

# **Die Rolle des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors in adipozytärem Gewebe**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr.med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Simon Bienert**

aus Geilenkirchen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Tim Vilz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2025

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Meinen Eltern.



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	9
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	13
1.1	Grundlagen der Adipositas	13
1.1.1	Fettsäure-Stoffwechsel	14
1.2	Die unterschiedlichen Arten von Fettgewebe	15
1.3	Pathogenese der Adipositas	18
1.4	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	19
1.5	P2Y-Rezeptorfamilie	21
1.6	Zielsetzung	25
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	26
2.1	Materialliste	25
2.1.1	Geräteliste	25
2.1.2	Allgemeine Materialien	26
2.1.3	Allgemeine Chemikalien	27
2.1.4	Chemikalien-Lipolyse	29
2.1.5.	Chemikalien Western Blot	31
2.1.6	Antikörper	32
2.1.7	Chemikalien Proteinisolierung	33
2.1.8	Chemikalien Kalziummessung	34
2.1.9	CRISPR-Konstrukte	34
2.1.10	Chemikalien CRISPR	35
2.1.11	Mausmodell	36
2.1.12	Software-Versionen	37
2.1.13	Statistische Analyse	37
2.2	Reagenzien	37
2.3	Zellkultur	38
2.3.1.1	Murine braune Zellisolation	39

2.3.1.2	Murine weiße Zellisolation	39
2.3.2	Murine Zellaussaat und Differenzierung	40
2.3.2.1	Differenzierung der murinen braunen Adipozyten	40
2.3.2.2	Differenzierung der murinen weißen Adipozyten	41
2.3.3	Aussaat und Passagierung der hMads	43
2.3.4	Aussaat und Passagierung der hWA	44
2.3.5	Humane weiße Zellaussaat	44
2.3.6	Differenzierung der hWA	44
2.4	Lipolyse-Reaktion	45
2.4.1	Stimulation von P2Y12 Rezeptoren mit und ohne Stimulation von adrenergen Rezeptoren	45
2.4.2	Lipolyse mit dem P2Y12-Antagonist PSB 0739	46
2.4.3	Proteinisolation Lipolyse	46
2.5	MeA- und NE - Stimulation: Western Blot pHSL und pERK	47
2.5.1	Stimulation der murinen und humanen Zellen	47
2.5.2	Proteinisolation: Western Blot	48
2.5.3	SDS-PAGE und Western Blot	48
2.6	cAMP-ELISA: Stimulation mit 2MeA und NE	52
2.6.1	Vorbereitung der murinen und humanen Zellen	52
2.6.2	cAMP-ELISA	53
2.7	Messung des intrazellulären Kalziums in mBA	53
2.8	CRISPR	54
2.8.1	Restriktionsverdau	55
2.8.2	Transformation	55
2.8.3	Kontroll-PCR	55
2.8.4	Ethidiumbromid-Kontrolle	56
2.8.5	Mini-Präparation	56
2.8.6	Maxi-Präparation	58
2.8.7	Viruspräparation	58
2.8.8	Murine Zellaussaat CRISPR	59

2.9	<i>Ex vivo</i> Lipolyse	60
2.9.1	Gewebeentnahme	60
2.9.2	Stimulation des adipozytären Gewebes	61
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	62
3.0.1	Rezeptor-Expression in Adipozyten	62
3.0.2	Rezeptor-Expression in adipozytärem Gewebe	63
3.1	Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der <i>in vitro</i> Lipolyse in mBA	64
3.2	Signaltransduktions-Mechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors	65
3.3	Einfluss des intrazellulären Kalzium-Spiegels auf cAMP-Konzentrationen	67
3.4	Inhibition mittels PSB 0739 von mBA <i>in vitro</i>	69
3.5	Einfluss des P2Y12-Rezeptors auf Zelldifferenzierung in mBA und mWA	70
3.6	Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der <i>in vitro</i> Lipolyse in mWA	71
3.7	Verwendung des P2Y12-Inhibitors Ticagrelor <i>ex vivo</i> in WATi	72
3.8	Nachweis der mittels CRISPR/Cas 9 vermittelten Deletion des P2Y12-Rezeptors in mWA	73
3.8.1	Metabolismus der KO-Zellen in mBA	73
3.9	Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der <i>in vitro</i> Lipolyse in hBA	75
3.9.1	Signaltransduktions-Mechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors in hBA	76
3.9.2	Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der <i>in vitro</i> Lipolyse in hWA	77
<b>4.0</b>	<b>Diskussion</b>	80
4.1	Modulation der Rezeptor-Expression	81
4.2	Einfluss des sekundären Botenstoffes cAMP	82
4.3	Intrazelluläre Kalziumkonzentration	82
4.4	Einfluss von P2Y12 auf den adipozytären Metabolismus	83
4.5	HSL als zentrales Enzym der sympathisch stimulierten Lipolyse	84

