.

5.2 Die *in vitro* Wirkung der CTRP's auf AMPK und ACC

5.2.1 Die Veränderung der Phosphorylierung der AMPK und der ACC nach Stimulation mit CTRP's

Hormonelle Aktivatoren der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) wie Leptin

(Minokoshi, Kim et al. 2002) und Adiponektin (Yamauchi, Kamon et al. 2002) aber auch das Diabetesmedikament Metformin (Fryer, Parbu-Patel et al. 2002) induzieren eine Aktivierung der AMPK unabhängig von Veränderungen des AMP/ATP-Verhältnisses. Die AMPK hemmt die Fettsäurebiosynthese durch Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und wirkt in verschiedenen Organen als ein Hauptstimulator der Betaoxidation (Saddik, Gamble et al. 1993).

Adiponektin (Li, Wu et al. 2007) sowie CTRP 1, 2, 5 und 6 (Peterson, Aja et al. 2011; Wong, Wang et al. 2004; Park, Choi et al. 2009) induzieren in verschiedenen Zelltypen die Phosphorylierung der AMPK am Thr172 und der ACC am Ser79. CTRP 13 induziert die Phosphorylierung der AMPK am Thr172 und steigert die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten, L6 Myotuben und Leberzellen (Wei, Peterson et al. 2011). In den zunächst von mir untersuchten menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Aktivierung der AMPK am Thr172 nach Stimulation mit CTRP 2, 3, 7, 9 nachgewiesen werden. Hierbei wurde die AMPK nach 5- und 10-minütiger Inkubation mit CTRP 1 und CTRP 7 aktiviert, während die CTRP 3- und 9-induzierte Phosphorylierung der AMPK nach 20 Minuten und 40 Minuten nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu dieser einfach zu handhabenden Standardzelllinie der Zellbiologie zeigten Rattenkardiomyoblasten eine AMPK-Aktivierung lediglich nach Stimulation mit CTRP 7 und CTRP 9.

Die Acetyl-CoA-Carboxylase, ein wichtiges Target der AMPK, wurde in HEK293-Zellen in dieser Arbeit nach Stimulation mit CTRP 2, 3, 7 und 9 am Ser79 phosphoryliert. In Hela-Zellen konnte zudem von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die ACC mit einer Mutation am Ser79 nicht von der AMPK phosphoryliert werden kann (Ha, Daniel et al. 1994). CTRP 1 phosphoryliert die AMPK und ACC im Skelettmuskel und steigert die Fettsäureoxidation im *Musculus soleus* (Wong, Krawczyk et al. 2008). CTRP 2, 5, 6, und 9 vermitteln in Muskelzellen die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege, die bisher nur teilweise bekannt sind. Die von CTRP 2, 5, 6, und 9 aktivierte AMPK führt zu einer Inaktivierung der ACC und damit einer Steigerung der Fettsäureoxidation sowie einer gesteigerten Glukoseaufnahme in

die Muskelzellen (Lee, Kim et al. 2010; Wei, Peterson et al. 2010; Wong, Wang et al. 2004; Wong, Krawczyk et al. 2008; Park, Choi et al. 2009; Wong, Krawczyk et al. 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTRP 2, 7 und 9 die Phosphorylierung der ACC zunächst nach 5 Minuten steigerten, wobei nach 80 Minuten eine zweite Induktion der Phosphorylierung der ACC detektiert wurde. CTRP 2, 3, 7 und 9 induzierten die Phosphorylierung der AMPK und der ACC in HEK293-Zellen, wohingegen CTRP 1, 6 und 10 die AMPK und ACC nicht beeinflussten. Nach der Analyse der CTRP-Effekte in HEK293-Zellen wurden CTRP 7 und CTRP 9, die die größte Ähnlichkeit zu Adiponektin aufweisen, in H9C2-Zellen hinsichtlich metabolischer Effekte untersucht. Im Gegensatz zu den HEK293-Zellen zeigte sich nach Induktion mit den anderen CTRP's keine Aktivierung von AMPK oder ACC in den H9C2-Zellen. Auch in der Induktionszeit der AMPK- und ACC-Aktivierung durch CTRP 7 und 9 unterschieden sich die HEK293-Zellen von den H9C2-Zellen. Mögliche Erklärungen hierfür wären Unterschiede in der Affinität der CTRP's zu AdipoR1. CTRP's weisen eine Aminosäurehomologie zwischen 27% und 73% auf. Verschiedene CTRP's können Hexamere und Heterooligomere bilden. Diese Strukturvarianten der CTRP's könnten die molekularen Mechanismen der Bindungen zwischen CTRP's und AdipoR1 beeinflussen und so zu verschiedenen Effekten auf nachgeschaltete Signalwege wie Phosphorylierung der AMPK oder der ACC führen. Während CTRP 7 und 9 in H9C2-Zellen die Aktivierung der AMPK erst nach 20 und 40 Minuten induzierten, konnte eine gesteigerte Phosphorylierung der ACC bereits nach 5 Minuten gezeigt werden. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl in HEK293-Zellen als auch in H9C2-Zellen gezeigt wird, dass die ACC am Ser79 eher als die AMPK am Thr172 phosphoryliert werden. Die Zeitpunkte der Phosphorylierung der AMPK am Thr172 und ACC am Ser79 deuten darauf hin, dass die Regulation der AMPK und der ACC partiell unabhängig voneinander verlaufen kann. CTRP 2 und 9 induzieren außerdem eine Phosphorylierung der p44/p42 MAPK in C2C12-Myotuben (Wong, Krawczyk et al. 2009), während die Phosphorylierung von Akt nach der Stimulation mit CTRP 3 und 9 gesteigert wird (Wong, Krawczyk et al. 2009). Die Aktivierung dieser Kinasen aber auch weiterer bisher nicht identifizierter Signalwege könnten AMPK-

unabhängig einen Einfluss auf die ACC nehmen.

