

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und
dem Institut für Pharmakologie
der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Retinol-Bindungsprotein 4 im Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ronja Fedders
Tierärztin aus Rendsburg

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4004

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Michael Schupp
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
mice, animal models, man, retinol-binding proteins (MeSH), transthyretin, thyroxine,
metabolism, adiposity (MeSH), diabetes, liver, glucose tolerance

Tag der Promotion: 09.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Retinoid-Metabolismus	1
1.2 Retinoid-Transport im Blut.....	2
1.3 Retinol-Bindungsprotein 4 (RBP4).....	3
1.4 RBP4 und Insulinresistenz	4
1.5 Transportproteine der Schilddrüsenhormone.....	7
1.6 Transthyretin (TTR)	7
1.7 Schilddrüsenhormone.....	8
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Laborgeräte	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3 Reagenzien.....	13
2.1.4 Kits	14
2.1.5 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	15
2.1.6 Diäten	15
2.1.7 Adeno-assoziierte Viren	16
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	16
2.1.9 Primer für qRT-PCR.....	17
2.1.10 Antikörper für Western Blot	18
2.1.11 Software	19
2.2 Methoden	19

2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.1.1	RNA Isolation aus Gewebe	19
2.2.1.2	cDNA Synthese.....	20
2.2.1.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	20
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.2.2.1	Isolation von Gesamtprotein aus Lebergewebe.....	21
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	22
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Leberprotein	22
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Serum.....	23
2.2.2.5	Western Blot	23
2.2.3	Tierversuch.....	24
2.2.3.1	Gentransfer durch Adeno-assoziierte Viren.....	24
2.2.3.2	Injektion und Dosierung von Adeno-assoziierten-Viren	24
2.2.3.3	Versuchsablauf	25
2.2.3.3.1	Leberspezifische Überexpression von RBP4	25
2.2.3.3.2	Leberspezifische RBP4-Depletion.....	26
2.2.3.4	Bestimmung des Körpergewichtes	27
2.2.3.5	Bestimmung der Blutglukose.....	27
2.2.3.6	Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT).....	27
2.2.3.7	Stoffwechselkäfig LabMaster.....	28
2.2.3.8	Bestimmung der Futteraufnahme	28
2.2.3.9	Bestimmung der Retinoide im Serum und in der Leber	29
2.2.3.10	Bestimmung von Seruminsulin.....	29
2.2.3.11	Bestimmung der Serumtriglyzeride	29
2.2.3.12	Bestimmung von NEFA im Serum.....	29
2.2.3.13	Bestimmung von Gesamt-T ₄ und Gesamt-T ₃ im Serum	29
2.2.3.14	Bestimmung Lebertriglyzeride.....	30
2.2.3.15	Bestimmung Leberglykogen.....	30
2.2.3.16	Statistische Auswertung.....	30
3	Ergebnisse.....	32

3.1.	Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Überexpression von RBP4	32
3.1.1	Effizienz und Spezifität der Adeno-assoziierten Viren	32
3.1.2	Überexpression von RBP4 in der Leber	33
3.1.3	Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf den RBP4-Serumspiegel ..	34
3.1.4	Einfluss der RBP4-Überexpression in der Leber auf Retinol im Serum	34
3.1.5	Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf die Retinoide in der Leber.	35
3.1.6	Verlauf des Körpergewichtes	36
3.1.7	Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf die Insulinsensitivität.....	36
3.1.8	Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf weitere metabolische Parameter	37
3.1.9	Einfluss der leberspezifischen RBP4-Überexpression auf den Stoffwechsel und der lokomotorischen Aktivität	38
3.1.10	Expression der Glukoneogenese-Gene in der Leber.....	40
3.2	Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Reduktion von RBP4	41
3.2.1	Depletion von RBP4 in der Leber	41
3.2.2	Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf den RBP4-Serumspiegel....	42
3.2.3	Einfluss der RBP4-Depletion in der Leber auf Retinol im Serum	42
3.2.4	Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf die Retinoide in der Leber	43
3.2.5	Verlauf des Körpergewichtes	44
3.2.6	Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf die Glukosetoleranz.....	45
3.2.7	Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf die Inflammation im Fettgewebe.	45
3.2.8	Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf metabolische Parameter	46
3.2.9	Einfluss einer hepatischen RBP4-Depletion auf den Energiestoffwechsel und der lokomotorischen Aktivität	47
3.2.10	Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf die Glukoneogenese-Gene <i>Pck1</i> und <i>G6pc</i>	49
3.2.11	Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf Transthyretin (TTR).....	50
3.2.11.1	TTR im Serum	50
3.2.11.2	mRNA-Expression von <i>Ttr</i> in der Leber.....	51

3.2.11.3	TTR Protein in der Leber.....	51
3.2.12	Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf Gesamt-T ₄ und Gesamt-T ₃ im Serum	52
4	Diskussion	54
4.1	Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Überexpression von RBP4	54
4.1.1	Leberspezifische RBP4-Überexpression in C57BL/6J-Mäusen	54
4.1.2	Einfluss auf die lokomotorische Aktivität und den Energiestoffwechsel	55
4.1.3	RBP4-Überexpression und Glukosetoleranz	55
4.1.4	Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf den Glukose- und Fettstoffwechsel	56
4.1.5	Leberspezifische RBP4-Überexpression und Glukoneogenese-Genexpression in der Leber	56
4.2	Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Depletion von RBP4	57
4.2.1	Leberspezifische Depletion von RBP4	57
4.2.2	Einfluss der RBP4-Depletion auf Transthyretin	58
4.2.3	Gesteigerter Stoffwechsel bei einer hepatischen RBP4-Depletion	59
4.2.4	Auswirkung auf die Schilddrüsenhormone im Serum	60
4.2.5	Leberspezifische RBP4-Depletion und Glukosetoleranz	62
4.2.6	Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf den Glukose- und Fettstoffwechsel	63
4.2.7	Leberspezifische RBP4-Depletion und Glukoneogenese-Genexpression in der Leber	64
5	Zusammenfassung.....	65
6	Summary.....	67
7	Literaturverzeichnis	69
8	Publikation.....	XII
9	Danksagung.....	XIII
10	Selbstständigkeitserklärung.....	XIV

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
¹²⁵ I	Iodisotop mit der Massenzahl 125
2/8	Serotyp 2/8
36B4	<i>Mus musculus, ribosomal protein, large, P0</i>
9cRA	9-cis-Retinsäure
AAV	Adeno-assoziierte Viren
ACRP30	Adiponektin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg1	Arginase 1
atRA	all-trans-Retinsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Differenzierungs-Cluster (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
Chi3l3	<i>Chitinase-like 3</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CRBP1	<i>Cellular retinol binding protein 1</i>
CRBP2	<i>Cellular retinol binding protein 2</i>
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
dl	Deziliter
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetate
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	und andere (von <i>lat. et alteres</i>)
g	Gramm
G6pc	Glucose-6-Phosphatase (<i>glucose-6-phosphatase, catalytic subunit</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein

Gr.	Größe
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCR	<i>Hepatic Control Region</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HFD	Hochfettdiät
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IE	Internationale Einheit
IL-6	Interleukin-6
i.p.	Intraperitoneale Injektion
ipGTT	Intraperitoneale Glukosetoleranztest
Jak2	Januskinase 2
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Kg ^{0,75}	metabolische Gewicht (Körpergewicht in kg ^{0,75})
l	Liter
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LP1	leberspezifischer Promotor
LRAT	<i>Lecithin retinol acyltransferase</i>
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
mg	Milligramm
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse 2 (<i>major-histocompatibility complex 2</i>)
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>

n	Anzahl der Tiere
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
ND	Normaldiät
NEFA	freie, nicht veresterte Fettsäuren
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
O ₂	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
Pck1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pds	Plasmid Doppelstrang-DNA (<i>plasmid-double stranded DNA</i>)
pM	Pikomolar
pre-miRNA	Vorläufer miRNA (<i>precursor miRNA</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RARE	<i>Retinoic acid response element</i>
RBP4	Retinol-Bindungsprotein 4
rel.	relative
rER	raue endoplasmatische Retikulum
RER	respiratorischer Quotient
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RIPA	Proteinlysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>round per minute</i>)
RXR	<i>Retinoid x receptor</i>
RXRE	<i>Retinoic x response element</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>Src-homology domain 2</i>

SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
Stra6	<i>Stimulated by retinoic acid gene 6-Rezeptor</i>
Stra6l	<i>STRA6-like-Rezeptor</i>
SV40	Simian-Virus 40
T ₃	3,3',5-Triiodothyronin
T ₄	Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes-Globulin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris-buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20 (<i>tris-buffered saline and Tween® 20</i>)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR-4	Toll-like Rezeptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TR α	Schilddrüsenhormonrezeptor α
TR β	Schilddrüsenhormonrezeptor β
TTR	Transthyretin
U	Einheit (unit)
V	Volt
V. facialis	Gesichtsvene (<i>Vena facialis</i>)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
VCO ₂ /VO ₂	Kohlendioxid-Produktion/Sauerstoff-Verbrauch
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf der metabolischen Charakterisierung nach der Injektion von AAV GFP oder RBP4	26
Abbildung 2: Ablauf der metabolischen Charakterisierung nach der Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA	27
Abbildung 3: Effizienz und Leberspezifität nach der Injektion von AAV GFP	33
Abbildung 4: Überexpression von RBP4 in der Leber durch Injektion von AAV RBP4	34
Abbildung 5: Erhöhter RBP4-Serumspiegel nach Injektion von AAV RBP4	34
Abbildung 6: Erhöhte Retinol-Konzentration im Serum nach einer leberspezifischen RBP4-Überexpression	35
Abbildung 7: Unveränderte Retinoid-Konzentration in der Leber nach einer hepatischen RBP4-Überexpression	36
Abbildung 8: Leberspezifische RBP4-Überexpression hat keinen Einfluss auf das Körpergewicht	36
Abbildung 9: Keine eingeschränkte Glukosetoleranz auf ND und HFD nach einer Überexpression von RBP4 in der Leber	37
Abbildung 10: Kein Unterschied im respiratorischen Quotienten nach einer Injektion von AAV GFP oder RBP4	39
Abbildung 11: Kein Unterschied im Energieverbrauch und der lokomotorischen Aktivität nach einer Injektion von AAV GFP oder RBP4	40
Abbildung 12: Keine Induktion der <i>Pck1</i> - und <i>G6pc</i> -Genexpression durch eine hepatische Überexpression von RBP4	41
Abbildung 13: Depletion von RBP4 in der Leber durch Injektion von AAV RBP4-miRNA	42
Abbildung 14: Verminderter RBP4-Serumspiegel nach Injektion von AAV RBP4-miRNA	42
Abbildung 15: Reduzierte Retinol-Konzentration im Serum nach einer leberspezifischen RBP4-Depletion	43
Abbildung 16: Erhöhte Retinylester-Konzentration und unveränderte Retinol-Konzentration in der Leber nach einer hepatischen RBP4-Depletion	44
Abbildung 17: Kein Effekt der hepatischen RBP4-Depletion auf das Körpergewicht	44
Abbildung 18: Verbesserte Glukosetoleranz nach RBP4-Depletion in Leber	45
Abbildung 19: Kein Unterschied in den Zielgenen für die Gesamt-Makrophagen, M1 und M2 Makrophagen und T-Zellen im gonadalen Fettgewebe nach einer RBP4-Depletion in der Leber	46
Abbildung 20: Kein Unterschied im respiratorischen Quotienten nach einer leberspezifischen RBP4-Depletion	48

Abbildung 21: Erhöhter Energieverbrauch und erhöhte lokomotorische Aktivität nach Injektion von AAV RBP4-miRNA	49
Abbildung 22: Keine Reduktion von <i>Pck1</i> - und <i>G6pc-Genexpression</i> durch eine hepatische Depletion von RBP4.....	50
Abbildung 23: Die leberspezifische RBP4-Depletion führt zu einem verminderten RBP4- und TTR-Spiegel im Serum nach Injektion von AAV RBP4-miRNA.....	51
Abbildung 24: Keine Reduktion der mRNA-Expression von <i>Ttr</i> durch eine hepatische Depletion von RBP4.....	51
Abbildung 25: Verminderte Proteinexpression von RBP4 und verminderte Dimermenge von TTR in der Leber nach RBP4-Depletion in der Leber	52
Abbildung 26: Verminderter Gesamt-T ₃ -Serumspiegel und unveränderter Gesamt-T ₄ -Serumspiegel nach RBP4-Depletion in der Leber	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der verwendeten Laborgeräte	11
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Reagenzien	13
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Kits	14
Tabelle 5:	Zusammensetzung der verwendeten Diäten laut Herstellerangaben.....	15
Tabelle 6:	Liste der verwendeten Adeno-assoziierten Viren und deren Titer.....	16
Tabelle 7:	Liste der verwendeten Primer für die qRT-PCR	17
Tabelle 8:	Liste der verwendeten Antikörper	18
Tabelle 9:	Liste der verwendeten Software	19
Tabelle 10:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisch für die cDNA Synthese	20
Tabelle 11:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die qRT-PCR	21
Tabelle 12:	Temperaturprogramm der qRT-PCR	21
Tabelle 13:	Zusammensetzung der Gele für die SDS-Page.....	22
Tabelle 14:	Keine Unterschiede der metabolischen Parameter nach leberspezifischer RBP4-Überexpression	38
Tabelle 15:	Reduzierte Insulin-Konzentration (<i>ad libitum</i>) und erhöhte Futteraufnahme nach einer RBP4-Depletion in der Leber	47

1 Einleitung

1.1 Retinoid-Metabolismus

Als Retinoide werden Vitamin A und dessen Abkömmlinge bezeichnet (Sporn and Roberts 1985). Sie steuern eine Vielzahl biologischer Vorgänge wie die Embryonalentwicklung, Reproduktion, Aufrechterhaltung des Immunsystems, den Sehvorgang und Stoffwechsel (Blomhoff and Blomhoff 2006). Säugetiere nehmen Retinoide in Form von Carotinoiden (vorrangig β -Carotin), Retinol und/oder Retinylestern mit der Nahrung auf. Im Darm werden die Retinylester durch verschiedene Retinylester-Hydrolasen zu Retinol und Fettsäuren hydrolysiert, wobei Retinol durch die Enterozyten absorbiert werden kann (O'Byrne and Blaner 2013). β -Carotin wird rezeptorvermittelt von den Enterozyten absorbiert und anschließend enzymatisch zu Retinol umgewandelt oder unverändert in Chylomikronen inkorporiert (D'Ambrosio, Clugston et al. 2011). Das resorbierte Retinol liegt in den Enterozyten an das *Cellular retinol binding protein 2* (CRBP2) gebunden vor und wird vorrangig durch die *Lecithin retinol acyltransferase* (LRAT) wieder zu Retinylester verestert (O'Byrne and Blaner 2013). Die Retinylester werden in Chylomikronen inkorporiert und gelangen mit der Lymphe über den *Ductus thoracicus* ins Blut (Blomhoff, Helgerud et al. 1982). 25 bis 33% der in Chylomikronen inkorporierten Retinylester werden durch die Lipoproteinlipase von extrahepatischem Gewebe aufgenommen während die verbleibenden Retinylester in die Leber gelangen (Li, Wongsiriroj et al. 2014).

Die Leber stellt das zentrale Organ für die Aufnahme, Speicherung und Mobilisation der Retinoide dar. 70% der Retinoide im Körper befinden sich in der Leber (D'Ambrosio, Clugston et al. 2011). Die Hepatozyten sind für ihre Aufnahme und Mobilisation verantwortlich und beinhalten 10 bis 20% der Retinoide der Leber. 80 bis 90% der Retinoide der Leber sind in den hepatischen Sternzellen in Form von Retinylestern zu finden (Li, Wongsiriroj et al. 2014). Dabei sind Retinylpalmitat, -oleat und -stearat die Hauptformen der Retinylester in den hepatischen Sternzellen (Goodman, Huang et al. 1965, Blaner, O'Byrne et al. 2009). Das aufgenommene Retinol wird innerhalb der Hepatozyten durch das *Cellular retinol binding protein 1* (CRBP1) gebunden. Es kann entweder metabolisiert oder wieder als Retinylester durch LRAT reesterifiziert und anschließend in den hepatischen Sternzellen gespeichert werden (Blomhoff and Blomhoff 2006). Die Retinylester in den hepatischen Sternzellen können bei Bedarf auch wieder zu Retinol hydrolysiert werden (D'Ambrosio, Clugston et al. 2011). Durch welche Mechanismen der Retinoidtransport zwischen den Hepatozyten und den hepatischen Sternzellen reguliert wird ist noch nicht bekannt (Bellovino, Apreda et al. 2003). Bei Bedarf wird Retinol durch das spezifische Transportprotein Retinol-Bindungsprotein 4 (RBP4) von der Leber in das extrahepatische

Gewebe transportiert (Quadro, Hamberger et al. 2003). Retinylester werden auch in extrahepatischen Organen wie Fettgewebe, Niere, Muskeln, Lunge, Hoden, Haut, Gehirn und Milz gespeichert (Kane, Folias et al. 2008).

In den Zielzellen kann Retinol reversibel zu all-trans-Retinal und im Folgenden irreversibel zu all-trans-Retinsäure (atRA) oxidiert werden. Ebenfalls kann all-trans-Retinal zum, am Sehvorgang beteiligten, 11-cis-Retinal isomerisiert werden. AtRA wird im Anschluss an seine Synthese entweder metabolisiert oder degradiert. Die Degradation erfolgt durch die Cytochrom-P450-Familie oder durch Glucuronidierung (Blomhoff and Blomhoff 2006, Kedishvili 2013). Neben atRA existiert in der Zelle noch das Isomer *9-cis-Retinsäure* (9cRA) (Kane 2012), welches zusammen mit atRA durch die Bindung an nukleäre Rezeptoren die Expression von mehreren hundert Genen reguliert (Balmer and Blomhoff 2002). Die nukleären Rezeptoren *Retinoic acid receptor* (RAR) und *Retinoid x receptor* (RXR) exprimieren jeweils drei Subtypen (α , β , γ). AtRA stellt einen spezifischen Liganden für RAR dar. Hingegen ist 9cRA ein Ligand für RAR und RXR (Chambon 1996). Jedoch ist die physiologische Relevanz von 9cRA weiterhin in der Diskussion (Ruhl, Krzyzosiak et al. 2015). RXR bildet entweder ein Homodimer oder ein Heterodimer mit RAR, kann jedoch auch mit anderen nukleären Rezeptoren wie dem *Proliferator-activated receptor*, *Liver x receptor*, *Vitamin D receptor*, *Farnesoid x receptor*, und *Thyroid hormone receptor* Heterodimere bilden (Mangelsdorf and Evans 1995). Der RAR-RXR Heterodimer Komplex oder RXR-RXR Homodimer Komplex bindet an das *Retinoic acid response element* (RARE) oder *Retinoic x response element* (RXRE) und reguliert darüber die Genexpression von Zielgenen (Soprano, Qin et al. 2004).

1.2 Retinoid-Transport im Blut

Die mit der Nahrung aufgenommenen Retinoide werden als in Chylomikronen inkorporierte Retinylester oder β -Carotin zu den Zielzellen transportiert (D'Ambrosio, Clugston et al. 2011). Dabei spielen die β -Carotine aufgrund der schlechten Absorptionskapazität in Mäusen eine untergeordnete Rolle (Lee, Boileau et al. 1999, O'Byrne and Blaner 2013).

In einem Bedarfszustand wie Nüchternheit kann RBP4 die gespeicherten Retinoide in der Leber mobilisieren und somit Retinol aus der Leber zu den Zielorganen transportieren (Quadro, Hamberger et al. 2003). 95% der Retinoide sind im Nüchternheitszustand an RBP4 gebunden (Li, Wongsiriroj et al. 2014). Die RBP4 assoziierte Retinol-Mobilisation stellt somit den wichtigsten Retinoid-Transportweg im Bedarfszustand dar (Shirakami, Lee et al. 2012). Die übrigen 5% der Retinoide sind in Form von Retinylestern in die Lipoproteine *Very low density lipoprotein* (VLDL), *Low density lipoprotein* (LDL) und *High density lipoprotein* (HDL) inkorporiert (van Bennekum, Wei et al. 2001, Shirakami, Lee et al. 2012). Als Ursprung

dieser Retinylester wird die Leber vermutet (van Bennekum, Wei et al. 2001). Ebenfalls sind im Blut all-trans-Retinsäure gebunden an Albumin, Retinoyl- β -glucuronid sowie Retinyl- β -glucuronid vorhanden (Li, Wongsiriroj et al. 2014). Neben RBP4 könnten bei einer beeinträchtigten RBP4-assoziierten Retinol-Mobilisation die anderen Retinoid-Transportwege eine erhöhte Bedeutung erlangen und somit zur Kompensation beitragen (Fedders, Muenzner et al. 2015).

1.3 Retinol-Bindungsprotein 4 (RBP4)

Das Retinol-Bindungsprotein 4 (RBP4) gehört zur Familie der Lipocaline (Newcomer and Ong 2000), welche kleine hydrophobe Moleküle transportieren (Flower 1996). RBP4 stellt dabei das spezifische Transportprotein im Serum für Retinol dar (Kanai, Raz et al. 1968). Das murine *Rbp4*-Gen ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert und das translatierte Protein besitzt eine molekulare Masse von ca. 21 kDa (Blaner 1989, Chainani, Sampsel et al. 1991).

RBP4 wird vor allem in der Leber synthetisiert, aber auch andere Organe wie Fettgewebe, Niere, Lunge, Herz, Skelettmuskel, Milz, Auge, Gehirn und Hoden exprimieren RBP4 in geringerer Menge (Blaner 1989). Das im Serum vorliegende RBP4 wird in der Leber synthetisiert. Dies konnte mit Hilfe einer leberspezifischen RBP4-Knockout Maus demonstriert werden, in deren Serum kein RBP4 nachzuweisen war (Thompson, Sargsyan et al. 2017). Die Synthese und Sekretion von RBP4 ist am besten in Hepatozyten untersucht: RBP4 wird als prä-Protein synthetisiert, anschließend wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) das Signalpeptid von RBP4 entfernt und das Protein durchläuft den Golgi Apparat bevor es von den Hepatozyten sezerniert wird (Soprano, Pickett et al. 1981, Fries, Gustafsson et al. 1984). Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, aber ist bekannt, dass die Sekretion von RBP4 aus der Leber durch die Verfügbarkeit von Retinol reguliert wird (Bellovino, Apreda et al. 2003). Bei Vitamin-A-Defizienz kommt es zu einer Akkumulation von RBP4 im rER der Hepatozyten (Ronne, Ocklind et al. 1983). Es wird angenommen, dass die Konformationsänderung durch Retinol-Bindung das Verlassen von RBP4 aus dem rER ermöglicht (Bellovino, Apreda et al. 2003). Retinol-RBP4 zirkuliert im Serum als Komplex mit Transthyretin (TTR) (Kanai, Raz et al. 1968), dieser Komplex wird im rER gebildet (Gaetani, Bellovino et al. 2002). Vitamin-A-defiziente Ratten zeigten keinen Unterschied des TTR-Spiegels im Serum und der Leber (Navab, Smith et al. 1977), jedoch akkumulierte TTR im rER der Hepatozyten (Harrison, Smith et al. 1980, Rask, Valtersson et al. 1983). Dass TTR für die Sekretion von RBP4 nicht essentiell ist, konnte in primären Hepatozyten von TTR-Knockout Mäusen gezeigt werden. So sezernieren die primären Hepatozyten der TTR-Knockout Mäuse die gleiche Menge an RBP4 wie die primären Hepatozyten der Kontrollgruppe (van Bennekum, Wei et al. 2001).

Bei nüchternen Mäusen zirkuliert ca. 1 μ M RBP4 im Serum (O'Byrne and Blaner 2013). Hepatisches RBP4 mobilisiert Retinol aus den hepatischen Retinoiden um anschließend das Retinol zu den extrahepatischen Geweben zu transportieren. RBP4 hält somit im Bedarfszustand die Retinoid-Versorgung der extrahepatischen Gewebe aufrecht (Quadro, Hamberger et al. 2003). Dabei zirkuliert Retinol-RBP4 (holo-RBP4) im Blut als Komplex mit TTR (Kanai, Raz et al. 1968), wobei holo-RBP4 eine höhere Affinität als apo-RBP4 (RBP4 ohne Retinol) zu TTR besitzt (Fex, Albertsson et al. 1979). TTR schützt RBP4 durch die Komplexbildung vor der renalen Filtration (Naylor and Newcomer 1999). In TTR-Knockout Mäusen kommt es zu einer 95%igen Reduktion von RBP4 und einer 96%igen von Retinol im Blut (Wei, Episkopou et al. 1995). Die niedrigen RBP4- und Retinol-Spiegel im Blut sind auf die erhöhte renale Filtration von Retinol-RBP4 in der TTR-Knockout Maus zurückzuführen (van Bennekum, Wei et al. 2001). Die Analyse des RBP4-TTR-Komplexes zeigte, dass in *in vitro* bis zu zwei Moleküle von RBP4 an einem TTR gebunden ist (Monaco, Rizzi et al. 1995). Jedoch ist *in vivo* aufgrund der limitierenden Konzentration von RBP4 im Serum nur ein RBP4-Molekül an TTR gebunden (Liz, Mar et al. 2010).

Die anschließende Aufnahme von RBP4-assoziiertem Retinol in periphere Zielzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden sowohl eine Aufnahme über spezifische RBP4-Rezeptoren, als auch eine rezeptorunabhängige Aufnahme durch passive Diffusion (Berry, Jacobs et al. 2013). Als spezifische RBP4-Rezeptoren fungieren der *Stimulated by retinoic acid gene 6*-Rezeptor (Stra6) und/oder der *STRA6-like*-Rezeptor (Stra6l) (Kawaguchi, Yu et al. 2007, Alapatt, Guo et al. 2013). Stra6 bindet RBP4 mit hoher Affinität und vermittelt die Retinol-Aufnahme für die Speicherung und den Metabolismus innerhalb der Zelle, jedoch kann Stra6 auch Retinol-Efflux vermitteln (Kawaguchi, Zhong et al. 2015). Die Expression von Stra6 ist in Organen mit einer Blutschranke wie Auge, Gehirn und Hoden besonders hoch (Kelly, Widjaja-Adhi et al. 2016). Der alternative RBP4-Rezeptor Stra6l ist Stra6 strukturell ähnlich. Er wird vor allem in Leber und Darm exprimiert und vermittelt die Aufnahme von Retinol (Alapatt, Guo et al. 2013). Retinol-assoziiertes RBP4 wird neben der Aufnahme durch extrahepatisches Gewebe auch durch die Leber recycelt (Lewis, Green et al. 1990). Da die Leber keine Stra6-Rezeptoren exprimiert, wird die Aufnahme von Retinol-assoziiertem RBP4 mit Stra6l in Verbindung gebracht, welcher im Gegensatz zu Stra6 eine starke Expression in der Leber aufweist (Alapatt, Guo et al. 2013).