4.6	Sympathische Stimulation	85
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	90
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	91
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	93
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	94
<b>9.</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b>	109
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	111

## Abkürzungsverzeichnis

2MeA	2-Methylthioadenosindiphosphatrinatriumsalz
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>ANalysis Of VAriance</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N, N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
BME	$\beta$ -Mercaptoethanol
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
COA	Coenzym A
CRISPR/Cas 9	Kurze, gruppierte, sich wiederholende palindromische Sequenzen mit Endonuklease 9 ( <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Endonuklease 9</i> )
DAG	Diacylglycerine
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase ( <i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i> )
FBS	Fetales Bovines Serum
g	Gravitation
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor ( <i>G-Protein Coupled Receptor</i> )
hBA	Humane braune Adipozyten
HBSS	Hanks balancierte Salzlösung ( <i>Hanks` Balanced Salt Solution</i> )
HCL	Salzsäure
HDL	Lipoprotein hoher Dichte ( <i>High Density Lipoprotein</i> )
HEPES	2-(4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)
hMads	Humane adipozytäre Vorläuferzellen ( <i>Human Multipotent Adipose Derived Stem Cells</i> )
hWA	Humane weiße Adipozyten
HSL	Hormonsensitive Lipase
IMBX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
KCl	Kaliumchlorid
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )

MAG	Monoacylglycerine
MALP	Monoacylglycerinlipase
mBA	Murine braune Adipozyten
MYF-5	Myogener Faktor-5
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NE	Noradrenalin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphat Buffered Saline Solution</i> )
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pHSL	Phosphorylierte HSL
PKA	Proteinkinase A
PSB 0739	1-Amino-9,10-dihydro-9,10-dioxo-4-[[4-(phenylamino)-3-sulfophenyl] amino]-2-anthracenschwefelsäurenatriumsalz
Rel	Relative
RPM	Runden pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
Ser	Serin-Bindungsstelle
SH	Sulphydryl

T3	Triiodthyronin
TAG	Triacylglycerine
TC	Ticagrelor
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung ( <i>TRIS Buffered Saline Solution</i> )
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween ( <i>TBS-Tween</i> )
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
UCP-1	Entkoppelndes Protein 1 ( <i>Uncoupling Protein 1</i> )
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte ( <i>Very Low Density Lipoprotein</i> )
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )
WT	Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1 Grundlagen der Adipositas

Adipositas ist von der World Health Organisation (WHO) für Erwachsene definiert worden als ein über  $30 \text{ kg/m}^2$  erhöhter Body-Mass-Index.

Ungefähr 1,9 Milliarden Menschen leiden an Übergewicht (WHO, 2016), von denen etwa 2,8 Millionen Menschen pro Jahr an Komplikationen von kardiovaskulären Erkrankungen oder Diabetes Mellitus Typ 2 versterben (WHO, 2017). Im Jahr 2020 waren 40 Millionen Kinder unter fünf Jahren weltweit bereits übergewichtig (WHO, 2020). Viele weitere Erkrankungen wie Arthrose oder Osteoporose sind ebenso häufig Folgen von Übergewicht. Darüber hinaus wird die Entstehung diverser Malignom-Entitäten wie beispielsweise Endometrium- oder Mammakarzinomen mit Adipositas in Verbindung gebracht (Arnold et al., 2015; Richard, 2016; Hoy et al., 2021).