5.2.2 Mögliche Regulationsmechanismen der AMPK und der ACC

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Effekt von CTRP 7 und 9 auf die ACC durch Ara A, einem AMPK-Inhibitor (Musi, Hayashi et al. 2001), im Gegensatz zur Aktivierung der AMPK nicht komplett aufgehoben wurde. Dies lässt vermuten, dass nach Stimulation mit CTRP's neben der AMPK eine zusätzliche Kinase Einfluss auf die ACC nimmt. Dies könnte auch die Tatsache erklären, dass andere Arbeitsgruppen (Wong, PNAS, 2004) in C2C12 Myotuben nach 5-minütiger CTRP 2-Stimulation trotz unveränderter Phosphorylierung der AMPK bereits eine Zunahme der Phosphorylierung der ACC nachweisen konnten. Es ist bekannt, dass nur das Thr172, welches sich im Activation Loop der AMPK befindet, in der phosphorylierten Form zur AMPK-Aktivierung führt (Hawley, Davison et al. 1996). Dagegen resultiert die Phosphorylierung der AMPK an zwei weiteren Positionen dem Thr258 und dem Ser485/491 nicht in einer AMPK-Aktivierung (Woods, Vertommen et al. 2003). Allerdings wurde die Interaktion zwischen diesen Phosphorylierungsstellen und dem Aktivitätszustand der ACC bisher noch nicht näher untersucht. Von einer Reihe von Kinasen ist bereits bekannt, dass sie die ACC ebenfalls phosphorylieren. So konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase A (PKA) die ACC im Muskel phosphoryliert (Winder, Wilson et al. 1997). Als Phosphorylierungsstellen der PKA an der ACC wurden bisher das Ser77 und das Ser1200 nachgewiesen (Ha, Daniel et al. 1994). Ob diese Aminosäurepositionen und die Aktivierung der PKA ebenfalls bei der Phosphorylierung der ACC unter CTRP-Stimulation eine Rolle spielen, wurde allerdings bislang noch nicht untersucht. Eine Aktivierung des Ser79, die in dieser Arbeit untersucht wurde, ist für die PKA bisher nicht beschrieben. Die ACC wird außerdem von der Casein-Kinase I und II (Witters and Bacon 1985) phosphoryliert, jedoch ist die exakte Phosphorylierungsstelle bisher nicht bekannt. Zudem wird die ACC durch die AMPK neben dem Ser79 auch am Ser221, Ser1200 sowie am Ser1215 phosphoryliert (Davies, Sim et al. 1990).

Von der Acetyl-CoA-Carboxylase sind zwei Isoformen bekannt: ACC1 und ACC2. ACC1 wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, ACC2 dagegen im Muskel (Tong 2005). ACC2-Knockout-Mäuse zeigen im Skelettmuskel eine permanent erhöhte Fettsäure-Oxidation (Abu-Elheiga, Matzuk et al. 2001). Unter AMPK-Aktivierung konnte bei der ACC1-Isoform eine Phosphorylierung des Ser79 detektiert werden, während die Phosphorylierung des Ser221 bei der ACC2-Isoform nachgewiesen werden konnte (Abu-Elheiga, Almarza-Ortega et al. 1997). Ser221 könnte bei der AMPK-induzierten Phosphorylierung der ACC für die Fettsäureoxidation im Muskel eine große Rolle spielen. In den hier dargestellten Versuchen wurde die Phosphorylierung der ACC am Ser79 durch die AMPK untersucht. H9C2-Zellen exprimieren sowohl ACC1 als auch ACC2. Eine eventuelle Phosphorylierung der ACC2 am Ser221 wird Bestandteil weiterführender zukünftiger Untersuchungen sein. In dieser Arbeit konnten außerdem zwei verschiedene Peaks sowohl für die Phosphorylierung der AMPK als auch der ACC in HEK293-Zellen detektiert werden. Dies lässt die Annahme zu, dass die AMPK nicht nur direkt, sondern auch über einen weiteren Signalweg durch CTRP 7 und CTRP 9 reguliert werden könnte. Vorstellbar ist, dass sich unter den Downstream Targets der AMPK selbst eine Kinase befindet, welche im Sinne eines verstärkenden Loops die AMPK phosphoryliert. Auch Signalwege, die Tumorsuppressor LKB1-vermittelt sind oder an denen AMPKKs (AMPK Kinasen) beteiligt sind, spielen in der Aktivierung der AMPK eine Rolle (Shaw, Kosmatka et al. 2004). LKB1-KO-Mäuse weisen eine reduzierte Aktivierung der AMPK α 2 und eine verringerte Phosphorylierung der ACC auf (Sakamoto, Zarrinpashneh et al. 2006). Weitere Studien sind erforderlich, um die potentiellen Effekte der CTRP's auf LKB1 und die AMPKKs zu beleuchten.

5.3 CTRP's und metabolische Effekte

5.3.1 Versuchsbedingungen

Für Untersuchungen des Glukosetransports auf zellulärer Ebene sind Muskelzellsysteme besser als HEK293-Zellen geeignet. In unserer Arbeitsgruppe werden unter anderem primären Kardiomyozyten der Ratte verwendet. Ein auf solchen

Zellen basierendes Modell ist jedoch aufwendig, da Kardiomyozyten keine Teilungsfähigkeit besitzen und so nur eingeschränkt zur Zellkultivierung geeignet sind. Weitere Nachteile der Kultivierung adulter Rattenkardiomyozyten sind deren progrediente Entdifferenzierung in der Kultur (ab ca. 72 Stunden) sowie die minimalen Transfektionsraten bei Verwendung kationischer Lipide. Um die Funktion der CTRP's auf den Glukosetransport zu analysieren, kamen deshalb in dieser Arbeit H9C2-Kardiomyoblasten zur Anwendung. Diese Zellen wurden aus embryonalen Rattenherzen gewonnen und können relativ einfach kultiviert werden. Sie zeichnen sich weiterhin durch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit aus und eignen sich besser für Transfektionen oder Langzeituntersuchungen.