1.4 RBP4 und Insulinresistenz

2005 zeigten Yang, Graham et al. (2005) bei adipösen und/oder insulinresistenten Mausmodellen einen Anstieg von RBP4 im Serum. Sie demonstrierten ebenfalls, dass eine Injektion von humanem rekombinanten RBP4 zu einer Insulinresistenz in C57BL/6 Mäusen führt. Diese Daten lassen RBP4 als Bindeglied zwischen Adipositas und Insulinresistenz

vermuten. Auch in klinischen Studien konnte ein Zusammenhang von RBP4 mit Adipositas und Insulinresistenz gezeigt werden, jedoch spiegelt sich dies nicht überall in der Literatur wider (Fedders, Muenzner et al. 2015). Es wird deshalb weiterhin kontrovers über mögliche verantwortliche Mechanismen für die erhöhte RBP4-Serumkonzentrationen bei Adipositas und/oder Insulinresistenz und den Einfluss von RBP4 auf die Insulinsensitivität diskutiert.

Henze, Frey et al. (2008) zeigten, dass eine erhöhte RBP4-Serumkonzentrationen bei Typ 2 Diabetes die Folge einer verminderten renalen Clearance darstellt. Eine beeinträchtigte Nierenfunktion ist ein häufiger Begleiter von Typ 2 Diabetes, dem metabolischen Syndrom und Adipositas (Locatelli, Pozzoni et al. 2006, Middleton, Foley et al. 2006).

In der Literatur sind Mechanismen beschrieben, wie RBP4 zu einer Insulinresistenz in den untersuchten Mausmodellen führen kann. Norseen, Hosooka et al. (2012) demonstrierten, dass RBP4 die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-6 (IL-6) und *Monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) durch die Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) in Makrophagen induzieren kann. Es ist bekannt, dass Adipositas und Insulinresistenz mit einer milden chronischen Inflammation im Fettgewebe einhergehen und dabei ein Wechsel der Polarisation der Makrophagen im Fettgewebe von anti-inflammatorischen M2-Makrophagen zu proinflammatorischen M1-Makrophagen erfolgt, welche zu einer Proliferation von proinflammatorischen CD4 T-Zellen im gonadalem Fettgewebe führt (Lumeng, Bodzin et al. 2007, Morris, Cho et al. 2013). In einer auf Norseen, Hosooka et al. (2012) aufbauende Studie wurden von Moraes-Vieira, Yore et al. (2014) transgene Mäuse mit einer Überexpression von humanem RBP4 im Muskel untersucht. Diese Mäuse sind insulinresistent und glukoseintolerant. Die humane RBP4-Überexpression führte zu einer vermehrten Inflammation im gonadalen – jedoch nicht im subkutanen – Fettgewebe, sowie einer erhöhten Akkumulation von sowohl Gesamt-Makrophagen als auch proinflammatorischen CD11c- und CD206-Makrophagen im selbigen. Die proinflammatorischen Zytokine der Makrophagen induzierten eine gesteigerte CD4 T-Zellen-Aktivierung und -Proliferation sowie eine vermehrte Polarisation der CD4 T-Zellen zu Th1-Zellen. In einer aufbauenden Studie zeigt Moraes-Vieira, Castoldi et al. (2016), dass RBP4 für die Makrophagen-Aktivierung *Myeloid differentiation primary response gene 88* (Myd88) benötigt und dadurch den *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und *Nuclear factor kappa B* (NFκB) Signalweg der Makrophagen aktiviert. Die aktivierten Makrophagen exprimierten daraufhin vermehrt proinflammatorische Zytokine, aber auch vermehrt den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse 2 (MHC II) und Co-stimulierende Moleküle, woraufhin eine Aktivierung der CD4 T-Zellen folgte. In Übereinstimmung hiermit zeigte die RBP4-Knockout Maus eine verbesserte Insulinsensitivität und eine geringe Inflammation im

gonadalen Fettgewebe. In RBP4-Knockout Mäusen, welche eine Hochfettdiät erhielten, konnten eine Reduktion der Gesamt-Makrophagen, eine verminderte Akkumulation von proinflammatorischen CD11c-Makrophagen und folglich eine reduzierte Anzahl der Gesamt CD4 T-Zellen und vermindert aktivierte CD4-Zellen beobachtet werden (Moraes-Vieira, Castoldi et al. 2016). Jedoch konnte in einer anderen Mausstudie mit einer leberspezifischen murinen RBP4-Überexpression mittels Adenoviren kein Hinweis für eine erhöhte Inflammation im gonadalen Fettgewebe gefunden werden (Muenzner, Tuvia et al. 2013). Ob die mit sechs Tagen kurze Überexpression, die Überexpression von murinem RBP4 oder der Ursprung von RBP4 aus der Leber die Ursache für diesen Unterschied ist, ist nicht geklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

Berry, Jin et al. (2011) zeigten einen anderen möglichen Mechanismus in welchem RBP4 zur Insulinresistenz führt. So ist Stra6 nicht nur als Membranrezeptor für die Aufnahme von Retinol mittels RBP4 verantwortlich sondern fungiert auch als Rezeptorkinase. Der Stra6-Membranrezeptor besitzt in Nähe des cytosolischen Carboxyterminus eine SH2 (Src-homology domain 2)-Domänen-Sequenz (Pasutto, Sticht et al. 2007). Die Bindung des Retinol-RBP4-Komplexes an Stra6 führt zur Tyrosin-Phosphorylierung der SH2-Domäne an Stra6 (Berry, Jin et al. 2011). Für die Tyrosin-Phosphorylierung ist die Translokation von Retinol zum CRBP und zu LRAT in der Zelle essentiell (Berry, O'Byrne et al. 2012). Weder Retinol noch RBP4 alleine konnten eine Tyrosin-Phosphorylierung des Stra6 Rezeptors auslösen. Die Tyrosin-Phosphorylierung von Stra6 führte zu einer Aktivierung der Januskinase 2 (Jak2). Die Jak2 phosphoryliert und aktiviert den *Signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) was in einer Translokation dessen in den Nukleus resultiert. STAT5 induziert als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen wie dem *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) (Berry, Jin et al. 2011). Dieser verursacht eine reduzierte Insulinwirkung (Qatanani and Lazar 2007). Jedoch gibt es auch Studien, in welchen die Aktivierung von Stra6 durch den Retinol-RBP4-Komplex nicht zu einer Aktivierung des Retinol-RBP4/Stra6/Jak2/STAT5 Signalweges führte (Muenzner, Tuvia et al. 2013, Terra, Wang et al. 2013).

Kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, die RBP4 im hepatischen Glukosemetabolismus beschreibt. Es konnte gezeigt werden, dass leberspezifisches RBP4 die Expression von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*Pck1*), dem geschwindigkeitsbestimmenden Gen der Glukoneogenese, in der Leber reguliert. Es wurde demonstriert, dass eine leberspezifische RBP4-Depletion zu einer Abnahme und eine leberspezifischen Überexpression von nicht-sezerniertem RBP4 zu einer Erhöhung der Expression von *Pck1* führen (Ma, Zhou et al. 2016). Eine erhöhte Expression von *Pck1 in der Leber* kann zu Insulinresistenz in der Maus führen (Sun, Liu et al. 2002).

1.5 Transportproteine der Schilddrüsenhormone

Die Schilddrüsenhormone gehören zu den fettlöslichen Hormonen. Thyroxin (T_4) ist zu 99,94% an Transportproteine gebunden und nur 0,06% liegen frei vor. Dabei ist 3,3',5-Triiodothyronin (T_3) zu 99,44% an Transportproteine gebunden und 0,46% liegen frei vor (Palha, Episkopou et al. 1994). Die Bindung an Transportproteine führt zu einer Vermeidung von unspezifischen Effekten durch die Thyroidhormone und einer gleichmäßigen Verteilung im Blut (Schreiber 2002), denn ohne sie würden die Schilddrüsenhormone von den ersten Zellen, mit denen sie in Kontakt kommen, aus der Zirkulation entfernt werden (Mendel, Weisiger et al. 1987). Transportproteine für die Schilddrüsenhormone im Blut sind Transthyretin, Thyroxin-bindendes-Globulin (TBG), Albumin, Lipoproteine, α_1 -Antitrypsin und α_1 -Antichymotrypsin (Schreiber 2002). Dabei ist Transthyretin das wichtigste Transportprotein im Nager (Vranckx, Savu et al. 1990). TTR besitzt eine geringere Affinität zu T_4 gegenüber TBG aber eine größere gegenüber Albumin (Richardson 2009). Die höchste Konzentration der Transportproteine im Serum bei Nagern weist Albumin auf, gefolgt von TTR, wogegen der TBG-Spiegel am niedrigsten ist (Vranckx, Savu et al. 1990, Zaias, Mineau et al. 2009, Du, Otolora et al. 2015).

1.6 Transthyretin (TTR)

Transthyretin, früher Prealbumin, ist ein ca. 55 kDa schweres Protein (Monaco 2000). TTR transportiert sowohl die Schilddrüsenhormone im Blut als auch indirekt Retinol durch Komplexbildung mit RBP4, was zu dessen Name TransThyRetin führte (Liz, Mar et al. 2010). In Nagern stellt TTR neben TBG und Albumin das wichtigste Transportprotein im Liquor als auch im Blut für Schilddrüsenhormone dar (Liz, Mar et al. 2010). Dabei sind bei Nagern ca. 50% des T_4 an TTR im Blut gebunden (Palha 2002). TTR besitzt zwei identische Thyroxin-Bindungsstellen, jedoch transportiert ein TTR Molekül nur ein Molekül Thyroxin. Es herrscht eine negative Kooperativität (Liz, Mar et al. 2010). Wie auch bei den anderen Transportproteinen hat TTR eine größere Affinität für T_4 als für T_3 (Richardson 2009). Die Bindung des Retinol-RBP4-Komplexes beeinflusst nicht die Bindung der Schilddrüsenhormone an TTR und umgekehrt (Raz and Goodman 1969).

Transthyretin wird vor allem in der Leber und im Plexus Choroideus des Gehirns synthetisiert (Soprano, Herbert et al. 1985). In viel geringeren Mengen wurde TTR auch in anderen Geweben wie Meningen, Dottersack, Auge (Retina, Ziliarkörper und Sehnerv), Pankreas, Plazenta, Darm, Magen, Herz, Skelettmuskel und Milz gefunden (Palha 2002, Richardson 2009). TTR ist ein Tetramer aus vier identischen Monomeren mit jeweils 127 Aminosäuren. Beim Aufbau des TTR-Tetramers dimerisieren zunächst zwei TTR-Monomere zu einem Dimer und anschließend zwei Dimere zum Tetramer-Komplex (Monaco, Rizzi et al. 1995). Dabei sind die Dimere stabiler als die Tetramere des TTR (Gaetani, Bellovino et al. 2002).

Der Retinol-RBP4-TTR Komplex wird im rER der Hepatozyten gebildet und anschließend in die Zirkulation sezerniert (Gaetani, Bellovino et al. 2002). Dabei stabilisiert der Retinol-RBP4-Komplex die TTR-Formation und vermindert zusätzlich den Zerfall des TTR-Tetramer-Komplexes (McCammon, Scott et al. 2002, Hyung, Deroo et al. 2010). TTR kann mit RBP4 oder Retinol-RBP4 ein Komplex bilden, jedoch ist die Affinität für den Retinol-RBP4-Komplex zu TTR höher als zu RBP4 alleine (Fex, Albertsson et al. 1979, Malpeli, Folli et al. 1996). Die Degradation von TTR erfolgt vor allem in der Leber, aber auch in Muskel, Haut und Niere (Makover, Moriwaki et al. 1988).

Die TTR-Knockout Maus soll weitere Einblicke in die Funktion von TTR als Transportprotein von Schilddrüsenhormonen bringen. Sie besitzt keinen offensichtlich veränderten Phänotyp und ist Euthyreot, obwohl das wichtigste Transportprotein für die Schilddrüsenhormone fehlt (Episkopou, Maeda et al. 1993, Palha, Episkopou et al. 1994). Gesamt-T₄ ist in den Mäusen unabhängig vom Hintergrund reduziert. Gesamt-T₃ ist bei Mäusen mit einem 129SV-Hintergrund unverändert (Palha, Episkopou et al. 1994), jedoch bei Mäusen mit einem C57BL6-Hintergrund reduziert (Zhao, Li et al. 2008, Kato, Tamaki et al. 2012). Unabhängig davon bleibt die freie Konzentration der Schilddrüsenhormone im Vergleich zur Kontrollmaus gleich (Palha, Episkopou et al. 1994). Palha, Episkopou et al. (1994) vermuten, dass die unveränderte Konzentration der freien Form der Schilddrüsenhormone den euthyroiden Phänotyp der Mäuse erklärt, da nach der freien Hormon-Hypothese nur das freie ungebundene Hormon das biologisch aktive ist (Mendel 1989).

1.7 Schilddrüsenhormone

Schilddrüsenhormone sind am Wachstum, der Entwicklung und der Regulation des Energiestoffwechsels beteiligt (Richardson 2009). Die Synthese und Freisetzung der Schilddrüsenhormone wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse reguliert (Ortiga-Carvalho, Sidhaye et al. 2014). Die Schilddrüse synthetisiert und speichert Thyroxin und 3,3',5-Triiodothyronin (Mondal, Raja et al. 2016). Die Transportproteine transportieren die Schilddrüsenhormone zum Zielgewebe (Palha, Episkopou et al. 1994, Mondal, Raja et al. 2016). Früher wurde angenommen, dass die Schilddrüsenhormone aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften durch passive Diffusion aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften in die Zelle gelangen. Es gibt jedoch immer mehr Studien die vermuten lassen, dass die Schilddrüsenhormone durch spezielle Transporter vermittelt in die Zelle aufgenommen werden (Hennemann, Docter et al. 2001). Innerhalb der Zelle kann die aktive biologische Form der Schilddrüsenhormone, T₃, direkt an die Schilddrüsenhormonrezeptoren α oder/und β (TR α und TR β) im Nukleus binden und somit die Genexpression von Zielgenen regulieren. Die Expression von TR α und TR β ist gewebespezifisch (Ortiga-Carvalho, Sidhaye et al. 2014). Hingegen wird T₄ im Gewebe

durch Deiodasen zur aktiveren Form T_3 dejodiert (Marsili, Zavacki et al. 2011). Thyroxin hat sowohl in gebundener als auch freier Form eine höhere Konzentration im Blut, eine höhere Affinität zu den Transportproteinen, eine längere Halbwertszeit und eine geringere Affinität zu den beiden Schilddrüsen-Rezeptoren als T_3 (Schussler 2000, Choksi, Jahnke et al. 2003, Richardson 2009). Die Schilddrüsenhormone erhöhen den Energieverbrauch, führen zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und einer gesteigerten Thermogenese (Williams and Ellis 1985, Levine, Nygren et al. 2003). Thyreotoxische Ratten zeigen eine unveränderte oder erhöhte Aktivität (Levine, Nygren et al. 2003, Klieverik, Coomans et al. 2009). Eine erhöhte Schilddrüsenhormon-Aktivität im Gewebe durch T_3 oder TR β Liganden führt zu einer Gewichtsabnahme oder zu einer geringerer Gewichtszunahme (Shoemaker, Kono et al. 2012).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Adipositas ist eine Erkrankung mit steigender Inzidenz weltweit und kann zu einer Insulinresistenz führen, welche wiederum die Entstehung verschiedenster Folgeerkrankungen wie Typ 2 Diabetes zu Folge haben kann (Zeyda and Stulnig 2009). Neuere Studien deuten darauf hin, dass Retinoide und deren Bindungsproteine eine Rolle in der Pathogenese metabolischer Krankheiten spielen (Kane, Folias et al. 2008, O'Byrne and Blaner 2008, Shirakami, Lee et al. 2012).

Interessanterweise wurde bei Adipositas und Insulinresistenz eine Erhöhung der RBP4-Serumkonzentration nachgewiesen (Yang, Graham et al. 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Injektion von rekombinanten humanen RBP4 in Mäusen zu einer Insulinresistenz führt (Yang, Graham et al. 2005, Berry, Jin et al. 2011). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass RBP4 eine Verbindung zwischen Adipositas und Insulinresistenz darstellt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch immer nicht verstanden und die derzeit existierenden Hypothesen werden kontrovers diskutiert.

Die Leber stellt das zentrale Organ des Retinoid-Stoffwechsels und den Hauptsyntheseort von RBP4 dar (Blaner 1989, Brun, Yang et al. 2013), jedoch gibt es bisher keine Studien, welche die Effekte von leberspezifischem RBP4 auf den Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel untersuchen. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von leberspezifischem RBP4 auf den Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel in Mäusen untersucht werden. Zusätzlich sollen neue Einblicke in die Interaktion von RBP4 und TTR gewonnen werden. Dafür werden erwachsenen Mäusen Adeno-assoziierte Viren injiziert, die zu einer leberspezifischen RBP4-Überexpression oder einer leberspezifischen RBP4-Depletion führen. Anschließend werden die Mäuse hinsichtlich ihres Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsels charakterisiert. Bei Mäusen mit einer leberspezifischen RBP4-

Reduktion werden zusätzlich das Protein Transthyretin und die Schilddrüsenhormone näher betrachtet, da RBP4 und TTR einen Komplex bilden und in *in vitro* Studien gezeigt werden konnte, dass die Abwesenheit von RBP4 zu einem erhöhten Zerfall des TTR-Tetramers führt (Hyung, Deroo et al. 2010).

Diese Arbeit soll dazu beitragen neue Erkenntnisse über den Einfluss von leberspezifischem RBP4 auf den Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel im Organismus zu gewinnen und die Interaktion von RBP4 und TTR besser zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller (Firmensitz)
Biofuge 13-R Zentrifuge	Heraeus Sepatech (Berlin, D)
Biozym® SPROUT™ Minizentrifuge	Heathrow Scientific® LLC (Vernon Hills, USA)
ChemiDoc™ XRS+ (Gel Imaging System)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
CONTOUR® LINK Blutzuckermessgerät	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, D)
Eppendorf Research® plus Pipetten (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Feinwaage PRACTUM® 64-1S	Sartorius AG (Göttingen, D)
GPR Zentrifuge	Beckman Coulter, Inc. (Brea, USA)
Homogenisator Tissue Tearor™	Biospec Products, Inc. (Breda, NL)
Stoffwechsellkäfige PhenoMaster/ LabMaster	TSE Systems GmbH (Bad Homburg, D)
Magnetrührer RET basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Mikroprozessor-pH-Meter Typ 743	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, D)
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stand (Gel-Gieß-Apparatur)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Elektrophoresekammer)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
MiniSpin® plus Tischzentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, D)
MiniTrans-Blot® Cell (Western Blot System)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
Multitechnologie Mikroplattenleser	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
NanoDrop® ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)

Spectrophotometer	
Gel-Gieß-Apparatur Zubehör (Glasplatten, Kämme)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Inc. (Watertown, USA)
Restrainer Rotating Tail Injector RTI	Braintree Scientific, Inc. (Braintree, USA)
Spannungsquelle UNIPACK Power Supply 250V	Armin Baack Labortechnik (Schwerin, D)
Thermomixer Compact® 5360	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Ultraschall-Homogenisator Bandelin SONOPULS GM 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, D)
Vortexer „vortex-genie2“	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, USA)
Waage Practum® Präzisionswaage 2102-1S	Sartorius AG (Göttingen, D)
Wärmeschrank Memmert Universalschrank UN30	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, D)
xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller (Firmensitz)
0,5 ml Insulinspritzen Myjector U-100	Terumo Medical Corporation
0,4 mm (27 G) x 12 mm	(Elkton, USA)
96 Fast PCR-Platte-Vollrand	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Abdeckfolie PCR-Platte, Microseal® 'B' Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
CONTOUR® Sensoren zur Blutzuckerbestimmung	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, D)
Falcon Röhrchen 15ml	Corning Inc. (Corning, USA)
Falcon Röhrchen 50ml	Corning Inc. (Corning, USA)
Handschuhe Vasco® Nitril white M	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Immun-Blot® PVDF Membran für Western Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Mikro-Schraubröhre 2ml	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Mikrotiterplatte 96-Well	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)

(PCR-Tubes)

Parafilm® PM-996	Bemis Company, Inc. (Neenah, USA)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml PP	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Sterican® Einmalkanülen Gr.16	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Filtropur S 0.2 0,2 µm (sterile Filtration)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Whatmann 3 MM Filterpapier	Whatman (Dassel, D)

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien

Substanz	Hersteller (Firmensitz)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Acrylamid-Lösung A3626 (30%) 37,5:1	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Chloroform	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
D-(+)-Glucose G7528	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Ethylendiamintetraacetate (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche (Mannheim, D)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Glykogen (from rabbit liver type III)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Kaliumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Magnesiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Milchpulver, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
M-MLV Reaction Buffer 5x	Promega GmbH (Mannheim, D)
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH (Mannheim, D)
Na-Desoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)

Nonidet™ P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Non-Reducing Lane Marker	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
Sample Buffer 5x	
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
ProSieve® Color Protein Marker	Lonza Rockland, Inc. (Rockland, USA)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-frei	Roche (Mannheim, D)
Random Hexamer Primers	Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
RNase/DNase freies Wasser (water DEPC-treated and sterile)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Salzsäure ≥ 37 % (HCl)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Trizma® base (Tris-Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Trizma® HCl (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Tween® 20	Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, D)

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits

Produkt	Verwendung	Hersteller (Firmensitz)
Glucose (HK) Assay Kit (GAHK-20)	Bestimmung der freigesetzten Glukose aus Glykogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
NEFA-HR-Kit	Messung nicht veresterte Fettsäuren	Wako Chemicals GmbH
Pierce® BCA-Protein Assay Kit	Proteinbestimmung	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Rat Insulin ELISA Kit	Insulinmessung	Firma Crystal Chem Inc.
RNeasy® Mini Kit	RNA-Isolation	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
RIA 4524	Gesamt-T ₄ Messung	DRG Instruments GmbH (Marburg, D)
RIA 4525	Gesamt-T ₃ Messung	DRG Instruments GmbH (Marburg, D)
Triglyceride FS	Triglyzerid Messung	DIASYS Diagnostic Systems (Holzheim, D)

2.1.5 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

In den Tierversuchen wurden sechs Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse eingesetzt. Die Mäuse stammten aus der Zucht der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Universitätsmedizin Berlin.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in der Tierhaltung des *Center for Cardiovascular Research* (CCR) der Charité Universitätsmedizin Berlin. Diese Tierhaltung ist spezifisch pathogenfrei (SPF-Bereich). Die Mäuse waren bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit $60\% \pm 15\%$ und einem 12 Stunden Lichtregime (ab 6 Uhr Lichtphase, ab 18 Uhr Dunkelphase) untergebracht. Das Hygienemanagement richtete sich nach den Empfehlungen der „*Federation of Laboratory Animal Sciences Association*“ (FELASA). Es wurden jeweils drei bis fünf Mäuse in einem individuell-belüfteten Käfig (IVC-System) Typ III gehalten. Dieser beinhaltete ein rotes Häuschen mit Zellstoff als Nistmaterial sowie einen Holzstiel als Nagematerial und Einstreu für Labormäuse (FS14/Fichte der Firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, D). Die Mäuse wurden einmal wöchentlich in einen Käfig mit frischer Einstreu umgesetzt. Wasser und Futter wurden *ad libitum* angeboten, das verwendete Futter ist in Kapitel 2.1.6 aufgelistet.

Alle Tierversuche wurden beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) unter der Nummer G0100/11 genehmigt.

2.1.6 Diäten

Als Normaldiät (ND) wurde das Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen (V 1534-0) der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, D) verabreicht. Für die Hochfettdiät (HFD) wurde das Futter „High Fat Diet D12492“ der Firma Research Diets Inc. (New Brunswick, USA) gefüttert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Diäten laut Herstellerangaben sind in Tabelle 5 aufgeführt. Weiteren Angaben können vom Hersteller bezogen werden.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Diäten laut Herstellerangaben

Inhaltsstoff	Normaldiät	Hochfettdiät
Energie aus Kohlenhydrate (%)	58	20
Energie aus Protein (%)	33	20
Energie aus Fett (%)	9	60
Vitamin A (IE/ g Futter)	15	5,2
Bruttoenergie (kcal/ g Futter)	3,9	5,2

2.1.7 Adeno-assoziierte Viren

Tabelle 6: Liste der verwendeten Adeno-assoziierten Viren und deren Titer

Virus	Titer (Genompartikel/ml)
AAV2/8-LP1 GFP	$2,56 \times 10^{11}$ /ml
AAV2/8-LP1 RBP4	$4,68 \times 10^{11}$ /ml
AAV2/8-LP1 Kontroll-miRNA	$9,0 \times 10^{11}$ /ml
AAV2/8-LP1 RBP4-miRNA	$3,1 \times 10^{11}$ /ml

2.1.8 Puffer und Lösungen

Proteinlysepuffer (RIPA) in ddH₂O	50 mM Tris-HCL, pH 7,2 150 mM NaCl 2 mM EDTA, pH 8,0 50 mM NaF 0,1% (v/v) SDS 0,5% (w/v) Na-desoxycholat 1% (v/v) Nonidet™ P-40
---	---

Eine Tablette Protease Inhibitor wurde in 50 ml Proteinlysepuffer verwendet.

10x Elektrophoresepuffer für SDS-Page in ddH₂O	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 1% (v/v) SDS
--	---

Der pH-Wert des 10x Elektrophoresepuffers sollte zwischen 8,3 und 8,8 liegen. Es wurde eine 1:10 Verdünnung des 10x Elektrophoresepuffers in ddH₂O verwendet.

Transferpuffer in ddH₂O für Western Blot Towbin Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20% Methanol 0,05% (v/v) SDS
--	---

10x TBS (tris-buffered saline) in ddH₂O	137 mM NaCl 200 mM Tris-Base
---	---------------------------------

Der pH-Wert wurde auf 7,6 mit HCl eingestellt. Es wurde eine 1:10 Verdünnung des 10x TBS in ddH₂O verwendet.