Adipositas mitsamt ihrer Komplikationen stellt daher eine enorme Belastung für die individuelle Gesundheit auf der einen und auf der anderen Seite auch für das Gesundheitssystem selbst dar. In Deutschland beispielsweise entstanden dem Steuerzahler Kosten in Höhe von circa 63 Milliarden Euro im Jahr 2015 (Effertz et al., 2016). In dieser Zahl sind nicht nur Krankenhausaufenthalte und diverse Therapien sowie Begleiterkrankungen, sondern ebenfalls beispielsweise Verdienstauffälle inkludiert.

Bisher gibt es unterschiedliche Ansätze, krankhaftes Übergewicht zu therapieren, wie beispielsweise verschiedene Diäten, Sportprogramme und medikamentöse Ansätze wie Orlistat (Franks, 2011). Diese Ansätze besitzen vor allem dann einen therapeutischen Nutzen, wenn sich die Adipositas nicht in einem fortgeschrittenen Stadium befindet. Zudem gibt es multiple genetische Faktoren, die von diesen Therapiekonzepten nicht erfasst werden.

Es sind weitere Ansätze zur Prävention und Therapie nötig, um Komorbiditäten zu reduzieren. Um neue Behandlungsmöglichkeiten erschließen zu können, müssen zuallererst die biochemische Struktur und die physiologischen Stoffwechsel-Grundlagen näher betrachtet werden, um daraus die pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen der Adipositas zu erläutern.

### 1.1.1 Fettsäure-Stoffwechsel

Bei Energieüberschuss hängt die weitere Regulation der Fettsäuresynthese hauptsächlich von dem Verhältnis von Kohlenhydraten zu TAG ab. Ist die Nahrung besonders kohlenhydratreich, wird viel Pyruvat gebildet, aus dem Zitrat entsteht, das einen ATP-Überschuss bewirkt und die Aktivität der Fettsäuresynthese steigert (Hudgins et al., 1996). Werden hauptsächlich TAG aufgenommen, muss der Körper die Fettsäuren nicht endogen synthetisieren, sondern kann diese in Form von TAG in weißem adipozytären Gewebe speichern (Jensen-Urstad und Semenkovich, 2012).

Insbesondere Insulin, Glukagon, Kortison sowie (Nor-)Adrenalin kommen besondere Bedeutung zu. Glukagon, Kortison sowie Katecholamine hemmen die Fettsäuresynthese und steigern die Lipolyse, Insulin bewirkt die gegenteiligen Reaktionen. Den Hauptregulationspunkt in der Fettsäuresynthese stellt die Acetyl-CoA-Carboxylase dar, die durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung Adenosinmonophosphat (AMP)-abhängig de- bzw. aktiviert wird. Liegt AMP in ausreichenden Mengen vor, befindet sich der Organismus also im Energiedefizit, wird die Acetyl-Co-Carboxylase durch eine AMP-dependente Kinase phosphoryliert und somit gehemmt. Besteht ein Energieüberschuss, ist also die Zitrat- als auch die ATP-Konzentration erhöht, wird die Acetyl-CoA-Carboxylase dephosphoryliert und somit aktiviert, sodass die Fettsäuresynthese beginnen kann. Bei ausreichend vorhandenem Acyl-CoA, dem Produkt der Fettsäuresynthese, wird diese über eine Endprodukthemmung ebenfalls in ihrer Aktivität gemindert (Qureshi et al., 1975; Foretz et al., 1999; Jensen-Urstad und Semenkovich, 2012).

Bezogen auf die Lipolyse und die Beta-Oxidation bedeutet dies, dass sowohl Glukagon und Kortison als auch Katecholamine diese beiden Prozesse fördern, wohingegen Insulin diese hemmt.

Der verstärkte lipolytische Abbau von Fettsäuren wird vor allem über den Phosphorylierungszustand der hormonsensitiven Lipase gesteuert. Durch erhöhte Aktivität der Adenylatcyclase, die besonders von Katecholaminen, aber auch von Glukagon und Kortison gesteigert wird, wird vermehrt der Botenstoff zyklisches

Adenosinmonophosphat (cAMP) gebildet. Dieser aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA), die die HSL phosphoryliert. Dadurch befindet sich die HSL in aktivem Zustand und spaltet vermehrt DAG in MAG und eine freie Fettsäure, die der Beta-Oxidation zugeführt werden. Insulin bewirkt eine verringerte Bildung von cAMP, sodass in letzter Konsequenz die HSL gehemmt wird (Steinberg und Huttunen, 1972; Holm, 2003). Ein anderer Mechanismus wird über das Membranprotein Perilipin vermittelt, das die TAG vor dem Abbau schützt und durch die aktivierte HSL ebenfalls abgebaut wird (Londos et al., 1999; Carmen und Victor, 2006).