In diversen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Adiponektin die Aktivierung der AMPK steigert, die Insulinsensitivität verbessert und sich insgesamt positiv auf die Glukosehomöostase des Organismus auswirkt. Adiponektin führt zu einer Verminderung sowohl der muskulären als auch der hepatischen Glukoneogenese und zu einer gesteigerten Lipidoxidation. Daneben führen CTRP 2, 5, 6 und 9 in Muskelzellen sowie CTRP 13 in 3T3-L1 Adipozyten, L6 Myotuben und Hepatozyten zu einer Aktivierung des AMPK-Signalweges und induzieren dadurch die Glukoseaufnahme (Lee, Kim et al. 2010; Wei, Peterson et al. 2011; Wong, Wang et al. 2004; Wong, Krawczyk et al. 2008; Park, Choi et al. 2009; Wong, Krawczyk et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden der für die induzierbare Glukoseaufnahme verantwortliche Glukosetransporter 4 (GLUT4) und der für die basale Glukoseaufnahme verantwortliche Glukosetransporter 1 (GLUT1) untersucht. GLUT1, der für die Grundversorgung der Zelle zuständig ist, hat einen Anteil von 30% aller Glukosetransporter in der Plasmamembran. In Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen findet sich eine geringe Erhöhung der GLUT1-Expression (Shefi-Friedman, Wertheimer et al. 2001). Das lässt vermuten, dass diese Mäuse bei permanent erhöhten Plasmaglukosespiegeln mehr Glukose insulinunabhängig via GLUT1 in die Zellen aufnehmen. Um den basalen Glukoseverbrauch zu regulieren und eine hinreichende Versorgung zu gewährleisten, wird daher die GLUT1-Expression in Insulinrezeptor-Knockout-Mäusen vermehrt induziert.

GLUT4 findet sich vor allem im Muskel- und Fettgewebe. In H9C2-Zellen wurde eine geringe GLUT4-Expression detektiert, was mit dem Differenzierungszustand der H9C2-Zellen zusammenhängen könnte (Armoni, Harel et al. 2005). In den Versuchen dieser Arbeit wurden H9C2-Zellen im undifferenzierten Blastenstadium verwendet. Von differenzierten H9C2-Zellen (Myotyben) ist jedoch bekannt, dass sie eine deutliche GLUT4-Expression zeigen (Yu, Poirier et al. 1999). Deshalb wurden die H9C2-Myoblasten mit pQBI-HA-GLUT4-Plasmiden transfiziert. Dies bietet den Vorteil, dass mittels eines Anti-HA-Antikörpers lediglich die Transporter detektiert werden, die sich an der Oberfläche der Zelle (Zellmembran) befinden.

5.3.2 Wirkung von CTRP's auf die Translokation der Glukosetransporter und die Glukoseaufnahme

In den hier beschriebenen Versuchen wurde für GLUT1 nach Stimulation mit CTRP 7 und 9 bereits nach kurzer Zeit eine Translokation in die Plasmamembran der Zellen deutlich nachgewiesen. Die gleichen CTRP's bewirkten eine Translokation von GLUT4 (pQBI-HA-GLUT4) nach 10 Minuten (CTRP 7) sowie nach 5, 20, 40 und 80 Minuten (CTRP 9). Die genauen Mechanismen dieser AMPK-vermittelten Steigerung der Glukoseaufnahme sind nicht bekannt, allerdings scheint das AKT Substrate 160 (AS 160) eine wichtige Rolle einzunehmen (Eguez, Lee et al. 2005). AS 160 wird nach Behandlung mit AICAR (Bruss, Arias et al. 2005) in Adipozyten und im Muskelgewebe phosphoryliert. Im phosphorylierten Zustand verliert AS 160 seine hemmende Wirkung auf die Fusion der GLUT4-Vesikel mit der Plasmamembran (Sano, Kane et al. 2003; Zeigerer, McBrayer et al. 2004), wodurch es zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zelle kommt. In den Untersuchungen dieser Arbeit führten CTRP 7 und 9 nach 20 Minuten zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AS 160 in den H9C2-Zellen. Obwohl immunzytochemisch kein Nachweis der Translokation des nativen, nicht überexprimierten GLUT4 gelang, spricht die erhöhte AS160-Phosphorylierung für einen signifikanten Einfluss von CTRP 7 und CTRP 9 auf die GLUT4-Translokation. Die Aktivierung der AMPK durch CTRP 7 und CTRP 9 wurde jedoch zeitlich erst nach

der frühesten Translokation von GLUT1 und GLUT4 gezeigt. Die AMPK scheint daher für die frühe Translokation der Glukosetransporter nicht verantwortlich zu sein. Dagegen könnten insulinabhängige Signalwege für die akut induzierte GLUT1- und GLUT4-Translokation durch CTRP 7 und 9 eine Rolle spielen. Diese Signalwege regulieren die Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats-1 (IRS-1) (Sun, Rothenberg et al. 1991), die Aktivierung der PI3-K (Myers, Backer et al. 1992) sowie die Glukoseaufnahme. Die PI3-Kinase induziert Phosphatidylinositol-3, 4,5-Phosphat (PIP3), das durch Bindung an Phosphoinositid-dependent-Kinase 1 (PDK1) die Proteinkinase B (PKB oder auch Akt genannt) aktiviert (Alessi, James et al. 1997). Dies führt zum Transfer von Glukosetransportern wie GLUT4 aus dem Zellinneren in die Plasmamembran und stimuliert so die Glukoseaufnahme (Bae, Cho et al. 2003). Der sogenannte insulinabhängige Signalweg wird nicht nur von Insulin gesteuert. Die Aktivierung der PI3-Kinase spielt in der Weiterleitung der insulinabhängigen Signalwege eine essentielle Rolle. Adiponektin kann auch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-Weg aktivieren (Barb, Neuwirth et al. 2007). Metformin, welches als Medikament in der Diabetesbehandlung eingesetzt wird, verursacht nicht nur durch Aktivierung der AMPK (Lee, Lee et al. 2011), sondern auch über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-Weg (Rice, Pellatt et al. 2011) eine GLUT4-Translokation in die Plasmamembran von Muskelzellen. Durch die CTRP's könnte dieser Signalweg also ebenfalls beeinflusst werden.