1x TBST (tris-buffered saline und Tween®20) in ddH₂O	1x TBS 0,1% (v/v) Tween®20
--	-------------------------------

Blockpuffer für die PVDF Membran

TBS und TBST 1:1
4% (w/v) Milchpulver

2.1.9 Primer für qRT-PCR

Alle Primer waren mausspezifisch und Intron-überspannend. Von dieser Regel waren die *green fluorescent protein (Gfp)*-Primer ausgenommen, die spezifisch für die Qualle *Aequorea victoria* waren. Die Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3 entworfen. Die mRNA-Sequenzen wurden aus der GenBank Datenbank des International Center for Biotechnology Information (NCBI) bezogen. Die Herstellung erfolgte durch die Firma Invitrogen® Life Technologies GmbH. Die nachfolgende Tabelle 7 zeigt die Liste der verwendeten Primer.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer für die qRT-PCR

Name	Primer	Sequenz (5' → 3')
<i>36B4</i>	Forward	TCATCCAGCAGGTGTTTGACA
	Reverse	GGCACCGAGGCAACAGTT
<i>Arg1</i>	Forward	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG
	Reverse	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
<i>Cd206</i>	Forward	CCACAGCATTGAGGAGTTTG
	Reverse	ACAGCTCATCATTGGCTCA
<i>Cd3</i>	Forward	GGCACGTATCAGTGTCAAGG
	Reverse	CCGGATATGGTGCCTATGTT
<i>Cd68</i>	Forward	TCCCCACCTGTCTCTCTCAT
	Reverse	ACCGCCATGTAGTCCAGGTA
<i>Chi3l3</i>	Forward	GGAATTGGTGCCCTACAAT
	Reverse	CAGACCTCAGTGGCTCCTTC
<i>F4/80</i>	Forward	GGAGGACTTCTCCAAGCCTATT
	Reverse	AGGCCTCTCAGACTTCTGCTT
<i>G6pc</i>	Forward	CGAGGAAAGAAAAAGCCAAC
	Reverse	GGGACAGACAGACGTTTCAGC
<i>Gfp</i>	Forward	ATACCCTGGTGAATCGCATC
	Reverse	CATTGTGGGCGTTGTAGTTG

<i>Mcp-1</i>	Forward	AGCACCAGCCAACTCTCACT
	Reverse	CGTTAACTGCATCTGGCTGA
<i>Pck1</i>	Forward	ATCATCTTTGGTGGCCGTAG
	Reverse	CCTCAGATCTCATGGCTGCT
Rbp4	Forward	GCAGGAGGAGCTGTGCCTAGA
	Reverse	GGAGGGCCTGCTTTGACAGT
Tnf	Forward	CCACCACGCTCTTCTGTCTA
	Reverse	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
Ttr	Forward	CGTACTGGAAGACACTTGGCATT
	Reverse	GAGTCGTTGGCTGTGAAAACC

2.1.10 Antikörper für Western Blot

Tabelle 8: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung		Hersteller	TBS/TBST mit
		1.Antikörper	2.Antikörper		
ACRP30 #sc-26497	Kaninchen	1:4000	1:5000	Santa Cruz	4% Milchpulver
GAPDH #2118	Kaninchen	1:1000	1:5000	Cell Signaling	4% Milchpulver
RBP4 #A0040	Kaninchen	1:1000	1:4000	Dako	5% Milchpulver
TTR #A0002	Kaninchen	1:1000	1:2000	Dako	4% Milchpulver
Anti-Rabbit, HRP- gekoppelt #31460	Ziege	-	-	Pierce	4% Milchpulver

2.1.11 Software

Tabelle 9: Liste der verwendeten Software

Software	Verwendung	Hersteller (Firmensitz)
CFX™ Manager Software Version 3.1	Durchführung und Auswertung qRT-PCR, CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
GraphPad PRISM® 5	Abbildungen und statistische Auswertung	GraphPad Software, Inc. (LaJolla, USA)
Image Lab™	Detektion von Proteine im Western Blot, ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Microplate Manager™ 6, Version 6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration, xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
MikroWin 2000	Insulinmessung, Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
MS Office 2007 (Excel, Word, Power Point)	Datenbearbeitung und Darstellung	Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D)
ND-1000, Version 3.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration, Nanodrop® ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
TSE PhenoMaster Software	Aufzeichnung und Berechnung von Parameter im LabMaster, TSE LabMaster Käfige	TSE Systems GmbH (Bad Homburg, D)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA Isolation aus Gewebe

Die Isolation von RNA aus dem Gewebe erfolgte mit dem QIAzol™ Reagenz in Kombination mit dem RNeasy® Mini Kit. Hierfür wurden ca. 50 mg Gewebe in 500 µl QIAzol™ Reagenz für 20 bis 40 Sekunden mechanisch mit einem Homogenisator zerkleinert. Der Homogenisator wurde zwischen den Proben mit 70 %igem Ethanol und ddH₂O gereinigt. Die Probe wurde anschließend auf 1 ml mit QIAzol™ Reagenz aufgefüllt und kurz geschüttelt. Danach erfolgte eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach wurden dem

Gemisch 200 µl Chloroform zugegeben, dieses für weitere 15 Sekunden stark geschüttelt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Es erfolgte so eine Phasentrennung, wobei die obere, klare, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Das Gemisch wurde 1:1 mit Ethanol 70 % versetzt, für 5 Sekunden geschüttelt und anschließend auf die RNeasy® Mini Kit Säule aufgetragen. Die weitere Isolierung der RNA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl RNase/DNase freien H₂O. Die RNA wurde anschließend bei -80 °C gelagert. Für die Quantifizierung der RNA wurde der NanoDrop® ND-1000 der Firma Peqlab benutzt. Als Nullwert diente RNase/DNase-freies Wasser. Die Bestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 cDNA Synthese

Die aus dem Gewebe gewonnene RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zu 1 µg RNA wurden hierfür je 0,25 µg Random Primer hinzugefügt und auf ein Endvolumen von 15 µl mit RNase/DNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden dann für 5 Minuten auf 70 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Danach wurde zu jeder Probe 10 µl Reaktionsgemisch (Tabelle 10) hinzugefügt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsgemisch für die cDNA Synthese

Reaktionsgemisch	Volumen (µl)
5x M-MLV Reaction Buffer	5
dNTP Mix (10 mM je dNTP)	1,25
RNase/DNase freies Wasser	2,75
M-MLV Reverse Transkriptase (200 u/µl)	1
Gesamtvolumen	10

Anschließend folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C in einem Thermocycler. Die cDNA wurde kurzfristig bei 4 °C und langfristig bei -20 °C gelagert.

2.2.1.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Für die Messung der Genexpression wurde die qRT-PCR verwendet. Hierfür wurde die im vorherigen Schritt synthetisierte cDNA im Verhältnis 1:10 mit RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt. Für die qRT-PCR wurden 10 µl Reaktionsgemisch, das den SYBR Green Farbstoff enthält und 5 µl der verdünnten cDNA verwendet. Das Reaktionsgemisch ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die qRT-PCR

Reagenz	Volumen (µl)
Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)	7,5
Foward Primer (5 µM)	0,3
Reverse Primer (5 µM)	0,3
RNase/DNase freies Wasser	1,9
Gesamtvolumen	10

Der Reaktionsansatz von 15 µl wurde in eine 96-Well Platte pipettiert und mit einer Folie versiegelt. Danach wurde die die Platte 1 Minute bei 2000 rpm zentrifugiert und anschließend erfolgte die Messung im CFX Connect™ Real-Time System der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH. Das Temperaturprogramm der qRT-PCR ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Temperaturprogramm der qRT-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit	Programm
1	1	95 °C	10 Minuten	Aktivierung der Polymerase
2	40	95 °C	15 Sekunden	Denaturierung der DNA
		60 °C	1 Minute	Primerhybridisierung und Amplifikation
3	1	95 °C	30 Sekunden	Schmelzkurve (in 0,5°C Schritten)
		60 → 95 °C	30 Sekunden	

Nach der qRT-PCR wurde für jedes Primerpaar eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bevor im Anschluss die endgültige Auswertung erfolgte. Es wurde eine Standardkurve (cDNA-Verdünnungsreihe 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 %) für jedes Primerpaar genutzt um die Effizienz der Amplifikation zu berechnen und daraus die mRNA-Menge der Proben zu kalkulieren. Die Normalisierung der Genexpression erfolgte mit 36B4 (Mus musculus, ribosomal protein, large, P0) als Referenzgen und wurde als relative Genexpression ausgedrückt. Die Liste der verwendeten Primer ist in Tabelle 7 dargestellt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Isolation von Gesamtprotein aus Lebergewebe

Die Isolation von Protein erfolgte bei 4 °C und mit eisgekühlten Lösungen. Zu 50 mg Lebergewebe wurden 600 µl Proteinlysepuffer hinzugefügt und das Gewebe anschließend mit einem Homogenisator mechanisch zerkleinert. Die Probe wurde dann für 15 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss einer Ultraschallbehandlung (5 Einzelimpulse, niedrigste

Intensität) unterzogen. Es folgte eine Zentrifugation von 60 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C. Der Überstand mit dem gelösten Protein wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung erfolgte in einer Mikrotiterplatte. Die Proben wurden zur Messung im Verhältnis 1:20 im Proteinlysepuffer verdünnt und in Doppelbestimmung gemessen. Für die Standardkurve wurde das im Kit enthaltene Bovine Serum Albumin (BSA) verwendet, das nach Angaben des Herstellers hergestellt und angewendet wurde.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Leberprotein

Für die Elektrophorese wurden 15 %ige Gele mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet. Ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Page

Reagenz	15 % Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	2,4 ml	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
30 % Acrylamid (37,5:1)	5 ml	650 µl
Gesamtvolumen	10 ml	5 ml
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	6 µl

Die Proteinproben für die Gelelektrophorese wurden wie folgt hergestellt:

X µl	50 µg Protein
X µl	Proteinlysepuffer
4 µl	Proteinladepuffer
20 µl	Gesamtvolumen

Der Proteinladepuffer bestand aus dem Probenpuffer (87,5 µl Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer 5x) und 2-Mercaptoethanol (12,5 µl). Die Proben wurden für je 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend für 3 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert. Die Auftrennung der

Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen Elektrophoresekammer mit 1x Elektrophoresepuffer. Das 15 %ige Gel wurde mit den Proben und einem Proteingrößenmarker beladen. Das Einwandern der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel, die Trennung bei 100 V.

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Serum

Die Serumproben für die Elektrophorese wurden wie folgt hergestellt:

2 µl	Serum
46 µl	Proteinlysepuffer
12 µl	Proteinladepuffer
60 µl	Gesamtvolumen

Das Gel wurde mit 20 µl der Probe beladen. Die weiteren Schritte erfolgten identisch zu den Leberproben (Kapitel 2.2.2.3)

2.2.2.5 Western Blot

Die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran erfolgte in einer Tank-Blotting-Apparatur. Die PVDF-Membran wurde eine Minute in Methanol aktiviert und das Sammelgel vom SDS-Gel entfernt. Die Anordnung der Einzelkomponenten im Nassblott gestaltete sich wie folgt: Anode – Schwamm – 2x Whatman-Filterpapier – aktivierte PVDF Membran – Gel – 2x Whatman-Filterpapier – Schwamm – Kathode. Der Zusammenbau erfolgte im gekühlten Transferpuffer. Der Transfer wurde über Nacht bei 4 °C und 29 V durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blockpuffer blockiert und anschließend mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für 15 Minuten mit TBST gewaschen und danach mit dem zweiten Antikörper für 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal für 15 Minuten mit TBST gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Hierfür wurde das ECL Western Blotting Substrat der Firma Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch das Digitale System ChemiDoc™ XRS+. Als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyde-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) und Adiponektin (ACRP30). Die Zusammensetzungen der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 dargestellt.

2.2.3 Tierversuch

2.2.3.1 *Gentransfer durch Adeno-assoziierte Viren*

Die Überexpression oder Reduktion von RBP4 in der Leber erfolgte durch rekombinante Adeno-assoziierte Viren des Serotyps 2/8, welche in Tabelle 6 dargestellt sind. Um eine leberspezifische Überexpression oder Reduktion von RBP4 zu erhalten, wurde ein leberspezifischer Promotor (LP1) bei den Adeno-assoziierten Viren verwendet. Der LP1 setzt sich aus Teilen der Hepatic Control Region (HCR) des menschlichen Apolipoproteins E, dem menschlichen α 1-Antitrypsinpromotor und dem modifizierten SV40 Intron vom kleinen T-Antigen zusammen (Nathwani, Gray et al. 2006).

Für das Mausmodell mit einer Überexpression von RBP4 wurde ein pdsAAV-LP1 Vektor mit der cDNA von GFP oder murinem RBP4 verwendet. Für das Mausmodell mit einer Reduktion von RBP4 wurde eine spezifische pre-miRNA für murines RBP4 (5'TTCAGTGTCTGTGAAAGTGCC-3') oder eine unspezifische pre-miRNA als Kontrolle (5'AAATGTACTGCGCGTGGAGAC-3') in pcDNA 6.2-GW/miR kloniert. Hierfür wurde das BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit der Firma Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der hergestellte Vektor wurde anschließend in den pdsAAV-LP1 Vektor kloniert.

Die Herstellung der AAVs des Serotyps 2/8 und die Bestimmung der Genompartikel erfolgte durch Privatdozent Dr. Stefan Weger aus dem Institut für Virologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Für die Überexpression von RBP4 in der Leber wurde AAV2/8-LP1 RBP4 verwendet, als Kontrolle diente AAV2/8-LP1 GFP. Eine Reduktion von RBP4 in der Leber erfolgte mit Hilfe von AAV2/8-LP1 RBP4-miRNA, als Kontrolle wurde AAV2/8-LP1 Kontroll-miRNA genutzt.

2.2.3.2 *Injektion und Dosierung von Adeno-assoziierten-Viren*

Die Injektion der Adeno-assoziierten-Viren erfolgte in die Schwanzvene. Hierfür wurden die Mäuse in einem Restraîner fixiert und der Schwanz für ca. 30 bis 60 Sekunden in 42 °C warmem Wasser erwärmt um die Venen zu dilatieren. Nach der Injektion wurde mit einer Kompresse kurz Druck auf die Vene ausgeübt um das Austreten von injizierter Lösung oder Blut zu verhindern. Die Viren wurden für die Injektion in einem Volumen von 250 μ l mit steriler 0,9%iger Kochsalz-Lösung verdünnt.

Bei einer leberspezifischen RBP4-Überexpression wurden $0,8 \times 10^{11}$ Genompartikel von AAV GFP oder RBP4 injiziert und es wurden $0,3 \times 10^{11}$ Genompartikel von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA bei einer leberspezifischen RBP4-Depletion verwendet. Die jeweiligen verwendeten Titer sind in der Tabelle 6 dargestellt.

2.2.3.3 Versuchsaufbau

2.2.3.3.1 Leberspezifische Überexpression von RBP4

Für die Injektion von AAV GFP oder RBP4 wurden insgesamt 20 männliche C57BL/6J Mäuse verwendet, wobei 9 Mäuse eine AAV GFP- und 11 Mäuse eine AAV RBP4-Injektion erhielten.

Vor der AAV-Injektion im Alter von sieben Wochen erfolgte eine einwöchige Akklimatisierungsphase zur Gewöhnung der Mäuse an die neue Umgebung. Die Haltung der Versuchstiere fand in gemischten Gruppen aus GFP- und RBP4-Mäusen statt. Der erste Abschnitt der metabolischen Charakterisierung erfolgte nach einer vierwöchigen Fütterung der Normaldiät, wobei in der dritten Woche die Blutglukose bestimmt wurde. Der intraperitoneale Glukosetoleranztest (ipGTT) erfolgte 3,5 Wochen nach der Virus-Injektion. Die Futteraufnahme wurde in der vierten Woche über zwei Tage gemessen. Alle Mäuse wurden wöchentlich gewogen. Das Serum für die Retinol-Analyse wurde am Tag der Umstellung von Normal- auf Hochfettdiät gewonnen. Für die Retinol-Analyse wurde das Serum von zwei bis drei Mäusen gepoolt.

Ab der fünften Woche wurde den Mäusen eine Hochfettdiät angeboten. Der ipGTT im Verlauf der Hochfettdiät erfolgte in der 18. Woche nach Virus-Injektion und eine Woche später wurden die Tiere im Stoffwechselkäfig LabMaster charakterisiert. Nachdem das Gewicht und die Blutglukose bestimmt wurden erfolgte 22 Wochen nach der Virus-Injektion die Tötung der Mäuse, anschließend wurde das Herz für die Serumgewinnung punktiert. Die Leber wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das entnommene Blut wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und danach mit 13000 rpm und bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

In Abbildung 1 ist der Ablauf der metabolischen Charakterisierung schematisch dargestellt.

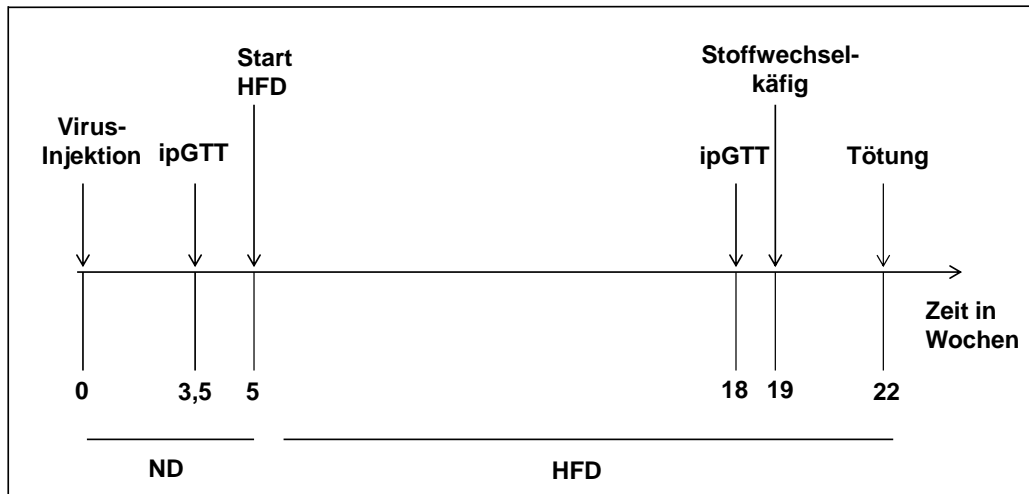


Abbildung 1: Ablauf der metabolischen Charakterisierung nach der Injektion von AAV GFP oder RBP4

2.2.3.3.2 Leberspezifische RBP4-Depletion

Für die Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA wurden insgesamt 15 männliche C57BL/6J Mäuse verwendet, wobei 10 Mäuse eine AAV Kontroll-miRNA und 5 Mäuse eine AAV RBP4-miRNA-Injektion erhielten.

Zunächst erfolgte eine einwöchige Akklimatisierungsphase der 6 Wochen alten Mäuse zur Gewöhnung an die neue Umgebung. Anschließend wurden die Mäuse für einen Zeitraum von acht Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert bevor eine Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA in die Schwanzvene vorgenommen wurde. Die Haltung der Versuchstiere fand in gemischten Gruppen aus AAV Kontroll- und AAV RBP4-miRNA Tieren statt. Die Dokumentation des Gewichtverlaufs erfolgte wöchentlich. In der fünften Woche wurde ein ipGTT durchgeführt. Eine Woche später wurden die Mäuse im Stoffwechselkäfig LabMaster untersucht, in welchem auch die Futteraufnahme ermittelt wurde. Nachdem der Bestimmung von Gewicht und Blutglukose erfolgte 13 Wochen nach der Virus-Injektion die Tötung der Mäuse, anschließend wurde das Herz für die Serumgewinnung punktiert sowie die Leber und das gonadale Fettgewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Serum wurde wie in Kapitel 2.2.3.3.1 beschrieben gewonnen. Die Lagerung von Gewebe und Serum bis zur Analyse erfolgte bei -80 °C.

Abbildung 2 skizziert den Ablauf der metabolischen Charakterisierung.

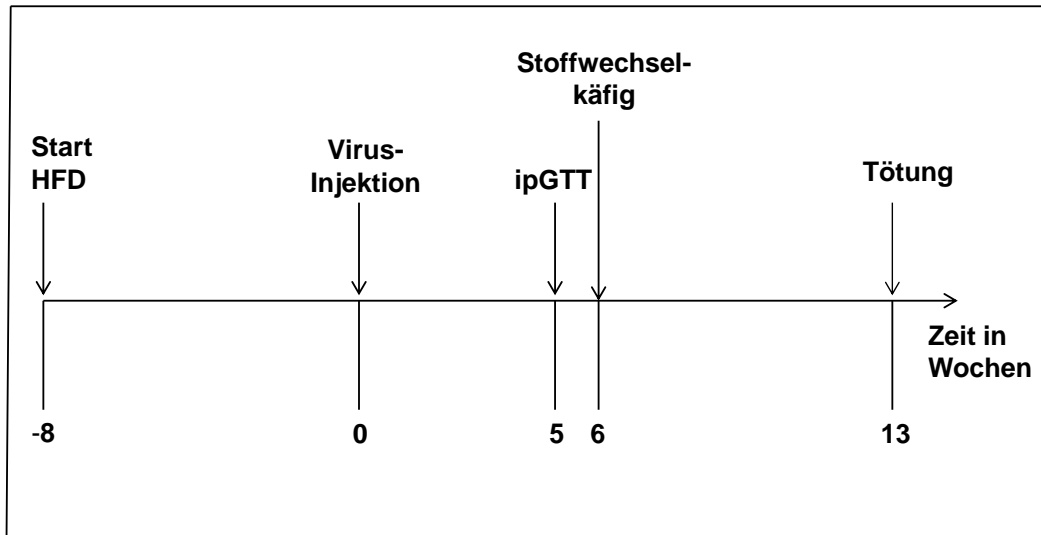


Abbildung 2: Ablauf der metabolischen Charakterisierung nach der Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA

2.2.3.4 Bestimmung des Körpergewichtes

Die Bestimmung des Körpergewichtes (KG) erfolgte in einer Schüssel auf einer Waage. Die Schüssel diente als räumliche Begrenzung für die Mäuse. Das Gewicht wurde einmal wöchentlich um 09:30 Uhr mit einer Genauigkeit von 0,1 g bestimmt.

2.2.3.5 Bestimmung der Blutglukose

Der Blutglukosespiegel wurde mit dem Blutzuckermessgerät CONTOUR® LINK und den dazugehörigen Teststreifen bestimmt. Zur Messung wurde ein Tropfen Blut aus der V. facialis verwendet. Der Blutglukosewert wurde *ad libitum* um 9 Uhr bestimmt.

2.2.3.6 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)

Vor der Durchführung des Glukosetoleranztests erfolgte eine 16-stündige nüchterne Phase. Dafür wurden die Tiere um 16 Uhr in einen neuen Käfig umgesetzt, welcher Wasser *ad libitum*, aber kein Futter enthielt. Am Folgetag um 8 Uhr wurde dann das Körpergewicht und die basale Blutglukose (Zeitpunkt 0) bestimmt. Das Körpergewicht diente als Grundlage zur Berechnung der zu injizierenden Glukosemenge. Die Mäuse erhielten bei Fütterung von Normaldiät 2 g/kg KG Glukose gelöst in 0,9%igem NaCl und bei Hochfettdiät 0,5 g/kg KG Glukose gelöst in 0,9%igem NaCl. Die 20%ige Glukoselösung wurde dabei intraperitoneal injiziert. Die Bestimmung der Blutglukose im venösen Blut fand 15, 30, 60 und 120 Minuten post injectionem statt. Zum 15 Minuten-Zeitpunkt wurde außerdem Blut für die Insulinbestimmung entnommen. Die Glukosemessung erfolgte wie unter 2.2.3.5.

2.2.3.7 Stoffwechselkäfig LabMaster

Die Messung von Sauerstoff-Verbrauch (O_2 -Verbrauch), Kohlendioxid-Produktion (CO_2 -Produktion), respiratorischem Quotient (RER), Energieverbrauch, lokomotorische Aktivität sowie Futteraufnahme erfolgte im Stoffwechselkäfig LabMaster (TSE Systems GmbH).

Die Mäuse wurden hierfür individuell in den Stoffwechselkäfigen gehalten. Die Stoffwechselkäfige enthielten neben Futter und Wasser *ad libitum* nur Einstreu. Der Aufenthalt der Mäuse im Stoffwechselkäfig setzte sich aus einer 16-stündigen Eingewöhnungszeit und einer 48-stündigen Messzeit zusammen. Die Messung der Parameter startete mit Beginn der Lichtphase im Tierstall um 6 Uhr morgens. Der Futterverbrauch wurde über 48 Stunden automatisch über elektronische Waagen bestimmt. Die spontane lokomotorische Aktivität der Mäuse wurde durch Infrarot-Lichtschranken gemessen, wodurch die totale lokomotorische Aktivität für die X- und Y-Achse bestimmt wurde. Im Stoffwechselkäfig wurden der O_2 -Verbrauch und die CO_2 -Produktion der ausgeatmeten Luft der Mäuse über entsprechende Sensoren analysiert. Hierfür wurde das Gerät vor der Messung nach den Angaben des Herstellers kalibriert und bei der Messung wurden die Messwerte der Mäuse mit einem mit gemessenen Referenzkäfig verglichen gebildet, Aus dem Verhältnis von CO_2 -Produktion zu O_2 -Verbrauch ($RQ = VCO_2 / VO_2$) wurde der respiratorische Quotient berechnet. Dieser gibt Hinweise auf die primär umgesetzten Substrate für die Energiegewinnung und beträgt bei der Verbrennung von Kohlenhydraten 1,0, bei Proteinen 0,8 und bei Fetten 0,7 (Livesey and Elia 1988). Der Energieverbrauch wurde indirekt durch die Parameter O_2 -Verbrauch und CO_2 -Produktion mit der TSE PhenoMaster Software bestimmt. Die Aufzeichnung der Parameter erfolgte jede 33ste Minute über eine Zeitraum von 48 Stunden durch das LabMaster TSE System. Für die Auswertung der Daten wurden der O_2 -Verbrauch, die CO_2 -Produktion und der Energieverbrauch auf das metabolische Gewicht (Körpergewicht in $kg^{0,75}$) normalisiert (Tschop, Speakman et al. 2012).

2.2.3.8 Bestimmung der Futteraufnahme

Die Bestimmung der Futteraufnahme erfolgte entweder im Stoffwechselkäfig LabMaster oder wurde manuell mit einer Waage ermittelt. Im Stoffwechselkäfig wurde die Futtermenge automatisch durch eine integrierte elektronische Waage bestimmt. Für die manuelle Bestimmung wurden die Mäuse individuell im Käfig platziert mit einer 16-stündigen Eingewöhnungszeit. Die Messung der Futteraufnahme erfolgte dann über einen Zeitraum von 48 Stunden alle 24 Stunden mit einer elektronischen Waage (0,01 g).