## 1.2 Die unterschiedlichen Arten von Fettgewebe

Fettgewebe lässt sich nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand in drei verschiedene Gruppen unterteilen.

Das abundante Fettgewebe ist das weiße Fett. Der Name „weiß“ stammt aus der histologischen Betrachtung des Gewebes, da sich die Fettvakuolen unter dem Lichtmikroskop als weiß mit einem randständigen Kern darstellen. Die Adipozyten des weißen Fettgewebes sind univakuolär, besitzen also eine große Fettvakuole (Nechad et al, 1983; Frontini und Cinti, 2010). Weißes Fettgewebe entsteht embryonal aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Sarjeant und Stephens, 2012). Es findet sich vor allem als viszerales Fett um die Bauchorgane verteilt beziehungsweise als in das Omentum majus eingelagerte „Bauchfett“. Darüber hinaus ist es Bestandteil der Subkutis sowie der Submukosa und dient dort als bewegliche Verschiebeschicht.

Die Hauptfunktion des weißen Fetts besteht in der Speicherung von Energie in Form von TAG in Fetttröpfchen, die bei Energiemangel bereitgestellt werden können. Gleichzeitig dient weißes Fett als Isolierschicht, um übermäßigen Verlust von Wärmeenergie zu verhindern, und als Polsterschicht zum Beispiel zwischen den viszerale Organe. Außerdem ist es hormonell aktiv, wie beispielsweise durch die Sekretion von Leptin und Adiponektin (Pfeifer und Hoffmann, 2015).

Leptin ist entscheidend an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt, indem es von weißen Adipozyten sezerniert wird und zentral im Nukleus Arcuatus des Hypothalamus' das Hungergefühl reduziert (Bjorbaeck et al., 1997; Bjorbaeck und Feuer, 1999) Darüber

hinaus besitzt Leptin immunmodulatorische Funktionen, wie etwa in Form von Unterstützung der Immunantwort auf Impfungen (Deng et al., 2021). Adiponektin ist ein Proteohormon, das neben den weißen Adipozyten ebenfalls plazentar gebildet wird und eine enge Verknüpfung zur Insulinsekretion aufweist. Bei erhöhter Insulinsekretion wird mehr Adiponektin ausgeschüttet und umgekehrt. Adiponektin selbst erhöht die Insulinsensitivität und hemmt die hepatische Glukoneogenese, wirkt in dieser Hinsicht synergistisch zu Insulin (Berg et al., 2001). Durch seine Funktionen ist Adiponektin Ziel derzeitiger Forschung in Bezug auf seine Rolle in der Pathogenese des Diabetes Mellitus Typ 2 sowie der Atherosklerose.

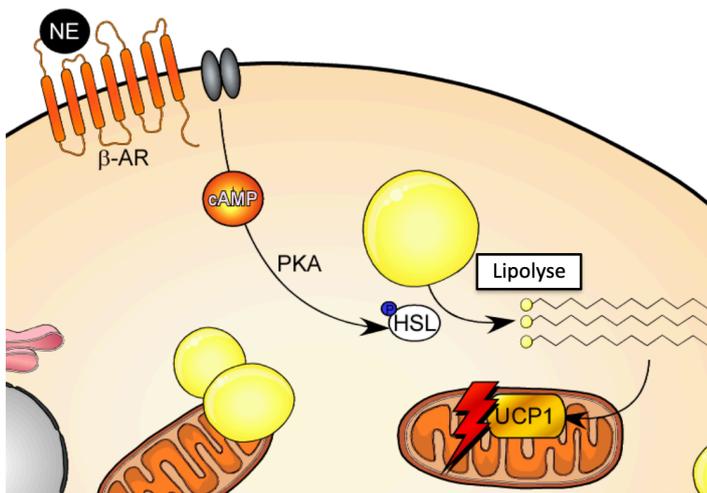
Die zweite Art von Fettgewebe ist das braune Fett.