Nach Ara A Hemmung wurde die GLUT1-Translokation nach CTRP 9-Stimulation vollständig inhibiert, während sie nach CTRP 7-Stimulation nur teilweise gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Ara A-Behandlung eine moderate Reduktion der durch CTRP 9 gesteigerten GLUT4-Translokation, jedoch wurde die GLUT4-Translokation nach CTRP 7-Stimulation durch Ara A verhindert. Das spricht dafür, dass die AMPK bei der CTRP 9-induzierten GLUT1-Translokation und CTRP 7-induzierten GLUT4-Translokation eine große Rolle spielt. Adenovirus-vermittelte Überexpression von CTRP 9 verringert in *ob/ob* Mäusen die Serumglukosespiegel (Wong, Krawczyk et al. 2009). Vergleichbar dazu zeigten weitere Untersuchungen, dass die Glukoseaufnahme nach Stimulation mit CTRP 7 und 9 deutlich in H9C2-Zellen

gesteigert wurde. Diese gesteigerte Glukoseaufnahme durch CTRP 7 und 9 wurde in untransfizierten Zellen durch Ara A gehemmt, in GLUT4-überexprimierenden Zellen dagegen nur teilweise blockiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der erhöhte Transport von Glukose in die Zelle nach Behandlung mit CTRP's ebenso wie die Translokation der Glukosetransporter nicht ausschließlich über die AMPK vermittelt wird. Insulinabhängige Signalwege könnten auch in der CTRP 7 und 9 induzierten GLUT-Translokation und Glukoseaufnahme eine Rolle spielen. Die möglichen Interaktionen zwischen diesen insulinabhängigen und den AMPK-abhängigen Signalwegen bei der CTRP-induzierten GLUT1- und GLUT4-Translokation sind Gegenstand der weiterführenden Untersuchungen.

5.4 CTRP's und Adiponektinrezeptoren *in vitro*

Für Adiponektin sind bisher zwei Adiponektinrezeptoren (AdipoR1, AdipoR2) sowie ein Korezeptor (T-Cadherin) beschrieben. AdipoR1 findet sich ubiquitär, jedoch besonders häufig im Muskel und wirkt hauptsächlich als Rezeptor für globuläres Adiponektin. Die HMW-Komplexe des Adiponektins dagegen binden an AdipoR2, welcher hauptsächlich in der Leber exprimiert wird (Yamauchi, Kamon et al. 2003). T-Cadherin befindet sich vor allem in Endothelzellen und in glatter Muskulatur (Hug, Wang et al. 2004). Adiponektin bindet an die C-terminale, extrazelluläre Domäne der Adiponektinrezeptoren. Die N-terminale, intrazelluläre Domäne bindet an APPL1 wodurch intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden (Mao, Kikani et al. 2006).

In Leptinrezeptor-defizienten *db/db* Mäusen aktiviert die Überexpression von AdipoR1 den AMPK-Signalweg und vermindert dadurch die hepatische Glukoseproduktion. Die Überexpression von AdipoR2 in diesem Modell führt zu einer gesteigerten Expression der Glukokinase und zu einer erhöhten Fettsäureoxidation (Yamauchi, Nio et al. 2007). Die AdipoR1 Knockout Maus weist eine reduzierte Glukosetoleranz auf, welche im höheren Lebensalter zu Insulinresistenz führt. Auch die AdipoR2 Knockout Maus und die AdipoR1/AdipoR2 Doppelknockout Maus zeigen eine deutliche Glukoseintoleranz und einen erhöhten Insulinspiegel (Capeau 2007; Yamauchi, Nio et al. 2007). Beide

Rezeptoren scheinen somit einen wichtigen Beitrag beim Erhalt der Glukosehomöostase zu spielen. Aufgrund der Strukturhomologie sowie der Aktivierung vergleichbarer Signalkaskaden durch Adiponektin und durch diverse CTRP's scheint eine Bindung der CTRP's an die Adiponektinrezeptoren vorstellbar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von AdipoR1 in H9C2 zu einer verringerten basalen AMPK- und ACC-Phosphorylierung führt. Diese Ergebnisse deuten auf einen essentiellen Effekt von AdipoR1 auf die basale Aktivierung von AMPK und ACC hin. Ebenso wird die CTRP 7 und CTRP 9-induzierte Phosphorylierung der AMPK und ACC durch den Knockdown von AdipoR1 fast vollständig unterdrückt. Dies könnte dafür sprechen, dass dieser Effekt über AdipoR1 vermittelt wird. Der Knockdown von AdipoR2 beeinflusste hingegen in H9C2-Myoblasten weder die basale noch die CTRP-vermittelte Aktivierung von AMPK oder ACC. Im Gegensatz dazu wurde veröffentlicht, dass die Stimulation mit CTRP 5 in Myozyten aus der Skelettmuskulatur (Ratte) nach AdipoR1-Knockdown keine Änderungen im Bezug auf AMPK- und ACC-Phosphorylierung zeigt (Park, Choi et al. 2009). Somit scheint dieser CTRP 5-Effekt nicht über AdipoR1 vermittelt zu sein. In zukünftigen Untersuchungen sollen die Auswirkungen weiterer CTRP's in Myozyten von AdipoR1 Knockout Mäusen analysiert werden, um weitere Rückschlüsse auf die *in vivo* Relevanz der Beziehung zwischen AdipoR1 und den CTRP's ziehen zu können.