2.2.3.9 Bestimmung der Retinoide im Serum und in der Leber

Die Analyse der Retinoide im Serum und der Leber erfolgte durch Prof. Dr. Jens Raila und Andrea Hurtienne aus dem Institut für Ernährungsforschung der Universität Potsdam mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) Quantifikation. Die Durchführung der Retinoid-Messung in der Leber ist von Muenzner, Tuvia et al. (2013) beschrieben, die Bestimmung im Serum erfolgte analog dazu.

2.2.3.10 Bestimmung von Seruminsulin

Die Bestimmung von Insulin im Serum erfolgte mit dem Rat Insulin ELISA Kit der Firma Crystal Chem. Inc.. Unter der Verwendung eines Mausstandards (Mouse Insulin Standard 2 ng) ist der ELISA zur Bestimmung von Mausinsulin im Serum geeignet. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.11 Bestimmung der Serumtriglyzeride

Die Analyse von Triglyzeriden aus dem Serum wurde mit dem Triglycerid FS-Kit (DIASYS) ermittelt. Aus dem mitgelieferten Standard wurde eine Standardreihe (0, 25, 50, 100, 200 mg/dl) mit PBS erstellt. Die Messung erfolgte in 5 µl Serum oder Standard. Zu den Proben wurden 200 µl vom Triglyzerid-Reagenz hinzugefügt. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation bei 37 °C und anschließend die Messung bei einer Wellenlänge von 500 nm im Plattenleser.

2.2.3.12 Bestimmung von NEFA im Serum

Die Konzentrationsbestimmung der freien, nicht veresterten Fettsäuren (NEFA) im Serum erfolgte mit dem NEFA-HR-Kit der Firma Wako Chemicals GmbH. Die Standardreihe (1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0 mmol/l) wurde mit dem mitgelieferten Standard und PBS hergestellt. Es wurden 5 µl Serum oder Standard verwendet. 150 µl NEFA-Reagenz 1 wurden zur Probe hinzugefügt und anschließend für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde NEFA-Reagenz 2 hinzugefügt und erneut für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte im Plattenleser bei 546 nm.

2.2.3.13 Bestimmung von Gesamt-T₄ und Gesamt-T₃ im Serum

Die Analyse der Gesamt-T₄- und Gesamt-T₃ Konzentration im Serum wurde in Doppelbestimmung jeweils mit Hilfe eines RIA-Kits von DRG Instruments GmbH gemessen. Die Bestimmung erfolgte durch Dr. Eddy Rijntjes aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie (Charité Universitätsmedizin Berlin) nach den Angaben des Herstellers. Die Durchführung ist von Tsourdi, Rijntjes et al. (2015) beschrieben.

2.2.3.14 Bestimmung Lebertriglyzeride

Für die Bestimmung der Triglyzeride in der Leber wurden zu 50 mg Lebergewebe 600 µl einer alkoholischen Kaliumlauge (2 Teile Ethanol und 1 Teil 30% Kaliumlauge) hinzugefügt. Das Gemisch wurde 5 Stunden bei 60 °C in einem Thermomixer inkubiert. Danach wurden 500 µl der verdauten Gewebesuspension zu 540 µl einer 1-molaren Magnesiumchlorid-Lösung hinzugefügt und vermischt. Die Probe wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Messung der Triglyzeride erfolgte aus 5 µl des Überstands. Die weiteren Schritte der Messung erfolgten identisch zur Messung von Triglyzeriden im Serum (Kapitel 2.2.3.11). Die Konzentration wurde pro Gramm Lebergewebe berechnet.

2.2.3.15 Bestimmung Leberglykogen

Für die Bestimmung von Leberglykogen wurde ein Glykogenstandard (50mg/ml, 25mg/ml, 12,5mg/ml, 6,25mg/ml, 3,125mg/ml und 1,5625mg/ml) in 1,25 N HCl-Lösung hergestellt. Das Lebergewebe (50 mg) wurde in 500 µl einer 0,03 N HCl-Lösung mit Hilfe eines Homogenisators mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden 100 µl der Gewebesuspension oder vom Standard zu 400 µl 1,25 N HCl-Lösung hinzugefügt. Die Proben und der Standard wurden für eine Stunde bei 100 °C erhitzt. Danach wurden sie für 30 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 20 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl 1,25 N NaOH-Lösung neutralisiert. Zur Messung der freigesetzten Glukose wurde 10 µl des neutralisierten Gemisch mit 300 µl Glukose Reagenz des Glucose (HK) Assay Kit der Firma Sigma-Aldrich vermischt und nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bei 340 nm im Plattenleser gemessen. Die Konzentration wurde pro Gramm Lebergewebe berechnet.

2.2.3.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel und GraphPad Prism® 5.0. Die Daten in den Tabellen und Graphen sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Ausgenommen davon sind die Darstellungen von Retinol im Serum. Dies ist als Boxplot mit Median und Quartile dargestellt. Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft. Bei der AAV RBP4-miRNA Gruppe konnte aufgrund der geringen Tieranzahl keine Testung auf Normalverteilung erfolgen. Hier wurde eine Normalverteilung angenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden der ungepaarte t-Test und die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen als Signifikanztest verwendet. Für die Analyse des Gewichtsverlaufs und des Glukosetoleranztests wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen angewendet und anschließend erfolgte der Post-Hoc-Test (Bonferroni

Test). Alle anderen statistischen Auswertungen erfolgten mit dem ungepaarten t-Test. Die Gruppenunterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der p-Wert $<0,05$ war.

3 Ergebnisse

3.1. Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Überexpression von RBP4

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der metabolische Phänotyp eines neuen Mausmodells mit einer leberspezifischen Überexpression von RBP4 durch Adeno-assoziierte Viren charakterisiert. Dafür wurden sechs Wochen alte C57BL/6J Mäuse zuerst bei Fütterung einer Normaldiät und anschließend einer Hochfettdiät charakterisiert.

3.1.1 Effizienz und Spezifität der Adeno-assoziierten Viren

In dieser Arbeit wurden Adeno-assoziierte Viren mit einem leberspezifischen Promotor (LP1) verwendet (Nathwani, Gray et al. 2006). Die Effizienz der Infektion wurde durch die Injektion von AAV GFP bestimmt, welches zur Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP führt. Die Leberproben wurden im Anschluss an die Injektion von AAV GFP unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. In Abbildung 3A ist die Leber einer Maus nach AAV GFP-Injektion und eine Leber ohne erfolgte Injektion von AAV dargestellt. Mit Hilfe der AAV GFP-Injektion konnte eine erfolgreiche Infektion der Leber mit Adeno-assoziierten Viren nachgewiesen werden. Die Leberspezifität durch LP1 wurde mittels qRT-PCR kontrolliert. Die relative mRNA-Expression von *Gfp* in verschiedenen Geweben ist in Abbildung 3B dargestellt. Die mRNA Expression von *Gfp* ist fast ausschließlich in der Leber vorzufinden, sodass die Leberspezifität von LP1 verifiziert werden konnte.

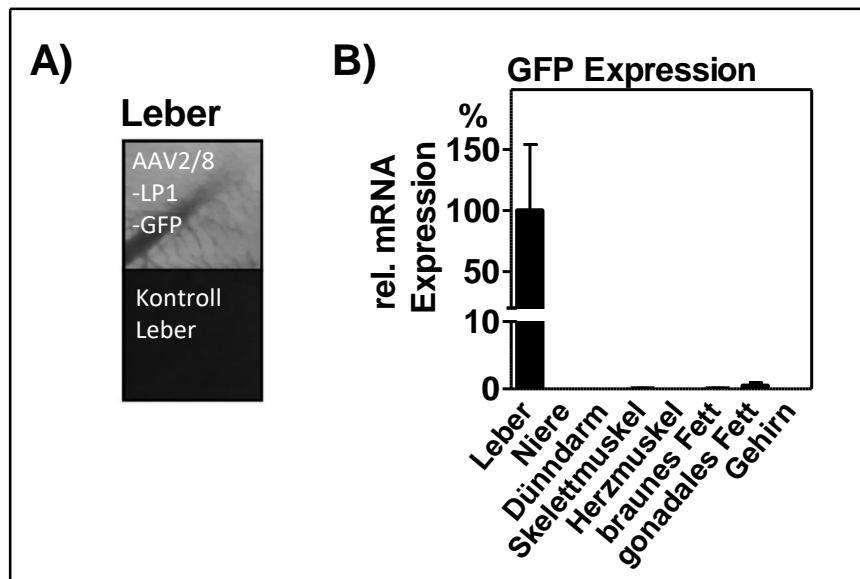


Abbildung 3: Effizienz und Leberspezifität nach der Injektion von AAV GFP. Dargestellt ist die Fluoreszenz der Leber mit oder ohne Injektion von AAV GFP (A) und die relative mRNA-Expression von *Gfp* in verschiedenen Geweben (B). Die Messung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und qRT-PCR (n=2).

3.1.2 Überexpression von RBP4 in der Leber

Die Injektion von AAVs mit einem leberspezifischen Promotor erfolgte in die Schwanzvene von C57BL/6J Mäusen. Die AAVs exprimierten entweder GFP oder RBP4. Für die Validierung der hepatischen RBP4-Überexpression wurde die mRNA-Expression in der Leber bestimmt. Die Injektion von AAV RBP4 führt zu einem 3,5-fachen Anstieg der *Rbp4* mRNA-Expression in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4).

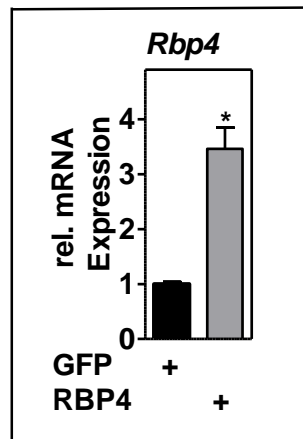


Abbildung 4: Überexpression von RBP4 in der Leber durch Injektion von AAV RBP4. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Rbp4* in der Leber 22 Wochen nach Virus-Injektion. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. (n=9,11, *p<0,05 zu AAV GFP)

3.1.3 Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf den RBP4-Serumspiegel

Die Injektion von AAV RBP4 führte zu einem 3,5-fachen Anstieg der relativen *Rbp4* mRNA-Expression in der Leber. Die Leber ist verantwortlich für die Synthese und Sekretion von RBP4 ins Serum (Thompson, Sargsyan et al. 2017). Im nächsten Schritt wurde daher überprüft, ob die veränderte *Rbp4* mRNA-Expression in der Leber Einfluss auf den RBP4-Serumspiegel hat. Für die Analyse wurde Serum der Tiere in der 22. Woche *post infectionem* mittels Western Blot auf RBP4-Protein untersucht, ACRP30 diente dabei als Ladekontrolle. Pro Gruppe werden repräsentativ vier Tiere gezeigt. In Abbildung 5 ist der Anstieg des RBP4-Serumspiegels bei einer leberspezifischen RBP4-Überexpression dargestellt. Folglich beeinflusst die erhöhte *Rbp4* mRNA-Expression in der Leber den RBP4-Serumspiegel.

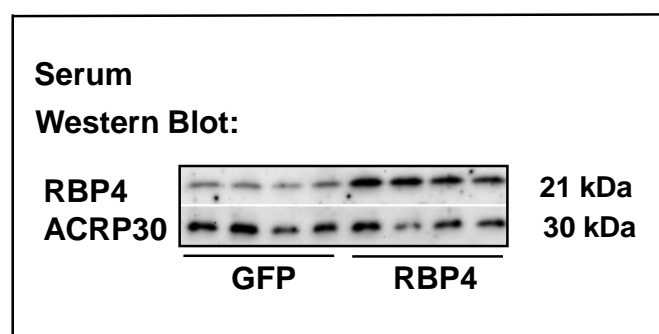


Abbildung 5: Erhöhter RBP4-Serumspiegel nach Injektion von AAV RBP4. Dargestellt ist der Western Blot des Proteins RBP4 im Serum 22 Wochen nach Virus-Injektion. Adiponektin diente als Ladekontrolle.

3.1.4 Einfluss der RBP4-Überexpression in der Leber auf Retinol im Serum

Die Mäuse mit einer RBP4-Überexpression in der Leber zeigten einen erhöhten RBP4-Serumspiegel. RBP4 wird als Komplex mit Retinol aus der Leber sezerniert (Ronne, Ocklind et al. 1983). Deshalb erfolgte die Bestimmung der Retinol-Konzentration im Serum aus der 4.

Woche (bei Normaldiät) und 22. Woche (bei Hochfettdiät) nach Virus-Injektion mittels HPLC. Die Abbildung 6 zeigt die Retinol-Konzentration im Serum für die Normaldiät sowie Hochfettdiät beider Gruppen. Die leberspezifische RBP4-Überexpression führt zu erhöhten Retinol-Konzentrationen im Serum. Dies ist sowohl der Fall für die Normaldiät als auch für die Hochfettdiät. Die Retinol-Konzentration steigt ebenfalls an, wenn den Mäusen eine Hochfettdiät statt einer Normaldiät verabreicht wird. Folglich hat die Diät einen Einfluss auf die Retinol-Konzentration sowie die Überexpression von RBP4 in der Leber.

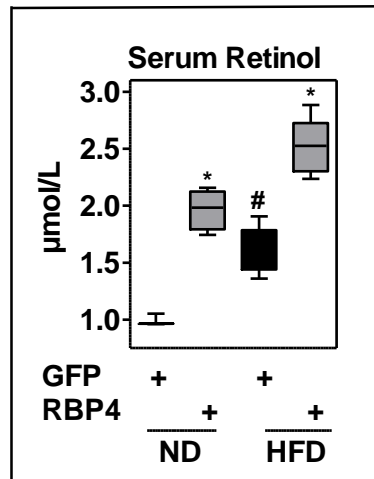


Abbildung 6: Erhöhte Retinol-Konzentration im Serum nach einer leberspezifischen RBP4-Überexpression. Dargestellt ist die Messung von Retinol mittels HPLC im Serum für die ND 4 Wochen und HFD 22 Wochen nach Virus-Injektion. (ND n= 3,4, HFD n=9,11, *p<0,05 zu AAV GFP, #p<0,05 zu AAV GFP ND)

3.1.5 Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf die Retinoide in der Leber

Eine erhöhte RBP4 Expression in der Leber könnte auch den Retinoid-Gehalt in der Leber beeinflussen, da Retinol durch RBP4 in der Leber mobilisiert wird (Quadro, Blaner et al. 1999). Deshalb erfolgte eine Analyse der Hauptformen der Retinoide mittels HPLC im Lebergewebe der 22. Woche nach Virus-Injektion. Es wurden keine Unterschiede in den Konzentrationen zwischen den Gruppen für Retinol und den drei Hauptformen der Retinylester (Retinyloleat, Retinylpalmitat und Retinylstearat) festgestellt (Abbildung 7). Eine leberspezifische RBP4-Überexpression über einen Zeitraum von 22 Wochen hat keinen Einfluss auf den Retinoid-Gehalt der Leber.

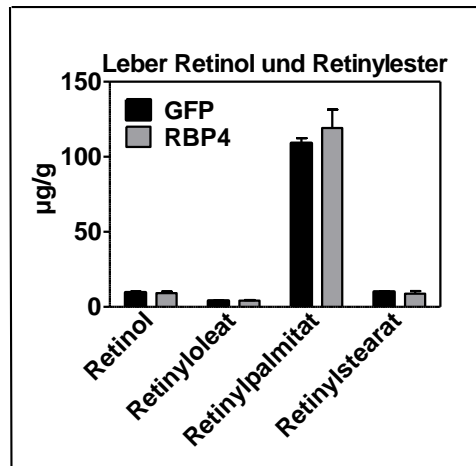


Abbildung 7: Unveränderte Retinoid-Konzentration in der Leber nach einer hepatischen RBP4-Überexpression. Dargestellt ist die Messung der Retinoide mittels HPLC in der Leber 22 Wochen nach Virus-Injektion. (n=9,11)

3.1.6 Verlauf des Körpergewichtes

Für die vollständige metabolische Charakterisierung wurde wöchentlich das Körpergewicht über einen Zeitraum von 22 Wochen bestimmt. Die Abbildung 8 stellt den Verlauf des Körpergewichtes dar. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit Normaldiät und Hochfett-diät. Die RBP4-Überexpression in der Leber hat folglich keinen Einfluss auf das Körpergewicht.

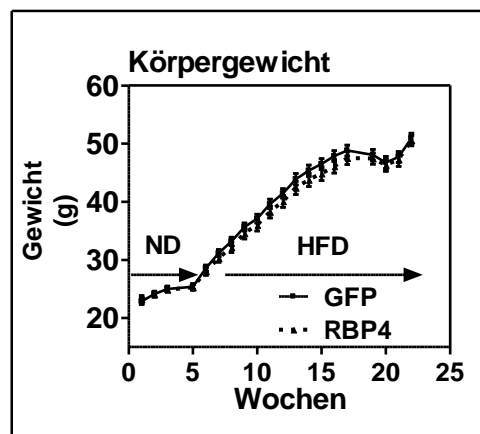


Abbildung 8: Leberspezifische RBP4-Überexpression hat keinen Einfluss auf das Körpergewicht. Dargestellt ist der Verlauf des Körpergewichtes auf ND und HFD über einen Gesamtzeitraum von 22 Wochen nach Injektion von AAV GFP oder RBP4. (n=9,11)

3.1.7 Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf die Insulinsensitivität

Erhöhtes Serum-RBP4 wurde mit einer verminderten Insulinsensitivität in Verbindung gebracht (Yang, Graham et al. 2005, Moraes-Vieira, Yore et al. 2014). Zur Bestimmung dieser wurde der ipGTT bei den Mäusen auf Normaldiät und Hochfett-diät durchgeführt. Die Abbildung 9 stellt den ipGTT bei Normal- (A) und Hochfett-diät (B) dar. Zwischen der GFP-

und RBP4-Gruppe konnte weder bei der Normal- noch bei der Hochfettdiät ein Unterschied in der Insulinsensitivität festgestellt werden. Eine leberspezifische RBP4-Überexpression führt folglich bei keinem der Diättypen zu einem Unterschied in der Glukosetoleranz.

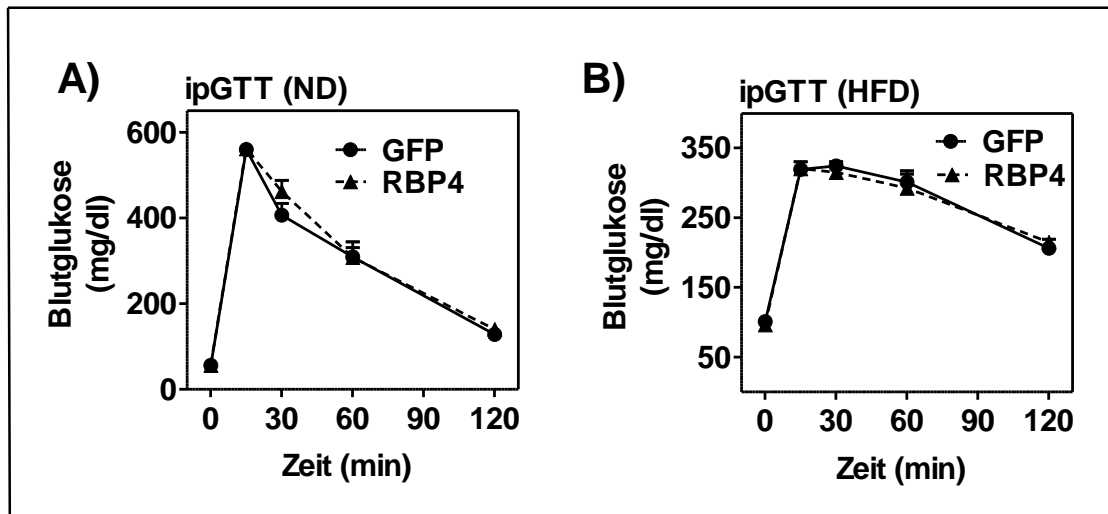


Abbildung 9: Keine eingeschränkte Glukosetoleranz auf ND und HFD nach einer Überexpression von RBP4 in der Leber. Dargestellt ist der Verlauf des ipGTTs der ND (A) 3,5 Wochen nach Virus-Injektion und der HFD (B) 18 Wochen nach Virus-Injektion. Mäuse erhielten nach einer 16 stündigen Nüchternphase auf ND 2g/kg Körpergewicht Glukose i.p. und auf HFD 0,5g/kg Körpergewicht Glukose i.p.. (n=9, 11)

3.1.8 Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf weitere metabolische Parameter

Im Verlauf der metabolischen Charakterisierung wurden mehrere metabolische Parameter bestimmt. Die Messung erfolgte bei Normal- und Hochfettdiät. Bei Normaldiät wurde die Blutglukose (*ad libitum*) in der dritten Woche, die Futteraufnahme in der vierten Woche nach Virus-Injektion und Insulin zum 15 Minuten-Wert des ipGTTs 3,5 Wochen nach Virus-Injektion bestimmt. Die Messung der Parameter bei Hochfettdiät erfolgte 22 Wochen nach Virus-Injektion. Die ermittelten Parameter bei Hochfettdiät waren Blutglukose, Serum-NEFAs, Serumtriglyzeride, Leberglykogen und Lebertriglyzeride. Zusätzlich wurde Insulin zum 15 Minuten-Zeitpunkt des ipGTTs bestimmt. Die Messungen erfolgten *ad libitum* ausgenommen Insulin zum 15 Minuten-Zeitpunkt des ipGTTs. Die metabolischen Parameter der beiden Gruppen sind in Tabelle 14 dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen deutlich. Die Blutglukose sowie der Insulin-Wert beim ipGTT sind bei dem Wechsel von Normalität zu Hochfettdiät in derselben Gruppe signifikant gestiegen, als Folge der durch die Hochfettdiät induzierten Insulinresistenz.

Tabelle 14: Keine Unterschiede der metabolischen Parameter nach leberspezifischer RBP4-Überexpression. Dargestellt sind metabolische Parameter von der ND und HFD, die das Mausmodell metabolisch charakterisieren. (n=9, 11, *p<0,05 zu AAV GFP ND)

Diät	Parameter	GFP	RBP4
ND	Blutglukose, <i>ad libitum</i> (mg/dl)	147,33 ± 4,59	135,77 ± 5,75
	Insulin 15 Minuten-Wert beim ipGTT (ng/ml)	1,36 ± 0,23	1,22 ± 0,09
	Futteraufnahme 24h (g)	3,83 ± 0,10	4,10 ± 0,14
HFD	Blutglukose, <i>ad libitum</i> (mg/dl)	173,83 ± 6,20	162,36 ± 7,05 *
	Insulin 15 Minuten-Wert beim ipGTT (ng/ml)	4,51 ± 0,31	4,14 ± 0,43 *
	Serum-NEFA (mmol/l)	0,74 ± 0,06	0,72 ± 0,03
	Serumtriglyzeride (mg/dl)	84,23 ± 2,26	84,03 ± 3,06
	Leberglykogen (mg/ g)	18,05 ± 1,07	17,86 ± 1,05
	Lebertriglyzeride (mg/g)	209,62 ± 18,06	258,09 ± 30,85

3.1.9 Einfluss der leberspezifischen RBP4-Überexpression auf den Stoffwechsel und der lokomotorischen Aktivität

19 Wochen nach der Injektion von AAV GFP oder RBP4 wurden die Mäuse im Stoffwechsellkäfig LabMaster untersucht. Die Messung vom respiratorischen Quotient, vom Energieverbrauch und der Aktivität ist in Tag und Nacht unterteilt.

Die Abbildung 10 zeigt den ermittelten respiratorischen Quotient für beiden Gruppen. Die AAV GFP oder RBP4 Mäuse zeigen keinen Unterschied bezüglich des primär umgesetzten Substrates. Der sich zwischen 0,7-0,8 befindliche RQ ist mit der Hochfettdiät zu erklären, da die Tiere 60% der Kalorien aus Fetten beziehen.

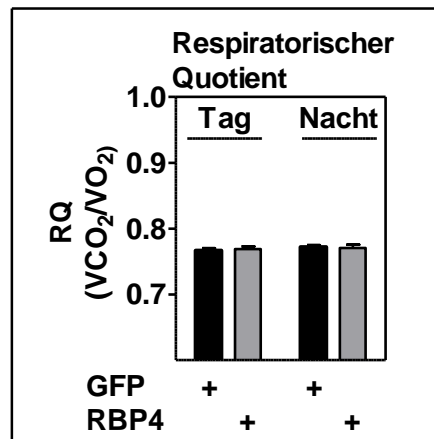


Abbildung 10: Kein Unterschied im respiratorischen Quotienten nach einer Injektion von AAV GFP oder RBP4. Dargestellt ist der respiratorische Quotient (VCO_2 -Produktion/ VO_2 -Verbrauch) für Tag und Nacht nach 19 Wochen Virus-Injektion. Die Bestimmung erfolgte im Stoffwechselkäfig LabMaster. (n=9, 11)

Der Energieverbrauch ist in Abbildung 11A dargestellt. Die Kontrollmäuse haben nachts einen höheren Energieverbrauch als am Tag. Dies wurde als interne Kontrolle für die Messung mit dem LabMaster benutzt vor dem Hintergrund der Nachtaktivität der Mäuse. Beide Gruppen verbrauchten die gleiche Menge Energie.

Zusätzlich wurde im Stoffwechselkäfig die lokomotorische Aktivität der Mäuse mittels Infrarot-Lichtschranken bestimmt. Die Abbildung 11B zeigt die lokomotorische Aktivität der Mäuse. Die Kontrollmäuse zeigen nachts eine gesteigerte Aktivität. Auch hier diente dieses Ergebnis als interne Kontrolle. Die leberspezifische RBP4-Überexpression zeigt gegenüber der Kontrollgruppe keinen Unterschied in der lokomotorischen Aktivität. Zusammenfassend lässt sich folglich sagen, dass eine leberspezifische RBP4-Überexpression keinen Einfluss auf den respiratorischen Quotienten, den Energieverbrauch und die lokomotorische Aktivität hat.