6. Schlussfolgerungen

Die CTRP's werden ubiquitär exprimiert, während Adiponektin vor allem im Fettgewebe detektierbar ist. CTRP 7 und 9 führen in Kardiomyoblasten zu ähnlichen Effekten wie das Adiponektin. So zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass CTRP 7 und 9 in H9C2-Kardiomyoblasten sowohl eine Phosphorylierung der AMPK als auch der ACC bewirken. Dass die ACC teilweise vor Aktivierung der AMPK phosphoryliert wurde, deutet auf eine partiell unabhängig voneinander verlaufende Regulation der beiden Enzyme hin. Dabei ist eine zusätzliche CTRP-induzierte Kinase, welche sich auf die ACC auswirkt, denkbar. Die CTRP 7 und 9 induzierte Phosphorylierung der AMPK und ACC wird über AdipoR1 vermittelt. Beide CTRP's fördern die Glukoseaufnahme unter anderem durch verstärkte Translokation der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 vom Zytosol in die äußere Zellmembran. Neben AMPK-vermittelten Signalwegen könnten auch insulinabhängige Signalwege an der akut induzierten GLUT1- und GLUT4-Translokation durch CTRP 7 und 9 beteiligt sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass CTRP's möglicherweise in Zuständen verminderter Adiponektinverfügbarkeit auf lokaler Ebene in der Lage sind, den Adiponektinmangel zu kompensieren. Sie könnten somit als potentieller Angriffspunkt zukünftiger Therapien metabolischer Erkrankungen wie Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus eine wichtige Rolle spielen.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der Adiponektinparaloge, der C1q/TNF-related Proteine (CTRP's), auf intrazelluläre AMPK-Signaltransduktionswege, die Translokation der Glukosetransporter und die Glukoseaufnahme untersucht. Hierbei konnte in verschiedenen Rattenorganen nachgewiesen werden, dass die CTRP's ubiquitär in unterschiedlicher Ausprägung exprimiert werden, während Adiponektin vor allem im Fettgewebe detektierbar ist. In HEK293-Zellen induzierten CTRP 2, 3, 7 und 9 die Phosphorylierung der AMPK am Thr172 und der ACC am Ser79, wobei die ACC-Phosphorylierung der AMPK-Aktivierung vorausging. CTRP 7 und 9 induzierten die Phosphorylierung der AMPK und ACC in H9C2-Zellen. Hier zeigte sich ebenfalls bereits eine frühe Phosphorylierung der ACC. Durch die Gabe des AMPK-Inhibitors Ara A konnte die CTRP 7- und die CTRP 9-induzierte AMPK-Aktivierung vollständig, die Phosphorylierung der ACC dagegen nur teilweise verhindert werden. Um herauszufinden, ob die CTRP-Effekte über Adiponektinrezeptoren vermittelt sind, wurde in H9C2-Zellen die Expression der Adiponektinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 mit Hilfe von siRNA-Oligonukleotiden unterdrückt. Nur in AdipoR1-herabregulierten H9C2-Zellen zeigte sich keine CTRP 7- oder CTRP 9-induzierte Phosphorylierungen der AMPK und der ACC. Die Translokation der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 vom Zytosol in die Membran war nach Stimulation mit CTRP 7 und 9 in H9C2-Zellen bereits nach wenigen Minuten deutlich nachweisbar. Nach Vorbehandlung mit Ara A konnte die durch CTRP 9-induzierte GLUT1-Translokation vollständig, die CTRP 7-vermittelte GLUT1-Translokation dagegen nur teilweise gehemmt werden. Im Gegensatz dazu ergab sich nach Ara A Behandlung lediglich eine Reduktion der durch CTRP 7 gesteigerten GLUT4-Translokation. In H9C2-Zellen konnte eine Steigerung der Glukoseaufnahme nach Stimulation mit CTRP 7 und 9 nachgewiesen werden. Die Aufnahme von Glukose wurde durch Ara A in untransfizierten Zellen gehemmt, während es in GLUT4-überexprimierenden Zellen nur zu einer teilweisen Blockade der Glukoseaufnahme durch den AMPK-Hemmstoff kam.

7. Summary

In the present study, the effects of the adiponectin paralogs C1q/TNF-related proteins (CTRPs) on the intracellular AMPK signaling pathway, glucose transport and glucose uptake was examined. It was demonstrated in different rat organs, that CTRPs are ubiquitously expressed in a variety of rat tissues, whereas adiponectin can most notably be detected in adipose tissue. In HEK293 cells CTRP 2, 3, 7, 9 induced the phosphorylation of AMPK at Thr172 and ACC at Ser79, but the phosphorylation of ACC preceded the activation of AMPK. CTRP 7 and CTRP 9 induced the phosphorylation of AMPK and ACC in H9C2 cells. Furthermore, an early phosphorylation of ACC was shown in these cells after treatment with CTRP 9. Treatment with the AMPK inhibitor Ara A prevented the CTRP 7 and 9-induced AMPK activation completely, while phosphorylation of ACC was only partially blocked. To investigate whether the effects of CTRPs are mediated by the adiponectin receptors, the expression of adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in H9C2 cells was suppressed using siRNA oligonucleotides. Only in AdipoR1-knockdown H9C2 cells, CTRP 7- and 9-induced phosphorylation of AMPK and ACC could not be detected. The translocation of GLUT1 and GLUT4 from the cytosol to the cell membrane was detectable shortly after stimulation with CTRP 7 and 9. After pretreatment with Ara A, CTRP 9-induced GLUT1 translocation was completely inhibited, while CTRP 7-induced GLUT1-translocation was only partially inhibited. In contrast, Ara A treatment only resulted in the reduction of CTRP 7-induced GLUT4 translocation. In H9C2 cells, an increase of glucose uptake was detected after the stimulation with CTRP 7 and 9. The glucose uptake was inhibited by Ara A in untransfected cells, while it was only partially blocked in cells overexpressing GLUT4.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| ACC | Acetyl-Coenzym A-Carboxylase |
| AdipoR | Adiponektinrezeptor 1 |
| AICAR | 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1- β -D-Ribofuranosid |
| AMPK | AMP-aktivierte Proteinkinase |
| Ara A | Adenine 9-P-D-arabinofuranoside |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| APPL | Adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucine zipper motif |
| AS160 | AKT substrate 160 |
| BMI | Body Mass Index |
| CTRP | C1/Tumour necrosis factor related Protein |
| CPT-1 | Carnitin:Palmitoyl-CoA Transferase-1 |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Enhanced Chemoluminescence |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eEF2 | Elongation Factor-2 |
| eNOs | endotheliale NO synthase |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GLUT | Glukosetransporter |
| His | Histidin |
| HMW | High Molecular Weight |
| HMG-CoA | 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reductase |

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|
| HRP | Horseradish-Peroxidase |
| IPTG | Isopropylthio- β -galactoside |
| LB | Luria-Broth, Luria-Bertani-Medium |
| LMW | Low Molecular Weight |
| LV | linker Ventrikel |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MES | 2-(N-morpholino)-Ethanesulphonsäure |
| MMW | Middle Molecular Weight |
| mRNA | messenger RNA |
| mTOR | mammalian Target of Rapamycin |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| Ni | Nickel |
| OMG | 3-O-Methyl-D-Glucose |
| pACC | phosphorylierte Form der ACC |
| pAMPK | phosphorylierte Form der AMPK |
| PBS | Phosphate buffered Saline, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung |
| PGC-1 α | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha |
| PI3-K | Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase |
| PPAR α | Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SEM | Standard Error of the Mean (Standardfehler) |
| Tab. | Tabelle |
| TBS-T | Tris-Buffered Saline Tween |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |

9. Literatur

- Abbott, J. D., Y. Huang, et al. (2004). "Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury." Circulation **110**(21): 3300-5.
- Abu-Elheiga, L., D. B. Almarza-Ortega, et al. (1997). "Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms." J Biol Chem **272**(16): 10669-77.
- Abu-Elheiga, L., M. M. Matzuk, et al. (2001). "Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2." Science **291**(5513): 2613-6.
- Akiyama, H., S. Furukawa, et al. (2009). "Elevated expression of CTRP3/cartducin contributes to promotion of osteosarcoma cell proliferation." Oncol Rep **21**(6): 1477-81.
- Alessi, D. R., S. R. James, et al. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." Curr Biol **7**(4): 261-9.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." Biochem Biophys Res Commun **257**(1): 79-83.
- Armoni, M., C. Harel, et al. (2005). "Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements." J Biol Chem **280**(41): 34786-95.
- Bae, S. S., H. Cho, et al. (2003). "Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B." J Biol Chem **278**(49): 49530-6.
- Barb, D., A. Neuwirth, et al. (2007). "Adiponectin signals in prostate cancer cells through Akt to activate the mammalian target of rapamycin pathway." Endocr Relat Cancer **14**(4): 995-1005.
- Bell, G. I., T. Kayano, et al. (1990). "Molecular biology of mammalian glucose transporters." Diabetes Care **13**(3): 198-208.
- Berg, A. H., T. P. Combs, et al. (2001). "The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action." Nat Med **7**(8): 947-53.
- Bergman, R. N., S. P. Kim, et al. (2007). "Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk." Am J Med **120**(2 Suppl 1): S3-8; discussion S29-32.
- Bruffaerts, R., K. Demyttenaere, et al. (2008). "The relation between body mass index, mental health, and functional disability: a European population perspective." Can J Psychiatry **53**(10): 679-88.
- Bruss, M. D., E. B. Arias, et al. (2005). "Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity." Diabetes **54**(1): 41-50.
- Capeau, J. (2007). "The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow." J Hepatol **47**(5): 736-8.
- Chen, Z. P., K. I. Mitchelhill, et al. (1999). "AMP-activated protein kinase

- phosphorylation of endothelial NO synthase." FEBS Lett **443**(3): 285-9.
- Cheng, S. W., L. G. Fryer, et al. (2004). "Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status." J Biol Chem **279**(16): 15719-22.
- Clarke, P. R. and D. G. Hardie (1990). "Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver." Embo J **9**(8): 2439-46.
- Coven, D. L., X. Hu, et al. (2003). "Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(3): E629-36.
- Davies, S. P., A. T. Sim, et al. (1990). "Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase." Eur J Biochem **187**(1): 183-90.
- Davis, K. E. and P. E. Scherer (2008). "Adiponectin: no longer the lone soul in the fight against insulin resistance?" Biochem J **416**(2): e7-9.
- Denzel, M. S., M. C. Scimia, et al. (2010). "T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice." J Clin Invest **120**(12): 4342-52.
- Eguez, L., A. Lee, et al. (2005). "Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein." Cell Metab **2**(4): 263-72.
- Fisher, R. M., J. Hoffstedt, et al. (2002). "Effects of obesity and weight loss on the expression of proteins involved in fatty acid metabolism in human adipose tissue." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(10): 1379-85.
- Freemantle, N., J. Holmes, et al. (2008). "How strong is the association between abdominal obesity and the incidence of type 2 diabetes?" Int J Clin Pract **62**(9): 1391-6.
- Fruhbeck, G. (2008). "Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders." Methods Mol Biol **456**: 1-22.
- Fryer, L. G., A. Parbu-Patel, et al. (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways." J Biol Chem **277**(28): 25226-32.
- Gustafson, B. (2010). "Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis." J Atheroscler Thromb **17**(4): 332-41.
- Ha, J., S. Daniel, et al. (1994). "Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity." J Biol Chem **269**(35): 22162-8.
- Hajer, G. R., T. W. van Haften, et al. (2008). "Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases." Eur Heart J **29**(24): 2959-71.
- Hartley, J. L., G. F. Temple, et al. (2000). "DNA cloning using in vitro site-specific recombination." Genome Res **10**(11): 1788-95.
- Hawley, S. A., M. Davison, et al. (1996). "Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(44): 27879-87.
- Holman, G. D. and M. Kasuga (1997). "From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport." Diabetologia **40**(9): 991-1003.

- Horman, S., G. Browne, et al. (2002). "Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis." Curr Biol **12**(16): 1419-23.
- Hu, E., P. Liang, et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." J Biol Chem **271**(18): 10697-703.
- Huang, P. L. (2009). "A comprehensive definition for metabolic syndrome." Dis Model Mech **2**(5-6): 231-7.
- Hug, C., J. Wang, et al. (2004). "T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10308-13.
- Jager, S., C. Handschin, et al. (2007). "AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12017-22.
- Karlsson, H. K., J. R. Zierath, et al. (2005). "Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects." Diabetes **54**(6): 1692-7.
- Kim, M. J., W. Lee, et al. (2010). "C1qTNF-related protein-6 increases the expression of interleukin-10 in macrophages." Mol Cells **30**(1): 59-64.
- Kishore, U. and K. B. Reid (1999). "Modular organization of proteins containing C1q-like globular domain." Immunopharmacology **42**(1-3): 15-21.
- Klein, S., L. Fontana, et al. (2004). "Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease." N Engl J Med **350**(25): 2549-57.
- Kojouharova, M., K. Reid, et al. (2010). "New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation." Mol Immunol **47**(13): 2154-60.
- Kudo, N., A. J. Barr, et al. (1995). "High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase." J Biol Chem **270**(29): 17513-20.
- Kurth-Kraczek, E. J., M. F. Hirshman, et al. (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle." Diabetes **48**(8): 1667-71.
- Landy, A. (1989). "Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination." Annu Rev Biochem **58**: 913-49.
- Larance, M., G. Ramm, et al. (2005). "Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking." J Biol Chem **280**(45): 37803-13.
- Laughlin, G. A., E. Barrett-Connor, et al. (2006). "Sex-specific association of the androgen to oestrogen ratio with adipocytokine levels in older adults: the Rancho Bernardo Study." Clin Endocrinol (Oxf) **65**(4): 506-13.
- Laughlin, G. A., E. Barrett-Connor, et al. (2007). "Sex-specific determinants of serum adiponectin in older adults: the role of endogenous sex hormones." Int J Obes (Lond) **31**(3): 457-65.
- Lee, W., M. J. Kim, et al. (2010). "C1qTNF-related protein-6 mediates fatty acid