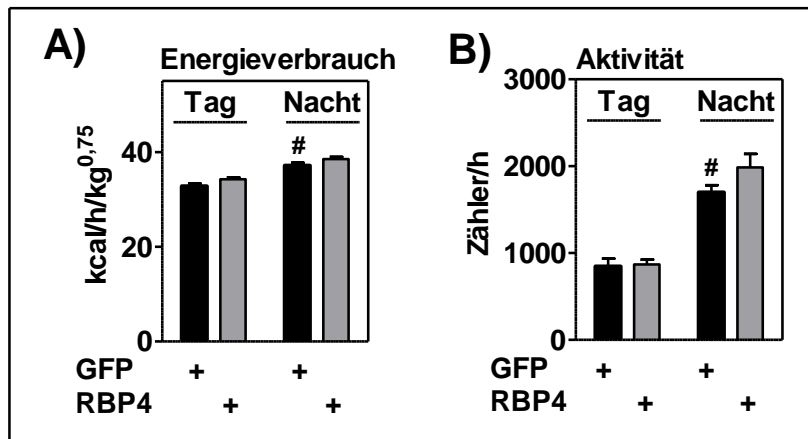


Abbildung 11: Kein Unterschied im Energieverbrauch und der lokomotorischen Aktivität nach einer Injektion von AAV GFP oder RBP4. Dargestellt ist die Messung vom Energieverbrauch (A) und der lokomotorischen Aktivität (B) für Tag und Nacht 19 Wochen nach Virus-Injektion. Die Messung erfolgte im Stoffwechsellkäfig LabMaster. (n=9, 11, #<p0,05 zu AAV GFP Tag)

3.1.10 Expression der Glukoneogenese-Gene in der Leber

Yang, Graham et al. (2005) zeigten, dass in der transgenen Maus mit einer RBP4-Überexpression im Muskel mit einer veränderten mRNA-Expression von *Pck1* in der Leber einhergeht. Es sollte nun untersucht werden, ob bei einer leberspezifischen RBP4-Überexpression ebenfalls eine veränderte mRNA-Expression vorlag. Hierfür wurde Lebergewebe der 22. Woche post infectionem mittels qRT-PCR untersucht und die mRNA-Expression von *Pck1* und Glucose-6-Phosphatase (*G6pc*) gemessen. Die Abbildung 12 zeigt die relative mRNA-Expression der beiden Gene. Eine RBP4 Überexpression über 22 Wochen führt nicht zu einer Regulation der Glukoneogenese -Gene *Pck1* und *G6pc*.

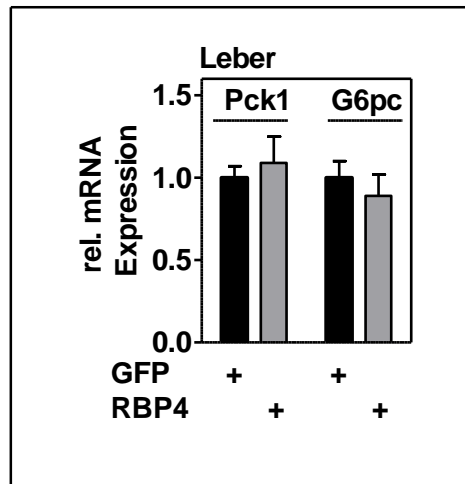


Abbildung 12: Keine Induktion der *Pck1*- und *G6pc*-Genexpression durch eine hepatische Überexpression von RBP4. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Pck1* und *G6pc* in der Leber 22 Wochen nach Injektion von AAV GFP oder RBP4. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. (n=9, 11)

3.2 Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Reduktion von RBP4

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein neues Tiermodell mit einer leberspezifischen Reduktion von RBP4 metabolisch charakterisiert werden. Hierfür erhielten sechs Wochen alte C57BL/6J Mäuse für acht Wochen eine Hochfettdiät. Diese führt zu Adipositas und einer Diät-induzierten Insulinresistenz (Surwit, Kuhn et al. 1988, Williams, Campbell et al. 2014). In der Literatur ist ein erhöhter RBP4-Serumspiegel bei Mäusen mit Adipositas und Insulinresistenz beschrieben (Yang, Graham et al. 2005). Daran anknüpfend sollte nun in den Mäusen mit einem erhöhten RBP4-Serumspiegel eine leberspezifische RBP4-Depletion erfolgen und der metabolische Phänotyp nach RBP4-Depletion charakterisiert werden.

3.2.1 Depletion von RBP4 in der Leber

Die Depletion von RBP4 in der Leber erfolgte über Adeno-assoziierte Viren mit einem leberspezifischen Promotor. Das Virus exprimierte entweder eine Kontroll-miRNA oder eine RBP4-miRNA. Für die Validation der RBP4-Depletion in der Leber wurde die hepatische mRNA-Expression 13 Wochen nach AAV-Injektion bestimmt. Es konnte eine ca. 40%ige Reduktion der hepatischen mRNA-Expression von *Rbp4* im Vergleich zu den Kontrollmäusen erreicht werden (Abbildung 13).

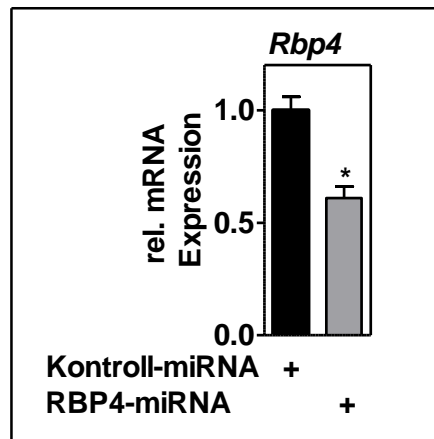


Abbildung 13: Depletion von RBP4 in der Leber durch Injektion von AAV RBP4-miRNA. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Rbp4* in der Leber 13 Wochen nach Virus-Injektion. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. (n=9,5, *p<0,05 zu AAV Kontroll-miRNA)

3.2.2 Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf den RBP4-Serumspiegel

Das im Serum vorliegende RBP4 wird in den Hepatozyten synthetisiert (Thompson, Sargsyan et al. 2017). Eine verminderte hepatische *Rbp4* mRNA-Expression könnte sich somit auch auf den RBP4-Serumspiegel auswirken. Um dies zu untersuchen wurden die Proteine im Serum auf RBP4 analysiert. Dabei wurden Serumproben der 13. Woche nach Virus-Injektion für die Analyse verwendet. ACRP30 diente als Ladekontrolle. Pro Gruppe werden repräsentativ vier Tiere gezeigt. Die RBP4-miRNA-Mäuse enthalten weniger RBP4 im Serum (Abbildung 14). Folglich führt eine reduzierte *Rbp4* mRNA-Expression in der Leber zu einem verminderten RBP4-Serumspiegel.

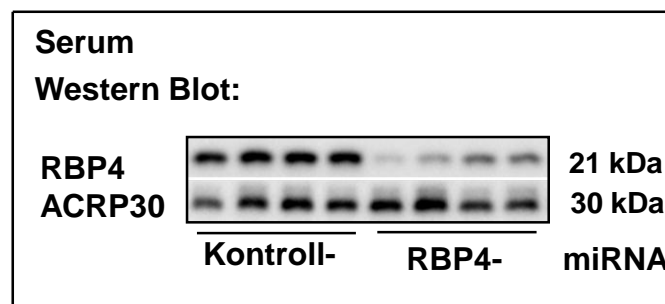


Abbildung 14: Verminderter RBP4-Serumspiegel nach Injektion von AAV RBP4-miRNA. Dargestellt ist der Western Blot des Proteins RBP4 im Serum 13 Wochen nach Virusinjektion. Adiponektin diente als Ladekontrolle.

3.2.3 Einfluss der RBP4-Depletion in der Leber auf Retinol im Serum

RBP4 wird als Komplex mit Retinol aus der Leber sezerniert (Ronne, Ocklind et al. 1983). Somit könnte ein vermindertes RBP4-Serumspiegel, verursacht durch eine leberspezifische RBP4-Depletion, zu einer veränderten Retinol-Konzentration führen. Die Messung von Retinol im Serum erfolgte mittels HPLC. Hierfür wurde Serum von der 13. Woche nach Virus-

Injektion verwendet. In Abbildung 15 ist die Retinol-Konzentration dargestellt. Die RBP4-miRNA-Mäuse weisen im Vergleich zu den Kontroll-miRNA-Mäusen reduzierte Retinol-Konzentrationen im Serum auf, die Depletion von RBP4 in der Leber führt zu einer ca. 48%igen Reduktion von Retinol im Serum.

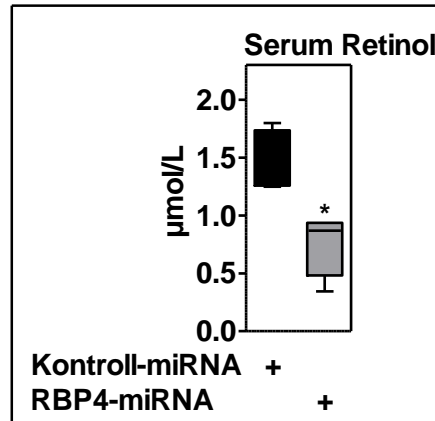


Abbildung 15: Reduzierte Retinol-Konzentration im Serum nach einer leberspezifischen RBP4-Depletion. Dargestellt ist Die Messung von Retinol mittels HPLC im Serum 13 Wochen nach Virus-Injektion. (n= 9, 5, *p<0,05 zur Kontroll-miRNA)

3.2.4 Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf die Retinoide in der Leber

In Bedarfszuständen erfolgt eine Mobilisation von hepatischen Retinoiden durch RBP4 (Quadro, Hamberger et al. 2003). Dies lässt vermuten, dass eine verminderte Retinol-Mobilisation durch eine reduzierte RBP4-Expression in der Leber zu einem dortigen Anstieg von Retinoiden führt. Die Messung der Retinoide in der Mausleber erfolgte mittels HPLC 13 Wochen nach Virus-Injektion. Es wurde festgestellt, dass eine verminderte Retinol-Mobilisation über RBP4 zu einem signifikanten Anstieg der Retinylester führt (Abbildung 16). Alle drei Hauptformen der Retinylester (Retinyleoleat, -palmitat, -stearat) der Leber waren erhöht. Retinol blieb hingegen unverändert (Abbildung 16). Es konnte so gezeigt werden, dass Retinylester in der Leber in Folge einer verminderten RBP4-assoziierten Retinol-Mobilisierung akkumulieren.

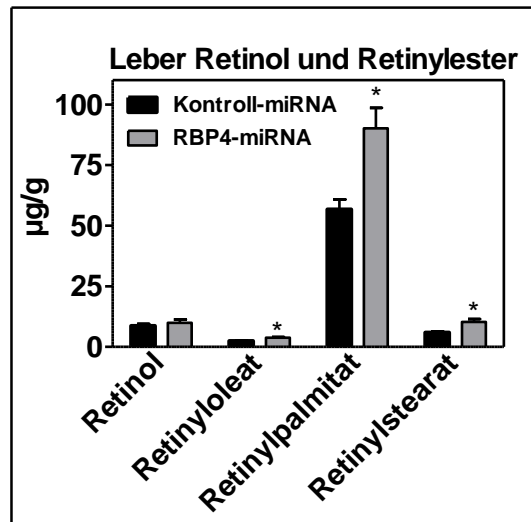


Abbildung 16: Erhöhte Retinylester-Konzentration und unveränderte Retinol-Konzentration in der Leber nach einer hepatischen RBP4-Depletion. Dargestellt ist die Messung der Retinoide mittels HPLC in der Leber 13 Wochen nach Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA. (n= 9,5, *p<0,05 zur Kontroll-miRNA)

3.2.5 Verlauf des Körpergewichtes

Nach der Virus-Injektion wurde das Körpergewicht wöchentlich mit einer Waage bestimmt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Mäuse mit einer leberspezifischen RBP4-Depletion weisen einen Trend zu einer geringeren Gewichtszunahme gegenüber der Kontrollgruppe auf (Abbildung 17). Das Körpergewicht wird nicht signifikant durch die Depletion von RBP4 in der Leber beeinflusst.

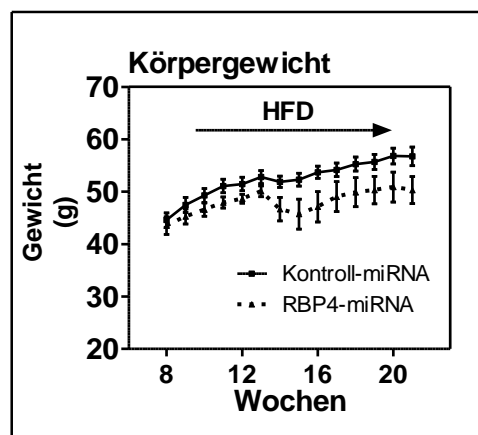


Abbildung 17: Kein Effekt der hepatischen RBP4-Depletion auf das Körpergewicht. Dargestellt ist der Verlauf des Körpergewichtes über einen Gesamtzeitraum von 13 Wochen nach Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA. (n=9,5)

3.2.6 Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf die Glukosetoleranz

Als nächstes wurde die Insulinsensitivität der Mäuse mit Hilfe eines ipGTTs untersucht. In der Literatur ist beschrieben, dass die RBP4-Knockout Maus eine verbesserte Insulinsensitivität zeigt (Yang, Graham et al. 2005). Es sollte hier untersucht werden, ob eine leberspezifische Depletion von RBP4 denselben Effekt nach sich zieht. Der ipGTT wurde in der fünften Woche nach der Virus-Injektion durchgeführt. Die Glukosekurven sind für die jeweilige Gruppe in Abbildung 18A dargestellt. Die RBP4-miRNA-Gruppe zeigt eine verbesserte Glukosetoleranz gegenüber der Kontroll-miRNA-Gruppe. Es wurde zusätzlich die Fläche unter den Kurven für beide Gruppen berechnet. Diese zeigt eine ca. 30%ige Verbesserung der Insulinsensitivität gegenüber den Kontrollmäusen (siehe Abbildung 18B).

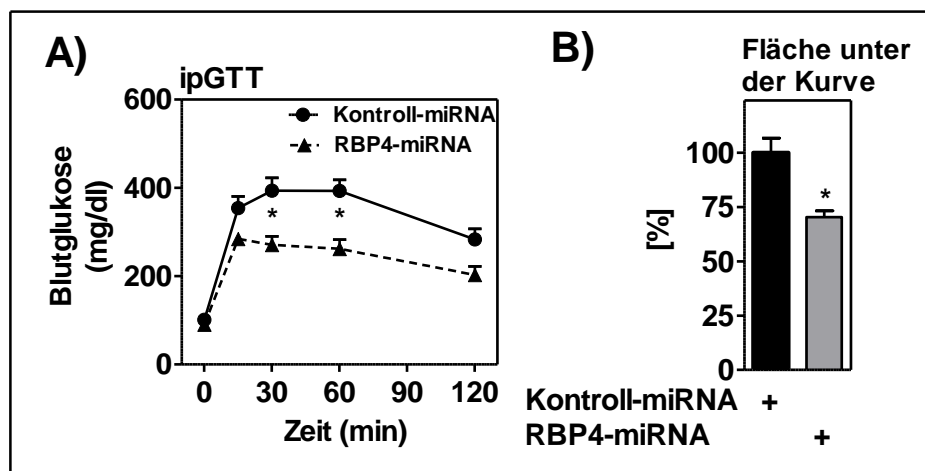


Abbildung 18: Verbesserte Glukosetoleranz nach RBP4-Depletion in Leber. Dargestellt ist der Verlauf des intraperitonealen Glukosetoleranztests 5 Wochen nach Virus-Injektion von AAV Kontroll- und RBP4-miRNA. Die Mäuse erhielten nach einer 16-stündigen Nüchternphase 0,5g/kg Körpergewicht Glukose i.p. injiziert. Es ist die Glukoseverlaufkurve (A) und die Fläche unter der Glukosekurve (B) dargestellt. (n= 9, 5, *p<0,05 zur Kontroll-miRNA)

3.2.7 Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf die Inflammation im Fettgewebe

In der RBP4-Knockout Maus konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Inflammation im gonadalen Fettgewebe die Ursache der verbesserten Glukosetoleranz sein könnte (Moraes-Vieira, Castoldi et al. 2016). Bei einer hepatischen RBP4-Depletion zeigen die Mäuse eine verbesserte Glukosetoleranz. Es wurden bekannte Zielgene für die Gesamt-Makrophagen, M1 Makrophagen, M2 Makrophagen und T-Zellen mittels qRT-PCR im gonadalem Fettgewebe gemessen. Für die Gesamt-Makrophagen waren die Zielgene *Cd68* und *F4/80*, für die M1 Makrophagen Tumornekrosefaktor (*Tnf*) sowie *Monocyte chemotactic protein 1* (*Mcp-1*) und für die M2 Makrophagen waren es *Chitinase-like 3* (*Chi3l3*), *Arginase 1* (*Arg1*) sowie *Cd206* und für die T-Zellen *Cd3*. Die relative mRNA-Expression vom gonadalen Fettgewebe ist in Abbildung 19 dargestellt. Es konnte weder für die Gesamt-Makrophagen,

noch für die M1 Makrophagen, die M2 Makrophagen und die T-Zellen ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der mRNA-Expression im gonadalen Fettgewebe festgestellt werden. Bei Mäusen mit einer leberspezifischen RBP4-Depletion durch AAV RBP4-miRNA konnte keine verminderte Inflammation im gonadalen Fettgewebe als Ursache für die verbesserte Glukosetoleranz nachgewiesen werden.

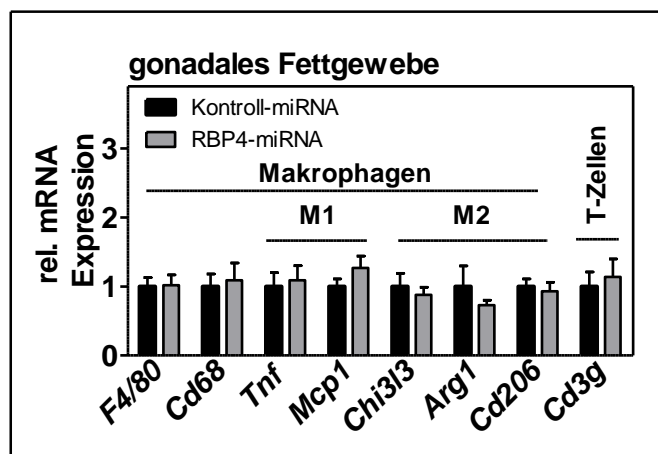


Abbildung 19: Kein Unterschied in den Zielgenen für die Gesamt-Makrophagen, M1 und M2 Makrophagen und T-Zellen im gonadalen Fettgewebe nach einer RBP4-Depletion in der Leber. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von Zielgenen der Gesamt-Makrophagen, M1 Makrophagen, M2 Makrophagen und T-Zellen im gonadalen Fettgewebe 13 Wochen nach Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. (n=9, 5)

3.2.8 Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf metabolische Parameter

Im Verlauf der Charakterisierung wurden verschiedene Parameter bestimmt, die folgenden Messungen erfolgten *ad libitum* und in der 13. Woche nach Virus-Injektion: Blutglukose, Insulin, Serum-NEFA, Serumtriglyzeride, Leberglykogen und Lebertriglyzeride. Es wurde Insulin zum 15 Minuten-Zeitpunkt des ipGTTs in der fünften Woche bestimmt. Die Futteraufnahme wurde im Stoffwechsellkäfig LabMaster in der sechsten Woche gemessen. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Messungen dargestellt. Insulin war, in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der verbesserten Glukosetoleranz, bei einer leberspezifischen RBP4-Depletion reduziert. Die Mäuse mit einer RBP4-Depletion in der Leber nahmen mehr Futter zu sich als die Kontrollgruppe. Bei allen anderen Parametern war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen.

Tabelle 15: Reduzierte Insulin-Konzentration (*ad libitum*) und erhöhte Futteraufnahme nach einer RBP4-Depletion in der Leber. Dargestellt sind metabolische Parameter, die das Mausmodell metabolisch charakterisieren. (n=9, 5, *p<0,05 zu AAV Kontroll-miRNA)

Parameter	Kontroll-miRNA	RBP4-miRNA
Blutglukose, <i>ad libitum</i> (mg/dl)	145,72 ± 9,39	132,70 ± 3,38
Insulin 15 Minuten Wert beim ipGTT (ng/ml)	5,54 ± 0,55	4,64 ± 0,87
Insulin, <i>ad libitum</i> (ng/ml)	25,18 ± 3,16	12,30 ± 3,10*
Serum-NEFA (mmol/l)	0,80 ± 0,05	0,85 ± 0,05
Serumtriglyzeride (mg/dl)	113,14 ± 6,89	94,05 ± 8,20
Leberglykogen (mg/g)	15,04 ± 0,88	19,58 ± 2,47
Lebertriglyzeride (mg/g)	163,53 ± 9,35	115,78 ± 25,33
Futteraufnahme 24h (g)	2,63 ± 0,20	4,02 ± 0,47*

3.2.9 Einfluss einer hepatischen RBP4-Depletion auf den Energiestoffwechsel und der lokomotorischen Aktivität

Der Stoffwechsel der Mäuse sollte in der sechsten Woche nach Virus-Injektion charakterisiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Stoffwechselkäfigs LabMaster. Alle Kennwerte wurden in eine Tag- und Nacht-Phase unterteilt, die dem Lichtregime (12 Stunden Rhythmus) der Tierhaltung entspricht.

Um Hinweise auf das primär verstoffwechselte Substrat zu erhalten wurde der respiratorische Quotient bestimmt, für beide Gruppen dargestellt in Abbildung 20. Es konnte kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, der ermittelte RQ weist jeweils auf eine primäre Verstoffwechslung von Fett hin. Dies war aufgrund der gefütterten Hochfettdiät, die 60% der Kalorien aus Fett liefert, zu erwarten.

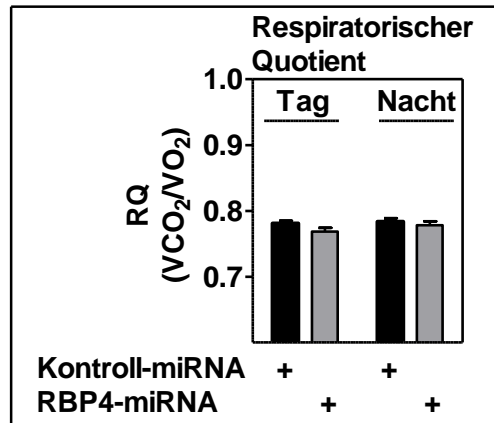


Abbildung 20: Kein Unterschied im respiratorischen Quotienten nach einer leberspezifischen RBP4-Depletion. Dargestellt ist der respiratorische Quotient (CO_2 -Produktion/ O_2 -Verbrauch) für Tag und Nacht 6 Wochen nach Virus-Injektion. Die Messung erfolgte im Stoffwechsellkäfig LabMaster. (n=9, 5)

Die Abbildung 21A zeigt den Energieverbrauch für den Tag und die Nacht, die hepatische RBP4-Depletion führt hier jeweils zu einem erhöhten Energieverbrauch.

Die lokomotorische Aktivität wurde mit Hilfe von Lasersensoren bestimmt. Die lokomotorische Aktivität ist in Abbildung 21B dargestellt. Die Mäuse mit einer leberspezifischen Reduktion von RBP4 zeigen eine erhöhte lokomotorische Aktivität am Tag und in der Nacht. Somit haben die Mäuse mit einer hepatischen RBP4-Depletion eine erhöhte lokomotorische Aktivität begleitet von einem erhöhten Energieverbrauch.

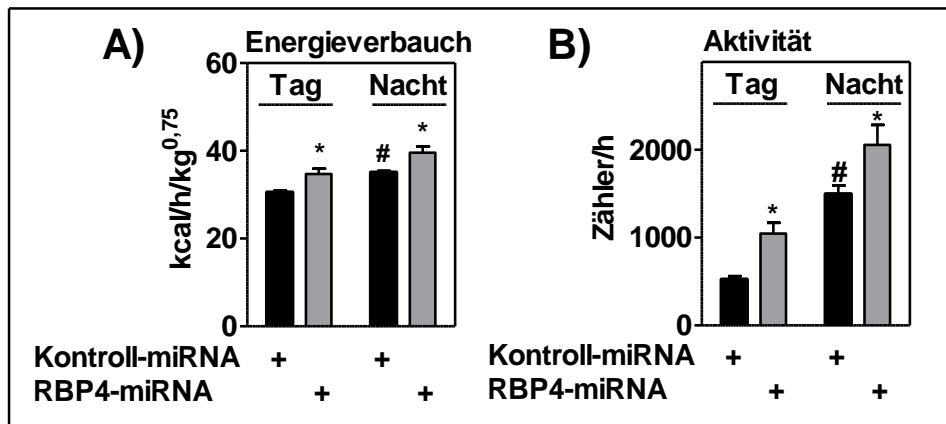


Abbildung 21: Erhöhter Energieverbrauch und erhöhte lokomotorische Aktivität nach Injektion von AAV RBP4-miRNA. Dargestellt ist die Messung vom Energieverbrauch (A) und der lokomotorischen Aktivität (B) für Tag und Nacht 6 Wochen nach Virus-Injektion. Die Messung erfolgte im Stoffwechselkäfig LabMaster. (n=9, 5, *p<0,05 zu AAV Kontroll-miRNA)

3.2.10 Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf die Glukoneogenese-Gene *Pck1* und *G6pc*

Eine Reduktion von RBP4 in der Leber mittels Adenoviren führte laut Ma, Zhou et al. (2016) zu einer verminderten Expression von *Pck1* in der Leber. Ausgehend von dieser Studie sollten in den Mäusen mit einer leberspezifischen RBP4-Depletion die mRNA-Expression von *Pck1* und *G6pc* in der Leber gemessen werden. Dafür wurde die Leber 13 Wochen nach der Virus-Injektion mittels qRT-PCR untersucht. In Abbildung 22 ist die relative mRNA-Expression von *Pck1* und *G6pc* in der Leber dargestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen RBP4 miRNA- und Kontroll-miRNA-Mäusen gefunden werden.

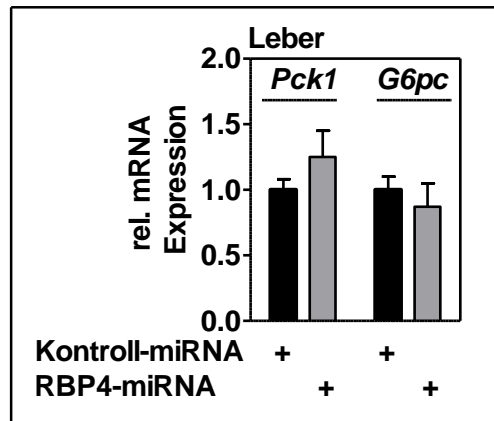


Abbildung 22: Keine Reduktion von *Pck1*- und *G6pc*-Genexpression durch eine hepatische Depletion von RBP4. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Pck1* und *G6pc* in der Leber 13 Wochen nach Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. (n=9, 5)

3.2.11 Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf Transthyretin (TTR)

3.2.11.1 TTR im Serum

Im Blut liegt RBP4 als Komplex mit TTR vor. Dieser Komplex schützt RBP4 vor der glomerulären Filtration (Naylor and Newcomer 1999). Ob die Interaktion einem weiteren Zweck dient ist bisher nicht bekannt. Es sollte untersucht werden, ob die leberspezifische RBP4-Depletion eine Auswirkung auf TTR im Serum hat. Die Analyse von TTR im Serum erfolgte mittels Western Blot. Dieser wurde mit Serum der 13. Woche nach Virus-Injektion durchgeführt. Die Abbildung 23 zeigt TTR und RBP4 im Serum. Adiponektin diene als Ladekontrolle. Pro Gruppe werden repräsentativ fünf Tiere gezeigt. Die RBP4-miRNA-Mäuse haben im Vergleich zu den Kontroll-miRNA-Mäusen sowohl einen verminderten RBP4- als auch einen verminderten TTR-Spiegel im Serum.

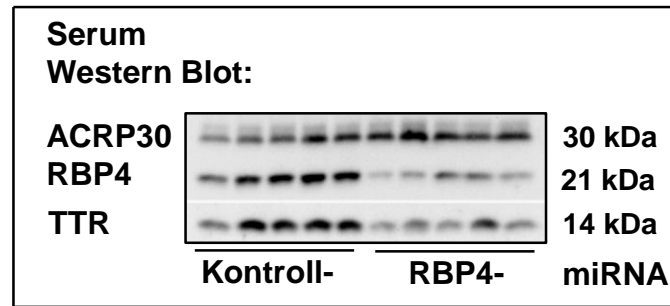


Abbildung 23: Die leberspezifische RBP4-Depletion führt zu einem verminderten RBP4- und TTR-Spiegel im Serum nach Injektion von AAV RBP4-miRNA. Dargestellt ist der Western Blot des Proteins RBP4 und TTR im Serum 13 Wochen nach Virus-Injektion. Adiponektin diente als Ladekontrolle.

3.2.11.2 mRNA-Expression von *Ttr* in der Leber

Ein verminderter TTR-Spiegel im Serum könnte die Folge einer reduzierten *Ttr* mRNA-Expression in der Leber sein. Um dies zu untersuchen wurde die *Ttr* mRNA-Expression der Leber mittels qRT-PCR gemessen. Die Abbildung 24 zeigt die relative mRNA-Expression von *Ttr* in der Leber. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Die mRNA-Expression von *Ttr* ist somit nicht Ursache des verminderten TTR-Spiegels im Serum.

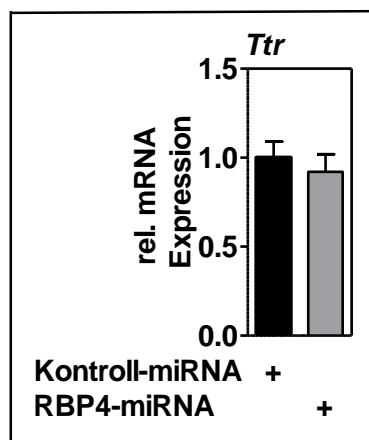


Abbildung 24: Keine Reduktion der mRNA-Expression von *Ttr* durch eine hepatische Depletion von RBP4. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Ttr* in der Leber 13 Wochen nach Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA. Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. (n=9, 5)

3.2.11.3 TTR Protein in der Leber

Die *Ttr* mRNA-Expression war in den RBP4-miRNA-Mäusen unverändert. Um die Ursache für den reduzierten TTR-Spiegel im Serum zu ergründen wurde als nächstes die Proteinexpression von TTR in der Leber untersucht. Die Analyse der Proteinexpression von RBP4 und TTR in der Leber erfolgte mittels Western Blot. Es ist zu beachten, dass der TTR-Tetramer-Komplex sehr stabil ist (Gaetani, Bellovino et al. 2002). Als Monomer liegt TTR im

Western Blot nur vorwiegend vor, wenn es vollständig denaturiert wurde. Findet keine vollständige Denaturierung statt, dann finden sich nur 2-3% von TTR als Monomere im Western Blot, der Rest als Dimere oder Tetramere (Henze, Homann et al. 2015). Diese Form wird als semi-nativer Western Blot bezeichnet. Der Western Blot für TTR wurde in der vorliegenden Arbeit als semi-nativer Western Blot durchgeführt. Im Western Blot diente GAPDH als Ladekontrolle und Serum diente als Positivkontrolle für TTR. Pro Gruppe werden repräsentativ fünf Tiere gezeigt. Die Proteinexpression ist in Abbildung 25 dargestellt. Wie erwartet ist die Proteinexpression von RBP4 in den RBP4-depletierten Mäusen vermindert. In der Leber sind sehr viele verschiedene und nicht ganz klar zuzuordnende Bande für TTR vorzufinden. Die Analyse der Banden in der Leber, die mit Banden im Serum übereinstimmen, zeigen das TTR nach einer leberspezifischen RBP4-Depletion im Bereich der Monomere keine Unterschiede aufweist, jedoch sind in Folge der Injektion von AAV RBP4-miRNA vermindert Dimere von TTR in der Leber vorhanden.

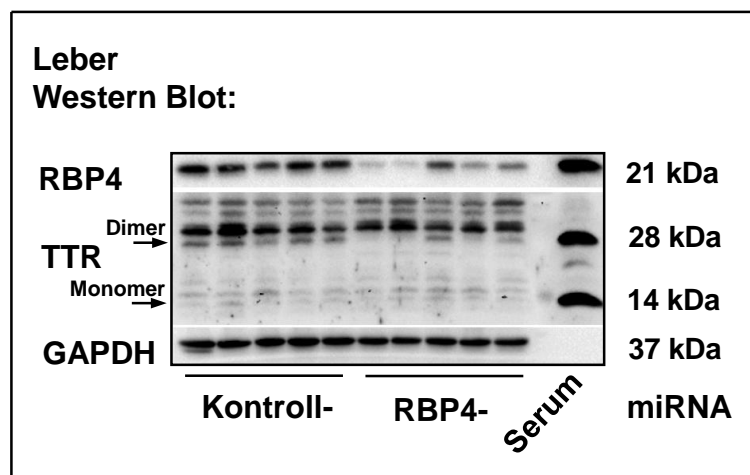


Abbildung 25: Verminderte Proteinexpression von RBP4 und verminderte Dimermenge von TTR in der Leber nach RBP4-Depletion in der Leber. Dargestellt ist der Western Blot der Proteine RBP4 und TTR 13 Wochen nach Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA. Serum diente als Kontrolle für TTR und GAPDH diente als Ladekontrolle

3.2.12 Einfluss der hepatischen RBP4-Depletion auf Gesamt-T₄ und Gesamt-T₃ im Serum

Transthyretin bildet nicht nur einen Komplex mit RBP4 (Liz, Mar et al. 2010) sondern ist in Mäusen auch das Haupttransportprotein für Schilddrüsenhormone (Vranckx, Savu et al. 1990). Die hepatische RBP4-Reduktion führt zu einem verminderten TTR-Spiegel im Serum. In der nachfolgenden Messung sollte untersucht werden, ob die oben genannten Effekte Auswirkungen auf die Konzentration von Gesamt-T₄ und Gesamt-T₃ im Serum haben. Die Analyse erfolgte im Serum der 13. Woche post infectionem mit einem RIA Kit. Die Abbildung

26A stellt die Serumkonzentration von Gesamt-T₄ und Abbildung 26B von Gesamt-T₃ dar. Die Gesamt-T₄ Konzentration im Serum ergab keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die hepatische RBP4-Depletion führte jedoch zu einer 15%igen Reduktion des Gesamt-T₃ Serumspiegels.

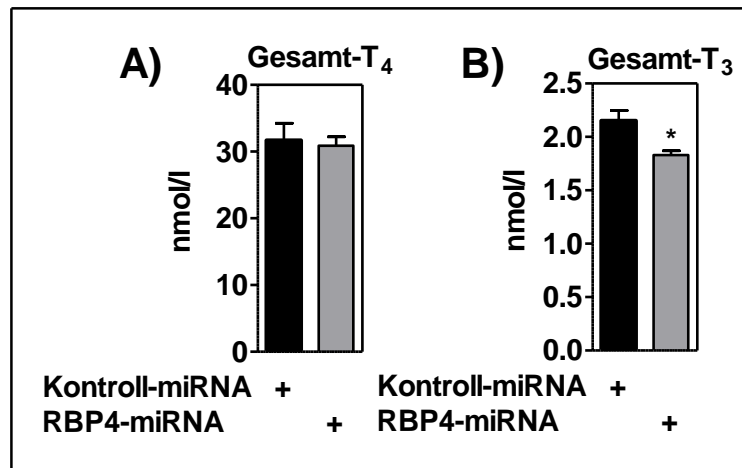


Abbildung 26: Verminderter Gesamt-T₃-Serumspiegel und unveränderter Gesamt-T₄-Serumspiegel nach RBP4-Depletion in der Leber. Dargestellt ist die Messung von Gesamt-T₄ (A) und Gesamt-T₃ (B) im Serum. (n=9, 5, *p<0,05 zu AAV Kontroll-miRNA)

4 Diskussion

4.1 Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Überexpression von RBP4

4.1.1 Leberspezifische RBP4-Überexpression in C57BL/6J-Mäusen

In dieser Arbeit wurde ein neues Mausmodell mit einer leberspezifischen RBP4-Überexpression durch Adeno-assoziierte Viren charakterisiert. Für die Leberspezifität wurde ein leberspezifischer Promotor verwendet (Nathwani, Gray et al. 2006). Die Leberspezifität konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 3). Dieses neue Mausmodell sollte genutzt werden, um die Rolle von leberspezifischen RBP4 im Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel zu analysieren.

Es konnte hier gezeigt werden, dass eine RBP4-Überexpression in der Leber durch AAV RBP4 zu einem 3,5-fachen Anstieg der mRNA-Expression führt (siehe Abbildung 4). Der RBP4-Spiegel und die Retinol-Konzentration im Serum stiegen in Folge der Injektion von AAV RBP4 an (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6). Dies lässt annehmen, dass die RBP4-Überexpression zu einer gesteigerten Sekretion von RBP4 aus Leber führt und dabei Retinol aus der Leber mobilisiert. Ähnliche Beobachtungen konnte Muenzner, Tuvia et al. (2013) machen, wo eine RBP4-Überexpression in Mäusen mittels Adenoviren induziert wurde.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Retinoide in der Leber bei einer hepatischen RBP4-Überexpression auch 22 Wochen nach der Virus-Injektion unverändert sind (siehe Abbildung 7). Das von Muenzner, Tuvia et al. (2013) untersuchte Mausmodell mit einer RBP4-Überexpression mittels Adenoviren wies hingegen eine Abnahme von Retinylpalmitat, Retinylstearat und Retinyloleat in der Leber auf. Diese Abnahme wird erklärt durch eine gesteigerte Mobilisation von Retinol durch die RBP4-Überexpression. Eine gesteigerte Mobilisation von Retinol durch RBP4 lag auch im hier untersuchten Mausmodell vor, jedoch unterschied sich der Zeitpunkt der Retinoid-Messung in der Leber, welche sieben Tage nach Adenovirus-Injektion und 22 Wochen nach AAV-Injektion erfolgte. Dieser zeitliche Unterschied könnte Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse sein. In den Mäusen mit einer leberspezifischen RBP4-Überexpression durch AAV-Injektion könnte ein Mechanismus zur Kompensation eingesetzt haben, der bei einer akuten RBP4-Überexpression mittels Adenoviren noch nicht aufgetreten ist. Es würde sich nun eine Bestimmung der Retinoide in anderen Geweben anbieten, um eine Mobilisierung von Retinoiden aus anderen Geweben zur Leber hin zu bestimmen. Dies wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Jedoch wurde in diesem Zusammenhang die Futteraufnahme betrachtet, da Retinoide über die Nahrung aufgenommen werden und in Form von in Chylomikronen inkorporierten Retinylestern vor

allem zur Leber transportiert, dort gespeichert und in Bedarfszuständen wieder mobilisiert werden (Blomhoff, Helgerud et al. 1982). Eine erhöhte Retinol-Mobilisation durch eine RBP4-Überexpression in der Leber könnte so zu einer erhöhten Futterraufnahme führen, um die Retinoid-Homöostase in der Leber aufrechtzuerhalten. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Futterraufnahme bei einer leberspezifischen Überexpression von RBP4 durch AAV RBP4 nicht verändert ist. Ein Recycling von Retinol aus dem Serum zur Leber könnte ebenfalls eine Ursache der unveränderten Retinoide in der Leber sein. Retinol aus dem Blut wird durch die Leber recycelt bevor es degradiert oder metabolisiert wird (Lewis, Green et al. 1990). Es ist hier anzumerken, dass die Retinoid-Konzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen wurde und nicht das dynamische Geschehen der Retinoide dargestellt wird.

4.1.2 Einfluss auf die lokomotorische Aktivität und den Energiestoffwechsel

In der Literatur sind keine Studien beschrieben, welche die lokomotorische Aktivität und den Energiestoffwechsel von Mäusen mit einer Überexpression von RBP4 untersuchen. Eine leberspezifische RBP4-Überexpression zeigte keinen Unterschied in der lokomotorischen Aktivität und im Energieverbrauch (siehe Abbildung 11). Ebenfalls konnte zwischen den Gruppen kein Unterschied im Gewichtsverlauf festgestellt werden (siehe Abbildung 8). Eine Konstanz des Gewichtes bei einer Überexpression von RBP4 konnte auch durch Moraes-Vieira, Castoldi et al. (2016) gezeigt werden.

4.1.3 RBP4-Überexpression und Glukosetoleranz

Die Glukosetoleranz wurde von Mäusen welche mit Normaldiät und Hochfettdiät gefüttert wurden bestimmt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Glukosetoleranz unabhängig von der Diät bei einer leberspezifischen RBP4-Überexpression nicht verändert war (siehe Abbildung 9). Bisher wurde die Glukosetoleranz noch nicht in Mäusen mit einer leberspezifischen Überexpression von RBP4 untersucht. Diese Daten passen zu Untersuchungen von Du, Otolara et al. (2015), welche die Insulinsensitivität in einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression von menschlichen RBP4 durch den Muskel bestimmten und keinen Unterschied der Insulinsensitivität fanden. Hingegen zeigten Yang, Graham et al. (2005) im gleichen transgenen Mausmodell, dass die Überexpression von menschlichen RBP4 durch den Muskel zu einer verschlechterten Insulinsensitivität führt. Zudem wiesen Lee, Yuen et al. (2016) eine verschlechterte Glukosetoleranz in einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression von menschlichen RBP4 aus Adipozyten nach. In diesem Modell war jedoch kein humanes RBP4 im Serum zu finden bzw. keine Erhöhung von RBP4 im Serum nachweisbar. Es sollte beachtet werden, dass in der vorliegenden Studie die Effekte von RBP4 aus der Leber und von der Maus untersucht wurden. Dies ist eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse zu Yang, Graham et al. (2005) und Lee, Yuen et al. (2016), da murines RBP4 aus der Leber eine

andere Wirkung auf den Glukosestoffwechsel haben könnte. Weiterhin ist nicht abschließend geklärt, ob ein erhöhter RBP4-Spiegel im Serum zur Insulinresistenz führt. In der Literatur sind einige Studien zu finden, die zeigen, dass RBP4 im Serum bei Adipositas und Typ 2 Diabetes erhöht ist. Hingegen kommen in der Literatur andere Studien zu dem Ergebnis, dass es keinen Zusammenhang von RBP4 mit Adipositas und Typ 2 Diabetes gibt (Fedders, Muenzner et al. 2015).

4.1.4 Einfluss der hepatischen RBP4-Überexpression auf den Glukose- und Fettstoffwechsel

Für die Charakterisierung des Fettstoffwechsels bei einer leberspezifischen RBP4-Überexpression wurden folgende Parameter bestimmt: Triglyzerid-Gehalt in Leber und Serum und freie, nicht veresterte Fettsäuren im Serum. Die leberspezifische RBP4-Überexpression vermittelte keine Veränderung der genannten Parameter (siehe Tabelle 14). Der Phänotyp für die Triglyzeride und freie, nicht veresterte Fettsäuren im Serum wurde auch durch Moraes-Vieira, Yore et al. (2014) beschrieben, die transgene Mäuse mit einer Überexpression von humanen RBP4 aus dem Muskel untersuchten. Lee, Yuen et al. (2016) analysierten nüchterne transgene Mäuse mit einer Überexpression von humanen RBP4 aus Adipozyten, welche jedoch keine Erhöhung von RBP4 im Serum aufwiesen. Sie zeigten erhöhte freie, veresterte Fettsäuren im Serum sowie vermehrt Triglyzeride in der Leber, jedoch keine Veränderung der Triglyzeride im Serum. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch einen anderen Ort der Überexpression, abweichende RBP4-Spiegel im Blut oder Fütterungszustände erklärt werden.

In dem Mausmodell mit einer leberspezifischen RBP4-Überexpression wurde außerdem Glykogen in Leber sowie Glukose im Blut charakterisiert. Die Parameter des Glukosestoffwechsels waren bei einer leberspezifischen RBP4-Überexpression unverändert (siehe Tabelle 14). Die unveränderte Blutglukose wurde auch durch Yang, Graham et al. (2005) beschrieben. Zum Einfluss von RBP4 auf Glykogen gibt es gegenwärtig keine anderen *in vivo* Daten in der Literatur.

4.1.5 Leberspezifische RBP4-Überexpression und Glukoneogenese-Genexpression in der Leber

Yang, Graham et al. (2005) zeigten, dass eine Injektion des rekombinanten humanen Retinol-RBP4-Komplexes bei Mäusen zu einer erhöhten *Pck1* mRNA-Expression in der Leber führte. *Pck1* sowie *G6pc* sind Schlüsselenzyme der Glukoneogenese (Postic, Dentin et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte keine veränderte *Pck1* oder *G6pc* mRNA-Expression bei einer leberspezifischen Überexpression von RBP4 beobachtet werden (siehe Abbildung 12). Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse ist möglicherweise das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mausmodell, welches eine erhöhte murine RBP4-

Mobilisierung aus der Leber heraus aufweist. Eine Injektion vom Retinol-RBP4-Komplex in Mäusen könnte zu einem erhöhten Transport von Retinol zur Leber führen. Dieses kann vom Retinol-RBP4-Komplex durch den RBP4-Membranrezeptor (Stra6l) in die Leber aufgenommen werden, wo es weiter zu Retinsäure oxidiert wird (Fedders, Muenzner et al. 2015). Es ist bekannt, dass die Expression von *Pck1* durch Retinsäure induziert werden kann (Shin, Odom et al. 2002). Weiterhin ist zu erwähnen, dass der Phänotyp bei nüchternen Mäusen beobachtet wurde, die hier untersuchten Mäuse jedoch Zugang zu Futter hatten. Des Weiteren war der Hintergrund der Mäuse nicht wie in dieser Studie C57BL/6J sondern FBV (Yang, Graham et al. 2005).

4.2 Metabolische Charakterisierung einer C57BL/6J-Maus mit einer leberspezifischen Depletion von RBP4

4.2.1 Leberspezifische Depletion von RBP4

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde ein Mausmodell mit einer leberspezifischen RBP4-Depletion auf einer Hochfettdiät für sechs Wochen auf die AAV-Injektion folgend charakterisiert. Dieses neue Mausmodell sollte neue Erkenntnisse bringen, wie leberspezifisches RBP4 mit dem Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel interagiert. Außerdem sollten neue Einblicke in die Interaktion von TTR mit leberspezifischen RBP4 erlangt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine leberspezifische RBP4-Depletion durch AAV-Injektion zu einer ca. 40%igen Reduktion der mRNA-Expression in der Leber führt (siehe Abbildung 13). Weiterhin wurde festgestellt, dass die reduzierte mRNA-Expression von RBP4 reduzierte RBP4-Spiegel und Retinol-Konzentrationen im Serum zur Folge hat (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Es ist anzunehmen, dass eine Reduktion der hepatischen Expression von RBP4 zu einer verminderten Sekretion vom Retinol-RBP4-Komplexen führt. Diese Daten passen zu Untersuchung an der RBP4-Knockout Maus, in welcher kein RBP4 im Serum vorhanden und ebenfalls die Retinol-Konzentration im Serum stark vermindert war (Quadro, Blaner et al. 1999). Thompson, Sargsyan et al. (2017) konnten bei der leberspezifischen RBP4-Knockout Maus kein RBP4 im Serum nachweisen, Retinol im Serum war reduziert. Weiterhin konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass eine Reduktion der RBP4-Genexpression vorwiegend in der Leber und im Fettgewebe (Tan, Sun et al. 2011) oder nur in der Leber zu einem reduzierten RBP4-Serumspiegels führte (Ma, Zhou et al. 2016).

Weiterhin ergab die vorliegende Arbeit, dass die Retinol-Konzentration in der Leber bei beiden Gruppen unverändert ist, jedoch bei einer leberspezifischen RBP4-Depletion die Retinylester in der Leber akkumulieren (siehe Abbildung 16). Diese Beobachtung passt zu

den verminderten RBP4-Spiegeln und Retinol-Konzentrationen im Blut. Eine verminderte Retinol-Mobilisierung durch RBP4 führt somit zu einer Akkumulation von Retinylestern in der Leber. Ähnliche Beobachtungen konnten Quadro, Blaner et al. (1999) in der RBP4-Knockout Maus machen. Dort kam es ebenfalls aufgrund der fehlenden RBP4-vermittelten Retinol-Mobilisation zu einem Anstieg der Retinylester in der Leber. Erstaunlicherweise zeigten sich die Retinylester in der Leber der leberspezifischen RBP4-Knockout Maus in einer Untersuchung von Thompson, Sargsyan et al. (2017) unverändert. Die leberspezifischen RBP4-Knockout Mäuse wurden jedoch auch auf einen gemischten C57BL/6J- und 129SV-Hintergrund untersucht.

Neben der Messung des Retinols im Serum wäre auch die Messung der Retinylester interessant gewesen. Diese lagen bei den in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden der HPLC-Messung unter der Detektionsgrenze, weshalb erst eine Optimierung der Methode nötig ist. Die Messung der Retinylester könnte darüber Aufschluss geben, ob der verminderte Retinol-Transport durch RBP4 im Serum zu den peripheren Geweben durch Retinylester kompensiert wird. Nach der Aufnahme der Retinoide durch die Nahrung transportieren Chylomikronen die Retinylester zu den Zielgeweben (Blomhoff, Helgerud et al. 1982). Die Mäuse mit einer leberspezifischen RBP4-Depletion hatten eine erhöhte Futteraufnahme (siehe Tabelle 15). Aufgrund dieser wäre anzunehmen, dass vermehrt Retinylester durch Chylomikronen zu den peripheren Geweben transportiert werden und somit die Retinoid Versorgung in der Peripherie aufrechterhalten wird.

In dem hier untersuchten Mausmodell konnte außerdem beobachtet werden, dass leberspezifische RBP4-Depletion zu einem reduzierten RBP4 Proteingehalt in der Leber führt (siehe Abbildung 25). Dieses Ergebnis war zu erwarten aufgrund verminderten *Rbp4* mRNA-Expression mittels AAV RBP4-miRNA-Injektion.

4.2.2 Einfluss der RBP4-Depletion auf Transthyretin

In dieser Arbeit wurden der TTR-Serumspiegel und die Proteinexpression in der Leber von Mäusen nach Injektion von AAV Kontroll- oder RBP4-miRNA analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine hepatische RBP4-Depletion mit einer nachfolgenden Reduzierung von RBP4 im Serum zu einem verminderten TTR-Serumspiegel führt (siehe Abbildung 23) und die RBP4-Expression in der Leber somit Einfluss auf die TTR-Konzentration im Serum hat.

Der Zusammenhang des TTR-Spiegels mit einem reduzierten RBP4-Spiegel wurde in zwei RBP4-Knockout Mäusen analysiert. Quadro, Blaner et al. (1999) konnten zeigen, dass die RBP4-Knockout Maus keine Veränderung von TTR im Serum aufweist. Hier ist anzumerken, dass dieses Mausmodell ein 28 kDa-Protein mit Merkmalen des ursprünglichen RBP4 Protein besitzt. Die oben genannten Autoren vermuteten, dass eine Kombination aus

Leserasterverschiebung und einem offenen Leseraster zu diesem 28 kDa-Protein führen, welches kein Retinol transportiert. Eine weitere RBP4-Knockout Maus ohne ein RBP4 ähnliches Protein hat ebenfalls keine Veränderung von TTR im Serum. Es wurde jedoch auch nur eine Maus pro Genotyp untersucht (Ghyselinck, Vernet et al. 2006). Ebenfalls wurde TTR im Serum der leberspezifischen RBP4-Knockout Maus bestimmt. Hier wurde ebenfalls keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe gefunden (Thompson, Sargsyan et al. 2017). Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte durch die unterschiedlichen Mausmodelle entstehen. Bei einer Veränderung der RBP4-Expression in der Keimbahn könnten Kompensationsmechanismen während der Entwicklung der Mäuse auftreten, welche bei einer induzierten Veränderung der RBP4-Expression mittels AAV-Injektion in erwachsenen Mäusen nicht erscheinen würden.

Um eine veränderte mRNA-Expression in der Leber als Ursache für die reduzierte TTR-Konzentration auszuschließen, wurde die mRNA-Expression von *Ttr* in der Leber gemessen. Die *Ttr* mRNA-Expression zeigte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 24). Dies lässt vermuten, dass die reduzierten TTR-Spiegel im Serum durch posttranskriptionale Mechanismen bedingt sind. Die anschließende Analyse der Leberproteine ergab eine verminderte Menge an TTR-Dimere in der Leber bei einer leberspezifischen RBP4-Depletion. Die TTR-Monomere in der Leber waren zwischen den beiden Mausgruppen gleich (siehe Abbildung 25). Hyung, Deroo et al. (2010) konnten nachweisen, dass der Retinol-RBP4-Komplex den Zerfall des TTR-Tetramers verlangsamt. Der Retinol-RBP4-Komplex hat somit eine stabilisierende Wirkung auf den TTR-Tetramer-Komplex. In den hier untersuchten Mäusen könnte die leberspezifische Reduktion von RBP4 zu einem schnellen Zerfall vom TTR Komplex führen und/oder den Aufbau von TTR in der Leber destabilisieren und somit zu reduzierten TTR-Spiegeln im Serum führen. Dass die TTR-Monomere in der Leber unverändert sind, könnte daran liegen, dass keine vollständigen denaturierenden Bedingungen für TTR vorlagen. Der TTR-Tetramer-Komplex ist sehr stabil (Gaetani, Bellovino et al. 2002). Henze, Homann et al. (2015) zeigten, dass nur 2-3 % von TTR als Monomer vorliegt, wenn im Western Blot semi-native Bedingungen vorherrschen. Es wäre ebenfalls eine Degradierung der Monomere als Ursache denkbar.