- oxidation via the activation of the AMP-activated protein kinase." FEBS Lett **584**(5): 968-72.
- Lee, J. O., S. K. Lee, et al. (2011) "Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells." J Cell Physiol **226**(4): 974-81.
- Li, L., L. Wu, et al. (2007). "Adiponectin modulates carnitine palmitoyltransferase-1 through AMPK signaling cascade in rat cardiomyocytes." Regul Pept **139**(1-3): 72-9.
- Ma, K., A. Cabrero, et al. (2002). "Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin." J Biol Chem **277**(38): 34658-61.
- Manolescu, A. R., K. Witkowska, et al. (2007). "Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function." Physiology (Bethesda) **22**: 234-40.
- Mao, X., C. K. Kikani, et al. (2006). "APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function." Nat Cell Biol **8**(5): 516-23.
- Marsin, A. S., L. Bertrand, et al. (2000). "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." Curr Biol **10**(20): 1247-55.
- Meigs, J. B. (2004). "Metabolic syndrome: in search of a clinical role." Diabetes Care **27**(11): 2761-3.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, et al. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature **415**(6869): 339-43.
- Mueckler, M., C. Caruso, et al. (1985). "Sequence and structure of a human glucose transporter." Science **229**(4717): 941-5.
- Musi, N., T. Hayashi, et al. (2001). "AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(5): E677-84.
- Myers, M. G., Jr., J. M. Backer, et al. (1992). "IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10350-4.
- Page, S. T., K. L. Herbst, et al. (2005). "Testosterone administration suppresses adiponectin levels in men." J Androl **26**(1): 85-92.
- Park, S. Y., J. H. Choi, et al. (2009). "C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **284**(41): 27780-9.
- Pessin, J. E. and A. R. Saltiel (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." J Clin Invest **106**(2): 165-9.
- Peterson, J. M., S. Aja, et al. (2011). "C1q/TNF-related protein-1 (CTRP1) enhances fatty acid oxidation via AMPK activation and ACC inhibition." J Biol Chem.
- Peterson, J. M., Z. Wei, et al (2010). "C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output." J Biol Chem **285**(51): 39691-701.
- Phillips, L. K. and J. B. Prins (2008). "The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome." Curr Hypertens Rep **10**(2): 156-64.
- Rice, S., L. J. Pellatt, et al. (2011). "Action of metformin on the insulin-signaling

- pathway and on glucose transport in human granulosa cells." J Clin Endocrinol Metab **96**(3): E427-35.
- Russell, R. R., 3rd, R. Bergeron, et al. (1999). "Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR." Am J Physiol **277**(2 Pt 2): H643-9.
- Saddik, M., J. Gamble, et al. (1993). "Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart." J Biol Chem **268**(34): 25836-45.
- Sakamoto, K., E. Zarrinpashneh, et al. (2006). "Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPKalpha2 but not AMPKalpha1." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(5): E780-8.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sano, H., S. Kane, et al. (2003). "Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation." J Biol Chem **278**(17): 14599-602.
- Scherer, P. E., S. Williams, et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." J Biol Chem **270**(45): 26746-9.
- Shapiro, L. and P. E. Scherer (1998). "The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor." Curr Biol **8**(6): 335-8.
- Shaw, R. J., M. Kosmatka, et al. (2004). "The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3329-35.
- Shefi-Friedman, L., E. Wertheimer, et al. (2001). "Increased IGFR activity and glucose transport in cultured skeletal muscle from insulin receptor null mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(1): E16-24.
- Sun, X. J., P. Rothenberg, et al. (1991). "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." Nature **352**(6330): 73-7.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-83.
- Tomas, E., T. S. Tsao, et al. (2002). "Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16309-13.
- Tong, L. (2005). "Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery." Cell Mol Life Sci **62**(16): 1784-803.
- Treebak, J. T., S. Glund, et al. (2006). "AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits." Diabetes **55**(7): 2051-8.
- Trujillo, M. E. and P. E. Scherer (2005). "Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome." J Intern Med **257**(2): 167-75.
- Tschritter, O., A. Fritsche, et al. (2003). "Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism." Diabetes **52**(2): 239-43.

- Vavvas, D., A. Apazidis, et al. (1997). "Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle." J Biol Chem **272**(20): 13255-61.
- Waki, H., T. Yamauchi, et al. (2003). "Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin." J Biol Chem **278**(41): 40352-63.
- Wang, C., X. Xin, et al. (2009). "Yin-Yang regulation of adiponectin signaling by APPL isoforms in muscle cells." J Biol Chem **284**(46): 31608-15.
- Wei, Z., J. M. Peterson, et al. (2011). "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 **286**(18): 15652-65.
- Weigert, J., M. Neumeier, et al. (2005). "The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells." FEBS Lett **579**(25): 5565-70.
- Whitehead, J. P., A. A. Richards, et al. (2006). "Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome." Diabetes Obes Metab **8**(3): 264-80.
- Winder, W. W., H. A. Wilson, et al. (1997). "Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A." J Appl Physiol **82**(1): 219-25.
- Witters, L. A. and G. W. Bacon (1985). "Protein phosphatases active on acetyl-CoA carboxylase phosphorylated by casein kinase I, casein kinase II and the cAMP-dependent protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **130**(3): 1132-8.
- Wong, G. W., S. A. Krawczyk, et al. (2009). "Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin." Faseb J **23**(1): 241-58.
- Wong, G. W., S. A. Krawczyk, et al. (2008). "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." Biochem J **416**(2): 161-77.
- Wong, G. W., J. Wang, et al. (2004). "A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10302-7.
- Woods, A., D. Vertommen, et al. (2003). "Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **278**(31): 28434-42.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." Nature **423**(6941): 762-9.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med **8**(11): 1288-95.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis." J Biol Chem **278**(4):