4.2.3 Gesteigerter Stoffwechsel bei einer hepatischen RBP4-Depletion

Eine leberspezifische RBP4-Depletion führte in den untersuchten Mäusen zu einer erhöhten Futteraufnahme (siehe Tabelle 15), welche erstaunlicherweise nicht von einer stärkeren Gewichtszunahme begleitet wurde. Der Verlauf des Körpergewichtes gestaltete sich stattdessen bei beiden Gruppen ähnlich (siehe Abbildung 17). Die leberspezifische RBP4-Knockout Maus zeigte ebenfalls kein unterschiedliches Körpergewicht (Thompson, Sargsyan et al. 2017). Allerdings war der Energieverbrauch sowie die lokomotorische Aktivität bei einer

leberspezifischen RBP4-Depletion erhöht und erklärt das vergleichbare Körpergewicht beider Gruppen (siehe Abbildung 21). In der Literatur ist hingegen beschrieben, dass die RBP4-Knockout Maus gegenüber der C57BL/6J-Kontrollmäusen eine geringere Aktivität zeigt. Die Ursache für den Unterschied könnten Verhaltens- und neuropathologische Abnormitäten der RBP4-Knockout Maus sein (Buxbaum, Roberts et al. 2014). Eine Verminderung des TTR-Serumspiegels führt folglich zu einem verminderten RBP4-Serumspiegel durch eine erhöhte glomeruläre Filtration von RBP4 (van Bennekum, Wei et al. 2001). Zemaný, Bhanot et al. (2015) zeigten, dass die Behandlung von *obese/obese* (*ob/ob*)-Mäusen und C57BL/6J-Mäusen mit TTR-Antisense-Oligonukleotiden zu keiner Veränderung der Futteraufnahme führt. Die *ob/ob* Mäuse sind für die Untersuchung der Futteraufnahme kein geeignetes Modell, da sie Leptin-Defizient sind und dadurch die Regulation der Futteraufnahme gestört ist (Houseknecht and Portocarrero 1998, Jovanovic and Yeo 2010). Die Erklärung für den Unterschied in der Futteraufnahme ist zwischen C57BL/6J-Mäusen mit TTR-Antisense-Oligonukleotiden und den hier untersuchten leberspezifischen RBP4 depletierten Mäusen nicht bekannt zum jetzigen Zeitpunkt. Ebenfalls konnte kein Unterschied der Futteraufnahme bei der leberspezifischen RBP4-Knockout Maus festgestellt werden (Thompson, Sargsyan et al. 2017). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die leberspezifische RBP4-Knockout Maus einen gemischten C57BL/6J- und 129SV-Hintergrund besitzt. Insgesamt zeigen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuse mit einer hepatischen RBP4-Reduktion einen gesteigerten Stoffwechsel. Der Stoffwechsel wird teilweise durch die Schilddrüsenhormone reguliert, welche den Energieverbrauch erhöhen, zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und gesteigerten Thermogenese führen (Williams and Ellis 1985, Levine, Nygren et al. 2003). Die Körpertemperatur der Mäuse wurde in dieser Arbeit nicht ermittelt. Bei Ratten, welchen T_3 injiziert wurde, konnten geringe Zunahmen beobachtet werden (Williams and Ellis 1985, Levine, Nygren et al. 2003). In der Literatur sind unveränderte oder erhöhte Werte für die Aktivität bei thyreotoxischen Ratten zu finden (Levine, Nygren et al. 2003, Klieverik, Coomans et al. 2009) Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei einer leberspezifischen RBP4-Depletion eine vermehrte Schilddrüsenhormon-Aktivität vorliegt.

4.2.4 Auswirkung auf die Schilddrüsenhormone im Serum

Die Mäuse mit einer leberspezifischen RBP4-Depletion wiesen einen geringeren TTR-Serumspiegel auf und bildeten den Phänotyp einer vermehrten Schilddrüsenhormon-Aktivität (siehe Abbildung 23). Transthyretin bildet nicht nur einen Komplex mit Retinol-RBP4 sondern transportiert auch die Schilddrüsenhormone Thyroxin und 3,3',5-Triiodothyronin (Richardson 2009). In Mäusen stellt TTR das Haupttransportprotein für die Schilddrüsenhormone dar (Vranckx, Savu et al. 1990). Aufgrund dieser Gegebenheiten bietet sich die Messung der Schilddrüsenhormone an. Der verminderte TTR-Serumspiegel in den Mäusen führte zu

keinem Unterschied von Gesamt-T₄ im Serum zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 26). Die Bestimmung von Gesamt-T₃ im Serum zeigte eine leichte Reduzierung gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 26).

Die meisten Untersuchungen in der Literatur erfolgten an der TTR-Knockout Maus mit einem 129SV-Hintergrund. Diese wiesen verminderte Gesamt-T₄-Konzentrationen und unveränderte Gesamt-T₃-Konzentrationen im Serum auf (Palha, Episkopou et al. 1994). Erfolgte jedoch die Untersuchung auf einen C57BL6-Hintergrund (mindestens 5 Generationen rückgekreuzt) waren sowohl Gesamt-T₄ und Gesamt-T₃ im Serum erniedrigt (Zhao, Li et al. 2008, Kato, Tamaki et al. 2012). Eine mögliche Ursache für den unveränderten Gesamt-T₄-Spiegel im Serum könnte einerseits eine bei einer leberspezifischen RBP4-Depletion noch ausreichende Restmenge von TTR im Serum sein, welche ausreicht, um noch die Gesamt-T₄-Konzentration im Serum aufrechtzuerhalten. In einer Rattenstudie lag beispielsweise 10.000 mal mehr TTR als Gesamt-T₄ im Serum vor (Wade, Bleiberg-Daniel et al. 1988). Andererseits könnten auch andere Proteine für die Schilddrüsenhormone als Transportproteine in Betracht kommen, denn neben TTR transportieren auch TBG und Albumin Schilddrüsenhormone (Schreiber 2002). Diese Verschiebung der Schilddrüsenhormone zu anderen Transportproteinen hin wurde auch in der TTR-Knockout Maus beobachtet (Palha, Episkopou et al. 1994). Die Hypothese einer Verschiebung der Schilddrüsenhormone in dem hier untersuchten Modell zu anderen Transportproteinen hin könnte auch den Phänotyp der Mäuse mit einem gesteigerten Stoffwechsel erklären. Eine vermehrte Bindung an Albumin wäre allerdings wahrscheinlicher, da TBG in nur sehr geringen Konzentrationen in der Maus vorhanden ist (Vranckx, Savu et al. 1990). Die Affinität der Schilddrüsenhormone zu Albumin ist viel geringer als zu TBG und TTR (Richardson 2009). Eine Bindung an Albumin würde eine Dissoziation von den Schilddrüsenhormonen wahrscheinlicher machen und die freie Hormonkonzentration der Schilddrüsenhormone im Serum ansteigen lassen. Dieser Anstieg würde zu einer erhöhten Schilddrüsenhormon-Aktivität in den Geweben führen. Um diese Hypothese zu überprüfen würde sich in zukünftigen Experimenten die Untersuchung der Bindungsverteilung von T₄ an den Transportproteine im Serum anbieten. Hierfür könnte ein radioaktiver T₄-Bindungsassay durchgeführt werden, der von Radovic, Hussong et al. (2010) beschrieben wurde. Die im zu untersuchenden Serum enthaltende Transportproteine TTR, Albumin und TBG würden mit ¹²⁵I-T₄ markiert werden. Anschließend würden diese Transportproteine in einer nativen Gelelektrophorese aufgetrennt und die Verteilung des ¹²⁵I-T₄ an den Transportproteinen mit einem Phosphorimager bestimmt. Ebenfalls würde sich die Untersuchung der freien Form der Schilddrüsenhormone anbieten, denn sie spiegelt die biologische Aktivität der Schilddrüsenhormone auf zellulärer Ebene wieder. Hier wurden bei den untersuchten Mäusen Gesamt-T₄ und Gesamt-T₃ bestimmt, da es momentan keine geeignete

Messmethode gibt, welche die Konzentration von freiem T_4 und freiem T_3 störungsfrei und unverdünnt im Serum misst und somit die *in vivo* Gegebenheiten wiedergibt (Stockigt 2011). Die Messung von Gesamt- T_4 und Gesamt- T_3 liegt im nM Bereich. Es liegen 99,94 % des T_4 und 99,44% des T_3 gebunden an Transportproteine im Blut vor (Palha, Episkopou et al. 1994). Dies führt dazu, dass die freie Form nur noch im pM Bereich vorliegt und somit zusätzlich die Analyse erschwert. Eine Alternative zur Messung der freien Form wäre die Messung von Zielgenen der Thyroid-Achse mittels qRT-PCR. Die Zielgene können Hinweise für die Schilddrüsenhormon-Aktivität in den Geweben geben.

4.2.5 Leberspezifische RBP4-Depletion und Glukosetoleranz

Die Untersuchung der Glukosetoleranz ergab, dass eine leberspezifische RBP4-Depletion in Mäusen zu einer verbesserten Glukosetoleranz führt (siehe Abbildung 18). Die Insulinwerte beim ipGTT zum 15 Minuten-Zeitpunkt waren bei beiden Gruppen unverändert (siehe Tabelle 15). Dass eine Reduktion von RBP4 im Serum zu einer verbesserten Insulinsensitivität führte, konnte in den nachfolgenden Studien bestätigt werden. Die RBP4-Knockout Maus zeigte eine verbesserte Insulinsensitivität (Yang, Graham et al. 2005, Moraes-Vieira, Castoldi et al. 2016). Weiterhin konnte mit Antisense-Oligonukleotiden gegen RBP4 eine verbesserte Glukosetoleranz erreicht werden (Tan, Sun et al. 2011). Ma, Zhou et al. (2016) zeigten, dass eine leberspezifische RBP4-Depletion durch Adenoviren zu einer verbesserten Glukosetoleranz führt. Sie demonstrierten die verbesserte Glukosetoleranz ebenfalls durch eine Reduktion von RBP4 durch Adeno-assoziierte-Viren. Hier ist anzumerken, dass die AAVs nicht leberspezifisch waren. In der Literatur finden sich auch Studien, in welchen eine Reduktion von RBP4 im Serum durch Fenretinide (Yang, Graham et al. 2005) oder Antisense-Oligonukleotide gegen Transthyretin (Zemany, Bhanot et al. 2015) zu einer verbesserten Insulinsensitivität führte. Jedoch zeigte die leberspezifische RBP4-Knockout Maus keine Verbesserung der Glukosetoleranz (Thompson, Sargsyan et al. 2017), welches möglicherweise auf den gemischten Hintergrund der leberspezifischen RBP4-Knockout Maus zurückzuführen ist.

Vor kurzen konnten Moraes-Vieira, Castoldi et al. (2016) zeigen, dass in den RBP4-Knockout Mäusen bei Fütterung einer Hochfettdiät eine verminderte Inflammation im gonadalen Fettgewebe festgestellt werden kann. Eine verminderte Inflammation im Fettgewebe führt zu einer verbesserten Insulinsensitivität. Die Analyse des gonadalen Fettgewebes der RBP4-Knockout Mäuse ergab eine verminderte Anzahl an Gesamt-Makrophagen, proinflammatorischen Makrophagen und proinflammatorischen CD4 T-Zellen. Die Unterschiede in der Inflammation im gonadalen Fettgewebe wurden nur bei Mäusen auf der Hochfettdiät und nicht auf der Normaldiät gefunden, obwohl bei beiden Diätformen eine verbesserte Insulinsensitivität festgestellt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt,

dass eine leberspezifische RBP4-Depletion zu keiner veränderten Inflammation im gonadalen Fettgewebe führt (siehe Abbildung 19). Die unveränderte Inflammation könnte durch die leberspezifische RBP4-Depletion gegenüber dem Ganzkörper-Knockout von RBP4 erklärt werden. Ebenfalls könnte ein anderer Mechanismus für die verbesserte Glukosetoleranz in Zusammenhang mit RBP4 verantwortlich sein.

Eine mögliche Hypothese für die verbesserte Glukosetoleranz in Mäusen mit einer leberspezifischen RBP4-Depletion ist eine gesteigerte Schilddrüsenhormon-Aktivität in den Geweben. Wie in Kapitel 4.2.3 schon beschrieben wiesen die Tiere eine gesteigerte lokomotorische Aktivität, einen erhöhten Energieverbrauch, eine erhöhte Futtermittelaufnahme und somit einen gesteigerten Stoffwechsel (siehe Abbildung 21 und Tabelle 15) auf. Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine Gabe von Thyroid-Rezeptor- β_2 -Agonisten zu einer verbesserten Insulinsensitivität und/oder Glukosetoleranz in Nagetiermodellen für Adipositas und Diabetes führt (Bryzgalova, Effendic et al. 2008, Amorim, Ueta et al. 2009, Lin, Martagon et al. 2015). Jedoch zeigten andere Studien keinen Effekt oder eine Verschlechterung der Glukosetoleranz (Vatner, Weismann et al. 2013). Um die genannte Hypothese zu bestätigen sind weitere Untersuchungen nötig.

4.2.6 Einfluss der leberspezifischen RBP4-Depletion auf den Glukose- und Fettstoffwechsel

Für die metabolische Charakterisierung wurden Parameter zur Beschreibung des Glukose- und Fettstoffwechsels bei einer leberspezifischen RBP4-Depletion gemessen. Zur Charakterisierung des Fettstoffwechsels wurde der Triglyzerid-Gehalt in Leber und Serum und die freien, nicht veresterten Fettsäuren im Serum ermittelt. Mäuse mit einer leberspezifischen RBP4-Reduktion zeigten keine Veränderung der Parameter des Fettstoffwechsels (siehe Tabelle 15). Für die Triglyzeride in der Leber konnte jedoch ein Abwärtstrend ($p=0,07$) beobachtet werden. Tan, Sun et al. (2011) konnten hingegen zeigen, dass eine Reduktion von RBP4 durch RBP4-Antisense-Oligonukleotide zu einer Reduzierung von Triglyzeriden und freien, nicht veresterten Fettsäuren im Serum und von Triglyzeriden in der Leber bei für 16 Stunden nüchternen Mäusen führt. Ebenfalls kam es in der RBP4-Knockout Maus zu einer Reduktion der Triglyzeride und freien, nicht veresterten Fettsäuren im Serum (Moraes-Vieira, Castoldi et al. 2016). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte eine zu kleine Gruppe für die RBP4-Reduktion sein. Zusätzlich unterschied sich das hier untersuchte Mausmodell von den beiden genannten Studien indem eine leberspezifische RBP4-Depletion erfolgte und die Mäuse im Gegensatz zu den Mäusen mit einer RBP4-Antisense-Oligonukleotid Behandlung *ad libitum* gefüttert wurden. Eine Erklärung für den Abwärtstrend der Triglyzeride in Leber und Serum könnte auch durch die Hypothese der vermehrten Schilddrüsenhormon-Aktivität in den Geweben

erklärt werden, da eine Behandlung mit Thyroid- β_2 -Rezeptor-Agonisten eine Verbesserung des Triglyzeridanteils in Leber und Serum zeigte (Cable, Finn et al. 2009, Vatner, Weismann et al. 2013, Martagon, Lin et al. 2015).

In dem Modell wurde weiterhin der Glukosestoffwechsel durch eine Messung von Glykogen in Leber, Glukose im venösem Blut und Insulin im Serum charakterisiert. Bei der leberspezifischen RBP4-Depletion war nur Insulin *ad libitum* im Serum reduziert. Die anderen Parameter des Glukosestoffwechsels waren unverändert (siehe Tabelle 15). Die reduzierten Insulin-Werte konnten auch in anderen Studien mit einer Reduzierung von RBP4 durch RBP4-Antisense-Oligonukleotide oder mit der RBP4-Knockout Maus beobachtet werden (Tan, Sun et al. 2011, Moraes-Vieira, Castoldi et al. 2016). Andere Studien zeigten jedoch auch, dass ein RBP4-Reduktion mittels Adenoviren oder Adeno-assoziierte-Viren zu einer erniedrigten nüchternen Blutglukose führen (Ma, Zhou et al. 2016). Der Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass den hier untersuchten Mäusen eine Hochfett-diät gefüttert wurde, die Glukose *ad libitum* gemessen wurde und Bestimmung der Glukose in den Mäusen zu einem späteren Zeitpunkt nach der RBP4-Reduktion erfolgte. In der Literatur sind bisher keine Daten zu dem Einfluss von RBP4 auf Glykogen *in vivo* zu finden.

4.2.7 Leberspezifische RBP4-Depletion und Glukoneogenese-Genexpression in der Leber

In der Literatur ist eine Studie beschrieben, in welcher eine Reduktion von RBP4 mittels Adenoviren oder Adeno-assoziierte Viren bei *ad libitum* oder nüchternen Mäusen zu einer Abnahme der Gen- und Proteinexpression von *Pck1* in der Leber führt (Ma, Zhou et al. 2016). Eine Abnahme der Genexpression von *Pck1* und *G6pc* konnte auch in nüchternen Mäusen beobachtet werden, die eine Reduktion von RBP4 durch RBP4-Antisense-Oligonukleotide erfuhren (Tan, Sun et al. 2011). In dieser Arbeit konnte durch eine hepatische RBP4-Depletion keine Veränderung der *Pck1*- und *G6pc*-Genexpression festgestellt werden (siehe Abbildung 22). Unterschiede zu den genannten Studien sind, die Fütterung einer Hochfett-diät, die Untersuchung im *ad libitum* Zustand, die RBP4-Reduktion über einen längeren Zeitraum und die Tatsache, dass die genannten Studien teilweise keine leberspezifische Reduktion von RBP4 untersuchten.

5 Zusammenfassung

Retinol-Bindungsprotein 4 im Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel

Das Retinol-Bindungsprotein 4 (RBP4) mobilisiert bei Bedarfszuständen Retinol aus der Leber und fungiert als spezifisches Transportprotein für Retinol im Serum. Transthyretin (TTR), in der Maus das wichtigste Schilddrüsenhormon-Transportprotein, liegt als Komplex mit RBP4 im Blut vor. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass sowohl die Injektion von humanem rekombinanten RBP4 in C57BL/6-Mäusen als auch die muskuläre Überexpression von humanem RBP4 in einem Mausmodell zur Insulinresistenz führt. Nachfolgende Studien wiesen eine Erhöhung von RBP4 im Serum bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 nach. Dies führte zu der weit verbreiteten Hypothese RBP4 sei das Bindeglied zwischen Adipositas und Insulinresistenz. Andere Studien konnten jedoch den Zusammenhang zwischen RBP4, Adipositas und Insulinresistenz nicht reproduzieren, sodass die Rolle von RBP4 in diesem Kontext weiterhin kontrovers diskutiert wird. Die vorliegende Arbeit soll aus diesem Grund zu einem erweiterten Verständnis der Funktion von RBP4 im Metabolismus beitragen. Im Rahmen dessen wurde der Zusammenhang der RBP4-vermittelten Retinol-Mobilisation aus der Leber mit dem Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsel untersucht. Außerdem wurde die Interaktion von RBP4 mit TTR analysiert. Hierfür wurden zwei neue Mausmodelle mit Hilfe Adeno-assoziiierter Viren etabliert, die eine leberspezifische RBP4-Überexpression oder RBP4-Depletion in erwachsenen männlichen C57BL/6J Mäusen hervorrufen. Anschließend erfolgte eine Analyse des Glukose-, Fett- und Energiestoffwechsels. Zusätzlich wurde bei der leberspezifischen RBP4-Depletion TTR im Serum sowie in der Leber untersucht und die Gesamtkonzentration der beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin (T_4) und 3,3',5-Triiodothyronin (T_3) bestimmt.

Die Mäuse mit einer leberspezifischen RBP4-Überexpression zeigten keine eingeschränkte Glukosetoleranz. Weiterhin führte die RBP4-Überexpression in der Leber zu keiner Veränderung im Glukose-, Fett- oder Energiestoffwechsel. Die Mäuse mit leberspezifischer RBP4-Depletion wiesen einen verminderten TTR-Spiegel im Serum und reduzierte Mengen an TTR-Dimeren in der Leber auf. Sie zeigten einen verminderten Gesamt- T_3 -Serumspiegel und einen unveränderten Gesamt- T_4 -Serumspiegel. Außerdem kam es zu verbesserter Glukosetoleranz sowie zur Steigerung von Futteraufnahme, lokomotorischer Aktivität und Energieverbrauch. Der Fettstoffwechsel blieb unverändert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der RBP4-Werte im Serum nicht per se zu einer verminderten Glukosetoleranz führt. Außerdem bedingt

höchstwahrscheinlich eine verminderte leberspezifische RBP4-Expression bei erwachsenen Mäusen eine reduzierte TTR-Sekretion aus der Leber und diese folglich einen verminderten TTR-Serumspiegel. Weiterhin implizieren die Daten der leberspezifischen RBP4-Depletion einen veränderten Transport der Schilddrüsenhormone, verursacht durch den reduzierten TTR-Spiegel im Serum. Dies könnte zu einer gesteigerten Aktivität der Schilddrüsenhormone in den Geweben führen, welche sowohl gesteigerte Futteraufnahme, erhöhte lokomotorische Aktivität und erhöhten Energieverbrauch als auch die verbesserte Glukosetoleranz der Mäuse erklären würde. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind jedoch weiterführende Untersuchungen nötig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen ersten Hinweis auf die Notwendigkeit von leberspezifischem RBP4 für die TTR-Sekretion aus der Leber und die Aufrechterhaltung eines ausreichenden TTR-Serumspiegels. Weiterhin führt eine leberspezifische RBP4-Depletion zu einer verbesserten Glukosetoleranz sowie zu gesteigerter Futteraufnahme, lokomotorischer Aktivität und Energieverbrauch. Erstaunlicherweise führt eine leberspezifische RBP4-Überexpression zu keiner eingeschränkten Glukosetoleranz.

6 Summary

Retinol binding protein 4 in the glucose, fat and energy metabolism

The retinol binding protein 4 (RBP4) mobilizes retinol from the liver in states of need and serves as the specific transport protein for retinol in serum. Transthyretin (TTR) is the most important transport protein for thyroid hormones in mice and circulates in the blood in complex with RBP4. Another workgroup demonstrated, that both the injection of human recombinant RBP4 in C57BL/6 mice and the muscular overexpression of human RBP4 in a mouse model cause insulin resistance. Further studies showed an increase of RBP4 in serum of obese or type 2 diabetic patients. This led to the widespread hypothesis that RBP4 links obesity with insulin resistance. Nevertheless, other studies could not replicate the connection between RBP4, obesity and insulin resistance and therefore the role of RBP4 in this context remains highly debatable. The present study contributes to this discussion by further investigating the metabolic role of RBP4 focusing on the link between RBP4-mediated retinol mobilisation from the liver and glucose, fat and energy metabolism. Furthermore, the interaction between RBP4 and TTR was analysed. In this context, two new mouse models were established by means of adeno-associated viruses that induce either liver specific overexpression or depletion of RBP4 in adult, male C57BL/6J mice. A close analysis of the glucose, fat and energy metabolism followed. Additionally, TTR was examined in the blood and liver of mice with liver specific RBP4-depletion and the total concentration of both thyroid hormones, thyroxine (T_4) and 3,3',5-triiodothyronine (T_3), was measured.

In mice with a liver specific overexpression of RBP4, glucose tolerance was not impaired. Furthermore, RBP4 overexpression in the liver did not cause any alterations in the glucose, fat or energy metabolism. However, in liver specific RBP4-depleted mice levels of TTR in serum and TTR dimers in the liver were reduced. The total- T_3 serum levels decreased and total- T_4 serum levels remained unchanged. Besides, glucose tolerance improved and food intake, locomotive activity and energy expenditure increased, but fat metabolism remained unaltered.

Our experiment demonstrates that increased RBP4 serum levels do not per se cause impaired glucose tolerance. Furthermore, most likely a decreased liver specific expression of RBP4 in adult mice leads to a reduced TTR secretion in the liver and consequently to a lowered TTR serum level. Moreover, the data of the liver specific RBP4-depletion implicate a modified transport of thyroid hormones provoked by reduced TTR serum levels. This might result in an increased tissue activity of thyroid hormones, which could explain improved

glucose tolerance as well as higher food intake, locomotor activity and energy use of the animals. However further research is necessary to confirm this hypothesis.

The results of this study provide initial indication that liver specific RBP4 is crucial to both TTR secretion off the liver and the maintenance of a sufficient TTR serum level. Furthermore, liver specific RBP4-depletion leads to improved glucose tolerance, increased food intake, locomotive activity and energy use. Surprisingly, a liver specific overexpression does not cause impaired glucose tolerance.

7 Literaturverzeichnis

Alapatt, P., F. Guo, S. M. Komanetsky, S. Wang, J. Cai, A. Sargsyan, E. Rodriguez Diaz, B. T. Bacon, P. Aryal and T. E. Graham (2013). "Liver retinol transporter and receptor for serum retinol-binding protein (RBP4)." J Biol Chem **288**(2): 1250-1265.

Amorim, B. S., C. B. Ueta, B. C. Freitas, R. J. Nassif, C. H. Gouveia, M. A. Christoffolete, A. S. Moriscot, C. L. Lancelloti, F. Llimona, H. V. Barbeiro, H. P. de Souza, S. Catanozi, M. Passarelli, M. S. Aoki, A. C. Bianco and M. O. Ribeiro (2009). "A TRbeta-selective agonist confers resistance to diet-induced obesity." J Endocrinol **203**(2): 291-299.

Balmer, J. E. and R. Blomhoff (2002). "Gene expression regulation by retinoic acid." J Lipid Res **43**(11): 1773-1808.

Bellovino, D., M. Apreda, S. Gragnoli, M. Massimi and S. Gaetani (2003). "Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion." Mol Aspects Med **24**(6): 411-420.

Berry, D. C., H. Jacobs, G. Marwarha, A. Gely-Pernot, S. M. O'Byrne, D. DeSantis, M. Klopfenstein, B. Feret, C. Dennefeld, W. S. Blaner, C. M. Croniger, M. Mark, N. Noy and N. B. Ghyselinck (2013). "The STRA6 receptor is essential for retinol-binding protein-induced insulin resistance but not for maintaining vitamin A homeostasis in tissues other than the eye." J Biol Chem **288**(34): 24528-24539.

Berry, D. C., H. Jin, A. Majumdar and N. Noy (2011). "Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(11): 4340-4345.