- 2461-8.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity." Nat Med **7**(8): 941-6.
- Yamauchi, T., Y. Nio, et al. (2007). "Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions." Nat Med **13**(3): 332-9.
- Yamauchi, Y., M. Hayashi, et al. (2003). "Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly." J Biol Chem **278**(48): 47890-7.
- Yang, J. and G. D. Holman (2006). "Long-term metformin treatment stimulates cardiomyocyte glucose transport through an AMP-activated protein kinase-dependent reduction in GLUT4 endocytosis." Endocrinology **147**(6): 2728-36.
- Yu, B., L. A. Poirier, et al. (1999). "Mobilization of GLUT-4 from intracellular vesicles by insulin and K(+) depolarization in cultured H9c2 myotubes." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): E259-67.
- Zeigerer, A., M. K. McBrayer, et al. (2004). "Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160." Mol Biol Cell **15**(10): 4406-15.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.
- Zheng, D., P. S. MacLean, et al. (2001). "Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase." J Appl Physiol **91**(3): 1073-83.
- Zhou, L., S. S. Deeba, et al. (2009). "Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca²⁺/Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways." J Biol Chem **284**(33): 22426-35.

10. Publikationen und Kongressbeiträge

10.1 Publikationen in Zeitschriften mit Peer Review Verfahren

1. **Li L**, Pan R, Li R, Niemann B, Aurich AC, Chen Y, Rohrbach S. Mitochondrial biogenesis and PGC-1 α deacetylation by physical activity: intact adipocytokine-signaling is required. *Diabetes*. 2010 Oct 7; 60(1): 157-67.
2. **Li L**, Niemann B, Pan R, Li R, Denise Hilfiker-Kleiner, Chen Y, Rohrbach S. Mitochondrial biogenesis and PGC-1 α deacetylation by physical activity: Differential response in cardiac and skeletal muscle. *Basic Res Cardiol*; 2011 Aug 28; 106(6): 1221-34.
3. Rohrbach S, Aurich AC, **Li L**, Niemann B. Age-associated loss in adiponectin-activation by caloric restriction: Lack of compensation by enhanced inducibility of adiponectin paralogs CTRP2 and CTRP7. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Oct 15; 277(1-2): 26-34.
4. Niemann B, Chen Y, Teschner M, **Li L**, Silber RE, Rohrbach S. Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Sep 10, 577-585.
5. Aslam M, Gündüz D, Schuler D, **Li L**, Sharifpanah F, Sedding D, Piper HM, Noll T. Intermedin induces loss of coronary microvascular endothelial barrier via derangement of actin cytoskeleton: role of RhoA and Rac1. *Cardiovasc Res*. 2011 Aug 4, 276-286.

10.2 Kongressbeiträge

Vorträge

1. **Ling Li**, Anne-Cathleen Aurich, Bernd Niemann, Susanne Rohrbach: Laufbandtraining steigert mitochondriale Biogenese und Atmung im Myokard von Mäusen unabhängig von der Modifikation der Insulinresistenz. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 12.04.-14.04.2007
2. **Ling Li**, Rong Li, Anne-Cathleen Aurich, Ying Chen, Ruping Pan, Susanne Rohrbach: Physical activity improves mitochondrial function by altering PGC-1 α acetylation. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Köln, 02.03-05.03.2008
3. **Ling Li**, Ruping Pan, Bernd Niemann, Anne-Cathleen Aurich, Susanne

Rohrbach: Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by physical activity: Intact leptin signalling is required. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 08.04-10.04.2010

Poster

1. **Ling Li**, Anne-Cathleen Aurich, Bernd Niemann, Susanne Rohrbach: Physical activity improves mitochondrial biogenesis and respiration independent of insulin resistance of obese mice. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Köln, 25.03-28.03.2007
2. **Ling Li**, Benedikt Siegler, Ruping Pan, Susanne Rohrbach: Metabolic effects of the adiponectin paralogs 1-10. Workshop on Cardiac Physiology and Experimental Cardiology, Giessen, 16.09-18.09.2010
3. Ruping Pan, **Ling Li**, Bernd Niemann, Susanne Rohrbach: The role of AMPK in mitochondrial function and mitochondrial biogenesis. Workshop on Cardiac Physiology and Experimental Cardiology, Giessen, 16.09-18.09.2010
4. **Ling Li**, Benedikt Siegler, Ruping Pan, Bernd Niemann, Susanne Rohrbach: Metabolic effects of the adiponectin paralogs 1-10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 27.07-30.04.2011
5. **Ling Li**, Benedikt Siegler, Muhammad Aslam, Ruping Pan, Bernd Niemann, Susanne Rohrbach: Effects of the adiponectin paralogs 7 and 9 on glucose metabolism. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden, 22.03-25.03.2012

11. Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe 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

12. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Personen danken, die mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit und auf dem Weg bis hierher begleitet und unterstützt haben.

Ein aufrichtiges und großes Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. S. Rohrbach, die es mir ermöglicht hat, diese interessante Doktorarbeit am Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen anzufertigen. Sie stand mir jeder Zeit mit Rat und Tat als Betreuerin in Halle/Saale und Giessen zur Seite und war stets bemüht, mich hilfreich während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit zu unterstützen. Ohne die gute Betreuung und ihr umfangreiches theoretisches sowie praktisches Wissen hätte ich niemals in dieser Zeit so viel gelernt.

Allen Kollegen des Physiologischen Instituts möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und Unterstützung während der gesamten Zeit danken. Besonderen Dank an Dr. Bernd Niemann, der mich bei meiner Arbeit immer unterstützt hat. Vielen Dank an Dr. Ying Chen für die Hinweise zur Affinitätschromatographie. Bei Dr. Muhammad Aslam möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und Geduld bei den Untersuchungen der Glukosetransporter bedanken. Danke auch an Dr. Rolf Schreckenberger, Dr. Manuela Grötzner und Dr. Manuel Rebelo für das Korrekturlesen von Teilen der Arbeit. Vielen Dank an unsere beiden Doktoranden, Ruping Pan und Benedikt Hermann Siegler, mit denen ich stets gut über die Versuche diskutieren konnte. Bei Frau Daniela Schreiber möchte ich mich für die Bereitsstellung von isolierten Kardiomyozyten und die Bearbeitung der anfallenden Bestellungen im Labor bedanken.

Großen Dank schulde ich meiner Familie für all die Jahre der Unterstützung auf dem langen Weg vom Beginn des Studiums bis zur Beendigung dieser Doktorarbeit.