Berry, D. C., S. M. O'Byrne, A. C. Vreeland, W. S. Blaner and N. Noy (2012). "Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding protein receptor STRA6." Mol Cell Biol **32**(15): 3164-3175.

Blaner, W. S. (1989). "Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A." Endocr Rev **10**(3): 308-316.

Blaner, W. S., S. M. O'Byrne, N. Wongsiriroj, J. Kluwe, D. M. D'Ambrosio, H. Jiang, R. F. Schwabe, E. M. Hillman, R. Piantedosi and J. Libien (2009). "Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 467-473.

Blomhoff, R. and H. K. Blomhoff (2006). "Overview of retinoid metabolism and function." J Neurobiol **66**(7): 606-630.

- Blomhoff, R., P. Helgerud, M. Rasmussen, T. Berg and K. R. Norum (1982). "In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7326-7330.
- Brun, P. J., K. J. Yang, S. A. Lee, J. J. Yuen and W. S. Blaner (2013). "Retinoids: Potent regulators of metabolism." Biofactors **39**(2): 151-163.
- Bryzgalova, G., S. Effendic, A. Khan, S. Rehnmark, P. Barbounis, J. Boulet, G. Dong, R. Singh, S. Shapses, J. Malm, P. Webb, J. D. Baxter and G. J. Grover (2008). "Anti-obesity, anti-diabetic, and lipid lowering effects of the thyroid receptor beta subtype selective agonist KB-141." J Steroid Biochem Mol Biol **111**(3-5): 262-267.
- Buxbaum, J. N., A. J. Roberts, A. Adame and E. Masliah (2014). "Silencing of murine transthyretin and retinol binding protein genes has distinct and shared behavioral and neuropathologic effects." Neuroscience **275**: 352-364.
- Cable, E. E., P. D. Finn, J. W. Stebbins, J. Hou, B. R. Ito, P. D. van Poelje, D. L. Linemeyer and M. D. Erion (2009). "Reduction of hepatic steatosis in rats and mice after treatment with a liver-targeted thyroid hormone receptor agonist." Hepatology **49**(2): 407-417.
- Chainani, M., B. Sampsel and R. W. Elliott (1991). "Localization of the gene for plasma retinol binding protein to the distal half of mouse chromosome 19." Genomics **9**(2): 376-379.
- Chambon, P. (1996). "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors." Faseb J **10**(9): 940-954.
- Choksi, N. Y., G. D. Jahnke, C. St Hilaire and M. Shelby (2003). "Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **68**(6): 479-491.
- D'Ambrosio, D. N., R. D. Clugston and W. S. Blaner (2011). "Vitamin A metabolism: an update." Nutrients **3**(1): 63-103.
- Du, M., L. Otalora, A. A. Martin, G. Moiseyev, P. Vanlandingham, Q. Wang, R. Farjo, A. Yeganeh, A. Quiambao and K. M. Farjo (2015). "Transgenic Mice Overexpressing Serum Retinol-Binding Protein Develop Progressive Retinal Degeneration through a Retinoid-Independent Mechanism." Mol Cell Biol **35**(16): 2771-2789.
- Episkopou, V., S. Maeda, S. Nishiguchi, K. Shimada, G. A. Gaitanaris, M. E. Gottesman and E. J. Robertson (1993). "Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2375-2379.

- Fedders, R., M. Muenzner and M. Schupp (2015). "Retinol binding protein 4 and its membrane receptors: a metabolic perspective." Horm Mol Biol Clin Investig **22**(1): 27-37.
- Fex, G., P. A. Albertsson and B. Hansson (1979). "Interaction between prealbumin and retinol-binding protein studied by affinity chromatography, gel filtration and two-phase partition." Eur J Biochem **99**(2): 353-360.
- Flower, D. R. (1996). "The lipocalin protein family: structure and function." Biochem J **318** (Pt 1): 1-14.
- Fries, E., L. Gustafsson and P. A. Peterson (1984). "Four secretory proteins synthesized by hepatocytes are transported from endoplasmic reticulum to Golgi complex at different rates." Embo j **3**(1): 147-152.
- Gaetani, S., D. Bellovino, M. Apreda and C. Devirgiliis (2002). "Hepatic synthesis, maturation and complex formation between retinol-binding protein and transthyretin." Clin Chem Lab Med **40**(12): 1211-1220.
- Ghyselinck, N. B., N. Vernet, C. Dennefeld, N. Giese, H. Nau, P. Chambon, S. Viville and M. Mark (2006). "Retinoids and spermatogenesis: lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein." Dev Dyn **235**(6): 1608-1622.
- Goodman, D. W., H. S. Huang and T. Shiratori (1965). "TISSUE DISTRIBUTION AND METABOLISM OF NEWLY ABSORBED VITAMIN A IN THE RAT." J Lipid Res **6**: 390-396.
- Harrison, E. H., J. E. Smith and D. S. Goodman (1980). "Effects of vitamin A deficiency on the levels and distribution of retinol-binding protein and marker enzymes in homogenates and Golgi-rich fractions of rat liver." Biochim Biophys Acta **628**(4): 489-497.
- Hennemann, G., R. Docter, E. C. Friesema, M. de Jong, E. P. Krenning and T. J. Visser (2001). "Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability." Endocr Rev **22**(4): 451-476.
- Henze, A., S. K. Frey, J. Raila, M. Tepel, A. Scholze, A. F. Pfeiffer, M. O. Weickert, J. Spranger and F. J. Schweigert (2008). "Evidence that kidney function but not type 2 diabetes determines retinol-binding protein 4 serum levels." Diabetes **57**(12): 3323-3326.
- Henze, A., T. Homann, M. Serteser, O. Can, O. Sezgin, A. Coskun, I. Unsal, F. J. Schweigert and A. Ozpinar (2015). "Post-translational modifications of transthyretin affect the triiodonine-binding potential." J Cell Mol Med **19**(2): 359-370.

- Houseknecht, K. L. and C. P. Portocarrero (1998). "Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis." Domest Anim Endocrinol **15**(6): 457-475.
- Hyung, S. J., S. Deroo and C. V. Robinson (2010). "Retinol and retinol-binding protein stabilize transthyretin via formation of retinol transport complex." ACS Chem Biol **5**(12): 1137-1146.
- Jovanovic, Z. and G. S. Yeo (2010). "Central leptin signalling: beyond the arcuate nucleus." Auton Neurosci **156**(1-2): 8-14.
- Kanai, M., A. Raz and D. S. Goodman (1968). "Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma." J Clin Invest **47**(9): 2025-2044.
- Kane, M. A. (2012). "Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid." Biochim Biophys Acta **1821**(1): 10-20.
- Kane, M. A., A. E. Folias and J. L. Napoli (2008). "HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues." Anal Biochem **378**(1): 71-79.
- Kato, Y., S. Tamaki, K. Haraguchi, S. Ikushiro, M. Sekimoto, C. Ohta, T. Endo, N. Koga, S. Yamada and M. Degawa (2012). "Comparative study on 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level between C57BL/6 and its transthyretin-deficient mice." Toxicol Appl Pharmacol **263**(3): 323-329.
- Kawaguchi, R., J. Yu, J. Honda, J. Hu, J. Whitelegge, P. Ping, P. Wiita, D. Bok and H. Sun (2007). "A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A." Science **315**(5813): 820-825.
- Kawaguchi, R., M. Zhong, M. Kassai, M. Ter-Stepanian and H. Sun (2015). "Vitamin A Transport Mechanism of the Multitransmembrane Cell-Surface Receptor STRA6." Membranes (Basel) **5**(3): 425-453.
- Kedishvili, N. Y. (2013). "Enzymology of retinoic acid biosynthesis and degradation." J Lipid Res **54**(7): 1744-1760.
- Kelly, M., M. A. Widjaja-Adhi, G. Palczewski and J. von Lintig (2016). "Transport of vitamin A across blood-tissue barriers is facilitated by STRA6." Faseb j.
- Klieverik, L. P., C. P. Coomans, E. Endert, H. P. Sauerwein, L. M. Havekes, P. J. Voshol, P. C. Rensen, J. A. Romijn, A. Kalsbeek and E. Fliers (2009). "Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo." Endocrinology **150**(12): 5639-5648.

- Lee, C. M., A. C. Boileau, T. W. Boileau, A. W. Williams, K. S. Swanson, K. A. Heintz and J. W. Erdman, Jr. (1999). "Review of animal models in carotenoid research." J Nutr **129**(12): 2271-2277.
- Lee, S. A., J. J. Yuen, H. Jiang, B. B. Kahn and W. S. Blaner (2016). "Adipocyte-specific over-expression of retinol-binding protein 4 (RBP4) causes hepatic steatosis in mice." Hepatology.
- Levine, J. A., J. Nygren, K. R. Short and K. S. Nair (2003). "Effect of hyperthyroidism on spontaneous physical activity and energy expenditure in rats." J Appl Physiol (1985) **94**(1): 165-170.
- Lewis, K. C., M. H. Green, J. B. Green and L. A. Zech (1990). "Retinol metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model." J Lipid Res **31**(9): 1535-1548.
- Li, Y., N. Wongsiriroj and W. S. Blaner (2014). "The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism." Hepatobiliary Surg Nutr **3**(3): 126-139.
- Lin, J. Z., A. J. Martagon, S. L. Cimini, D. D. Gonzalez, D. W. Tinkey, A. Biter, J. D. Baxter, P. Webb, J. A. Gustafsson, S. M. Hartig and K. J. Phillips (2015). "Pharmacological Activation of Thyroid Hormone Receptors Elicits a Functional Conversion of White to Brown Fat." Cell Rep **13**(8): 1528-1537.
- Livesey, G. and M. Elia (1988). "Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels." Am J Clin Nutr **47**(4): 608-628.
- Liz, M. A., F. M. Mar, F. Franquinho and M. M. Sousa (2010). "Aboard transthyretin: From transport to cleavage." IUBMB Life **62**(6): 429-435.
- Locatelli, F., P. Pozzoni and L. Del Vecchio (2006). "Renal manifestations in the metabolic syndrome." J Am Soc Nephrol **17**(4 Suppl 2): S81-85.
- Lumeng, C. N., J. L. Bodzin and A. R. Saltiel (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." J Clin Invest **117**(1): 175-184.
- Ma, X., Z. Zhou, Y. Chen, Y. Wu and Y. Liu (2016). "RBP4 functions as a hepatokine in the regulation of glucose metabolism by the circadian clock in mice." Diabetologia **59**(2): 354-362.

- Makover, A., H. Moriwaki, R. Ramakrishnan, M. J. Saraiva, W. S. Blaner and D. S. Goodman (1988). "Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat." J Biol Chem **263**(18): 8598-8603.
- Malpeli, G., C. Folli and R. Berni (1996). "Retinoid binding to retinol-binding protein and the interference with the interaction with transthyretin." Biochim Biophys Acta **1294**(1): 48-54.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**(6): 841-850.
- Marsili, A., A. M. Zavacki, J. W. Harney and P. R. Larsen (2011). "Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update." J Endocrinol Invest **34**(5): 395-407.
- Martagon, A. J., J. Z. Lin, S. L. Cimini, P. Webb and K. J. Phillips (2015). "The amelioration of hepatic steatosis by thyroid hormone receptor agonists is insufficient to restore insulin sensitivity in ob/ob mice." PLoS One **10**(4): e0122987.
- McCammon, M. G., D. J. Scott, C. A. Keetch, L. H. Greene, H. E. Purkey, H. M. Petrassi, J. W. Kelly and C. V. Robinson (2002). "Screening transthyretin amyloid fibril inhibitors: characterization of novel multiprotein, multiligand complexes by mass spectrometry." Structure **10**(6): 851-863.
- Mendel, C. M. (1989). "The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model." Endocr Rev **10**(3): 232-274.
- Mendel, C. M., R. A. Weisiger, A. L. Jones and R. R. Cavalieri (1987). "Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study." Endocrinology **120**(5): 1742-1749.
- Middleton, R. J., R. N. Foley, J. Hegarty, C. M. Cheung, P. McElduff, J. M. Gibson, P. A. Kalra, D. J. O'Donoghue and J. P. New (2006). "The unrecognized prevalence of chronic kidney disease in diabetes." Nephrol Dial Transplant **21**(1): 88-92.
- Monaco, H. L. (2000). "The transthyretin-retinol-binding protein complex." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 65-72.
- Monaco, H. L., M. Rizzi and A. Coda (1995). "Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein." Science **268**(5213): 1039-1041.
- Mondal, S., K. Raja, U. Schweizer and G. Mugesh (2016). "Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones."

Moraes-Vieira, P. M., A. Castoldi, P. Aryal, K. Wellenstein, O. D. Peroni and B. B. Kahn (2016). "Antigen presentation and T cell activation are critical for RBP4-induced insulin resistance." Diabetes.

Moraes-Vieira, P. M., M. M. Yore, P. M. Dwyer, I. Syed, P. Aryal and B. B. Kahn (2014). "RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance." Cell Metab **19**(3): 512-526.

Morris, D. L., K. W. Cho, J. L. Delproposto, K. E. Oatmen, L. M. Geletka, G. Martinez-Santibanez, K. Singer and C. N. Lumeng (2013). "Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice." Diabetes **62**(8): 2762-2772.

Muenzner, M., N. Tuvia, C. Deutschmann, N. Witte, A. Tolkachov, A. Valai, A. Henze, L. E. Sander, J. Raila and M. Schupp (2013). "Retinol-binding protein 4 and its membrane receptor STRA6 control adipogenesis by regulating cellular retinoid homeostasis and retinoic acid receptor alpha activity." Mol Cell Biol **33**(20): 4068-4082.

Nathwani, A. C., J. T. Gray, C. Y. Ng, J. Zhou, Y. Spence, S. N. Waddington, E. G. Tuddenham, G. Kembal-Cook, J. McIntosh, M. Boon-Spijker, K. Mertens and A. M. Davidoff (2006). "Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver." Blood **107**(7): 2653-2661.

Navab, M., J. E. Smith and D. S. Goodman (1977). "Rat plasma prealbumin. Metabolic studies on effects of vitamin A status and on tissue distribution." J Biol Chem **252**(14): 5107-5114.

Naylor, H. M. and M. E. Newcomer (1999). "The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP." Biochemistry **38**(9): 2647-2653.

Newcomer, M. E. and D. E. Ong (2000). "Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 57-64.

Norseen, J., T. Hosooka, A. Hammarstedt, M. M. Yore, S. Kant, P. Aryal, U. A. Kiernan, D. A. Phillips, H. Maruyama, B. J. Kraus, A. Usheva, R. J. Davis, U. Smith and B. B. Kahn (2012). "Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism." Mol Cell Biol **32**(10): 2010-2019.

- O'Byrne, S. M. and W. S. Blaner (2013). "Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology." J Lipid Res **54**(7): 1731-1743.
- O'Byrne, S. M. and W. S. Blaner (2008). "Retinoids and the metabolic syndrome." Expert Review of Endocrinology & Metabolism **3**(5): 539-541.
- Ortiga-Carvalho, T. M., A. R. Sidhaye and F. E. Wondisford (2014). "Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders." Nat Rev Endocrinol **10**(10): 582-591.
- Palha, J. A. (2002). "Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited." Clin Chem Lab Med **40**(12): 1292-1300.
- Palha, J. A., V. Episkopou, S. Maeda, K. Shimada, M. E. Gottesman and M. J. Saraiva (1994). "Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain." J Biol Chem **269**(52): 33135-33139.
- Pasutto, F., H. Sticht, G. Hammersen, G. Gillessen-Kaesbach, D. R. Fitzpatrick, G. Nurnberg, F. Brasch, H. Schirmer-Zimmermann, J. L. Tolmie, D. Chitayat, G. Houge, L. Fernandez-Martinez, S. Keating, G. Mortier, R. C. Hennekam, A. von der Wense, A. Slavotinek, P. Meinecke, P. Bitoun, C. Becker, P. Nurnberg, A. Reis and A. Rauch (2007). "Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation." Am J Hum Genet **80**(3): 550-560.
- Postic, C., R. Dentin and J. Girard (2004). "Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis." Diabetes Metab **30**(5): 398-408.
- Qatanani, M. and M. A. Lazar (2007). "Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu." Genes Dev **21**(12): 1443-1455.
- Quadro, L., W. S. Blaner, D. J. Salchow, S. Vogel, R. Piantedosi, P. Gouras, S. Freeman, M. P. Cosma, V. Colantuoni and M. E. Gottesman (1999). "Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein." Embo j **18**(17): 4633-4644.
- Quadro, L., L. Hamberger, V. Colantuoni, M. E. Gottesman and W. S. Blaner (2003). "Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models." Mol Aspects Med **24**(6): 421-430.
- Radovic, B., R. Hussong, C. Gerhauser, W. Meinl, N. Frank, H. Becker and J. Kohrle (2010). "Xanthohumol, a prenylated chalcone from hops, modulates hepatic expression of genes involved in thyroid hormone distribution and metabolism." Mol Nutr Food Res **54** **Suppl 2**: S225-235.

- Rask, L., C. Valtersson, H. Anundi, S. Kvist, U. Eriksson, G. Dallner and P. A. Peterson (1983). "Subcellular localization in normal and vitamin A-deficient rat liver of vitamin A serum transport proteins, albumin, ceruloplasmin and class I major histocompatibility antigens." Exp Cell Res **143**(1): 91-102.
- Raz, A. and D. S. Goodman (1969). "The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex." J Biol Chem **244**(12): 3230-3237.
- Richardson, S. J. (2009). "Evolutionary changes to transthyretin: evolution of transthyretin biosynthesis." Febs j **276**(19): 5342-5356.
- Ronne, H., C. Ocklind, K. Wiman, L. Rask, B. Obrink and P. A. Peterson (1983). "Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin a on the secretion of the retinol-binding protein." J Cell Biol **96**(3): 907-910.
- Ruhl, R., A. Krzyzosiak, A. Niewiadomska-Cimicka, N. Rochel, L. Szeles, B. Vaz, M. Wietrzych-Schindler, S. Alvarez, M. Szklenar, L. Nagy, A. R. de Lera and W. Krezel (2015). "9-cis-13,14-Dihydroretinoic Acid Is an Endogenous Retinoid Acting as RXR Ligand in Mice." PLoS Genet **11**(6): e1005213.
- Schreiber, G. (2002). "The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus." Clin Chem Lab Med **40**(12): 1200-1210.
- Schussler, G. C. (2000). "The thyroxine-binding proteins." Thyroid **10**(2): 141-149.
- Shin, D. J., D. P. Odom, K. B. Scribner, S. Ghoshal and M. M. McGrane (2002). "Retinoid regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in liver." Mol Cell Endocrinol **195**(1-2): 39-54.
- Shirakami, Y., S. A. Lee, R. D. Clugston and W. S. Blaner (2012). "Hepatic metabolism of retinoids and disease associations." Biochim Biophys Acta **1821**(1): 124-136.
- Shoemaker, T. J., T. Kono, C. N. Mariash and C. Evans-Molina (2012). "Thyroid hormone analogues for the treatment of metabolic disorders: new potential for unmet clinical needs?" Endocr Pract **18**(6): 954-964.
- Soprano, D. R., J. Herbert, K. J. Soprano, E. A. Schon and D. S. Goodman (1985). "Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat." J Biol Chem **260**(21): 11793-11798.

- Soprano, D. R., C. B. Pickett, J. E. Smith and D. S. Goodman (1981). "Biosynthesis of plasma retinol-binding protein in liver as a larger molecular weight precursor." J Biol Chem **256**(16): 8256-8258.
- Soprano, D. R., P. Qin and K. J. Soprano (2004). "Retinoic acid receptors and cancers." Annu Rev Nutr **24**: 201-221.
- Sporn, M. B. and A. B. Roberts (1985). "What is a retinoid?" Ciba Found Symp **113**: 1-5.
- Stockigt, J. (2011). Thyroid function tests and the effects of drugs. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes. J. A. H. Wass and P. M. Stewart, OUP Oxford.
- Sun, Y., S. Liu, S. Ferguson, L. Wang, P. Klepcyk, J. S. Yun and J. E. Friedman (2002). "Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice." J Biol Chem **277**(26): 23301-23307.
- Surwit, R. S., C. M. Kuhn, C. Cochrane, J. A. McCubbin and M. N. Feinglos (1988). "Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice." Diabetes **37**(9): 1163-1167.
- Tan, Y., L. Q. Sun, M. A. Kamal, X. Wang, J. P. Seale and X. Qu (2011). "Suppression of retinol-binding protein 4 with RNA oligonucleotide prevents high-fat diet-induced metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in mice." Biochim Biophys Acta **1811**(12): 1045-1053.
- Terra, R., X. Wang, Y. Hu, T. Charpentier, A. Lamarre, M. Zhong, H. Sun, J. Mao, S. Qi, H. Luo and J. Wu (2013). "To investigate the necessity of STRA6 upregulation in T cells during T cell immune responses." PLoS One **8**(12): e82808.
- Thompson, S. J., A. Sargsyan, S. A. Lee, J. J. Yuen, J. Cai, R. Smalling, N. Ghyselinck, M. Mark, W. S. Blaner and T. E. Graham (2017). "Hepatocytes Are the Principal Source of Circulating RBP4 in Mice." Diabetes **66**(1): 58-63.
- Tschop, M. H., J. R. Speakman, J. R. Arch, J. Auwerx, J. C. Bruning, L. Chan, R. H. Eckel, R. V. Farese, Jr., J. E. Galgani, C. Hambly, M. A. Herman, T. L. Horvath, B. B. Kahn, S. C. Kozma, E. Maratos-Flier, T. D. Muller, H. Munzberg, P. T. Pfluger, L. Plum, M. L. Reitman, K. Rahmouni, G. I. Shulman, G. Thomas, C. R. Kahn and E. Ravussin (2012). "A guide to analysis of mouse energy metabolism." Nat Methods **9**(1): 57-63.
- Tsourdi, E., E. Rijntjes, J. Kohrle, L. C. Hofbauer and M. Rauner (2015). "Hyperthyroidism and Hypothyroidism in Male Mice and Their Effects on Bone Mass, Bone Turnover, and the Wnt Inhibitors Sclerostin and Dickkopf-1." Endocrinology **156**(10): 3517-3527.

- van Bennekum, A. M., S. Wei, M. V. Gamble, S. Vogel, R. Piantedosi, M. Gottesman, V. Episkopou and W. S. Blaner (2001). "Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice." J Biol Chem **276**(2): 1107-1113.
- Vatner, D. F., D. Weismann, S. A. Beddow, N. Kumashiro, D. M. Erion, X. H. Liao, G. J. Grover, P. Webb, K. J. Phillips, R. E. Weiss, J. S. Bogan, J. Baxter, G. I. Shulman and V. T. Samuel (2013). "Thyroid hormone receptor-beta agonists prevent hepatic steatosis in fat-fed rats but impair insulin sensitivity via discrete pathways." Am J Physiol Endocrinol Metab **305**(1): E89-100.
- Vranckx, R., L. Savu, M. Maya and E. A. Nunez (1990). "Characterization of a major development-regulated serum thyroxine-binding globulin in the euthyroid mouse." Biochem J **271**(2): 373-379.
- Wade, S., F. Bleiberg-Daniel and B. Le Moullac (1988). "Rat transthyretin: effects of acute short-term food deprivation and refeeding on serum and cerebrospinal fluid concentration and on hepatic mRNA level." J Nutr **118**(2): 199-205.
- Wei, S., V. Episkopou, R. Piantedosi, S. Maeda, K. Shimada, M. E. Gottesman and W. S. Blaner (1995). "Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination." J Biol Chem **270**(2): 866-870.
- Williams, C. M. and R. Ellis (1985). "Thermogenic and metabolic consequences of thyroid hormone treatment in brown and white adipose tissue." Biosci Rep **5**(2): 175-184.
- Williams, L. M., F. M. Campbell, J. E. Drew, C. Koch, N. Hoggard, W. D. Rees, T. Kamolrat, H. Thi Ngo, I. L. Steffensen, S. R. Gray and A. Tups (2014). "The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases." PLoS One **9**(8): e106159.
- Yang, Q., T. E. Graham, N. Mody, F. Preitner, O. D. Peroni, J. M. Zabolotny, K. Kotani, L. Quadro and B. B. Kahn (2005). "Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes." Nature **436**(7049): 356-362.
- Zaias, J., M. Mineau, C. Cray, D. Yoon and N. H. Altman (2009). "Reference values for serum proteins of common laboratory rodent strains." J Am Assoc Lab Anim Sci **48**(4): 387-390.
- Zemany, L., S. Bhanot, O. D. Peroni, S. F. Murray, P. M. Moraes-Vieira, A. Castoldi, P. Manchem, S. Guo, B. P. Monia and B. B. Kahn (2015). "Transthyretin Antisense

Oligonucleotides Lower Circulating RBP4 Levels and Improve Insulin Sensitivity in Obese Mice." Diabetes **64**(5): 1603-1614.

Zeyda, M. and T. M. Stulnig (2009). "Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review." Gerontology **55**(4): 379-386.

Zhao, G., Z. Li, K. Araki, K. Haruna, K. Yamaguchi, M. Araki, M. Takeya, Y. Ando and K. Yamamura (2008). "Inconsistency between hepatic expression and serum concentration of transthyretin in mice humanized at the transthyretin locus." Genes Cells **13**(12): 1257-1268.

8 Publikation

Fedders, R., M. Muenzner and M. Schupp (2015). "Retinol binding protein 4 and its membrane receptors: a metabolic perspective." Horm Mol Biol Clin Investig **22**(1): 27-37.

9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier für die Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin und die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Schupp für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit. Ich möchte mich zusätzlich für die großartige Betreuung, die Freiheit für eigene Forschungsideen sowie für das immer offene Ohr für Fragen, Probleme und Ratschläge bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Jens Raila, Andrea Hurtienne, Dr. Eddy Rijntjes. Danke für die durchgeführten Messungen im Rahmen meiner Doktorarbeit.

Der AG Schupp möchte ich für die grandiose und lustige Zeit im Labor danken. Ich habe mich in der „Familie Schupp“ sehr wohlfühlt und möchte diese Zeit nicht mehr missen. Ihr seid das beste Laborteam, das ich mir vorstellen kann.

Ich möchte mich ebenso bei den Mitarbeitern des Center for Cardiovascular Research für die Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Bei Anna Pfeffer möchte ich mich besonders für die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit bedanken. Danke für deine wertvolle Zeit.

Meinen Freunden danke ich für ihre Geduld, Unterstützung und Aufmunterung bei der Doktorarbeit.

Danken möchte ich besonders meiner Familie, die mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt hat und mit stets zur Seite stand.

Der Ferdinand und Charlotte Schimmelpfennig-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Ronja Fedders, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 09.03.2018

Ronja Fedders