Die Bezeichnung „braun“ rührt in diesem Fall ebenfalls von der histologischen Betrachtung her, da braune Adipozyten bei Betrachtung durch das Lichtmikroskop bräunlich wirken. Außerdem sind sie plurivakuolär, besitzen im Gegensatz zu weißen Adipozyten ergo keine einzelne große Vakuole, sondern multiple kleine. Die Färbung lässt sich durch den hohen Anteil an Mitochondrien im braunen Fettgewebe erklären.

Embryonal entwickelt es sich hauptsächlich aus myogenen Faktor-5-exprimierenden (Myf5) Vorläuferzellen (Seale et al., 2008).

Zudem weisen braune Adipozyten eine hohe Dichte an sympathisch innervierten Nervenendigungen sowie eine starke Vaskularisierung auf. Das erhöhte Vorkommen der Mitochondrien ist nötig, damit braune Adipozyten ihrer Hauptaufgabe nachkommen können, nämlich der zitterfreien Thermogenese, die der Generation von Wärmeenergie dient (Abb. 1) (Enerbäck, 2010). Es wurde gezeigt, dass vor allem Neugeborene dieses braune Fett besitzen, hauptsächlich interskapular (Enerbäck, 2010). Andere Studien fanden mittels Positronen-Emissions-Topographie-Computertomographie (PET-CT) heraus, dass auch Erwachsene aktives braunes Fettgewebe besitzen, ebenfalls interskapular und zervikal. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass schlankere Personen (bezogen auf den BMI) ebenfalls aktiveres braunes Fettgewebe besitzen als übergewichtige Menschen (Nedergaard 2007, Salto 2009, Cypess et al, 2009; van Marken Lichtenberg et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

Braune Adipozyten sind in der Lage, die Atmungskette von der ATP-Synthase zu entkoppeln. Diese nutzt den Rückstrom der in den Intermembranraum der Mitochondrien gepumpten Protonen zurück in die Mitochondrienmatrix, um aus der dabei erzeugten Energie ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) zu generieren. Das für das braune Fettgewebe spezifische Protein Thermogenin (Uncoupling Protein 1, UCP-1) verhindert diesen Ablauf. Dadurch wird der Protonenfluss nicht zur Synthese von ATP genutzt, sondern zur Gewinnung von Wärmeenergie (Cannon und Nedergaard, 2004). Die hierfür benötigten Fettsäuren stammen einerseits sowohl aus dem Speicher der braunen Adipozyten selbst, werden aber vor allem durch Lipoproteine bzw. durch frei im Blut zirkulierende Fettsäuren bereitgestellt (Bartelt et al., 2012).



**Abb. 1: Metabolismus eines braunen Adipozyten**

Bei (nor)adrenerger Stimulation an  $\beta$ -Rezeptoren ( $\beta$ -AR) wird die Adenylatcyclase stimuliert und vermehrt cAMP gebildet, durch die die PKA aktiviert wird. Dadurch wird die HSL phosphoryliert und TAGs werden zu Glycerin und freien Fettsäuren abgebaut. Diese werden hauptsächlich im Zitronensäurezyklus verstoffwechselt, der Protonengradient wird jedoch nicht zur ATP-Synthese genutzt, sondern durch UCP-1 durch Entkoppeln der ATP-Synthase zum Erzeugen von Wärmeenergie.

Abbildung erstellt von Frau Dr. Laia Reverte-Salisa.

Eine Zwischenstellung zwischen den beiden genannten Geweben nimmt das sogenannte beige Fettgewebe ein. Beige Fettzellen sind Adipozyten, die Eigenschaften von braunem Fettgewebe wie bspw. das eben erwähnte Thermogenin aufweisen, die allerdings

innerhalb von Verbänden aus weißen Adipozyten zu finden sind (Pfeifer und Hoffmann, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass diese Adipozyten im Gegensatz zu braunem Fettgewebe nur partiell von myf-5-positiven Zelllinien abstammen (Gurmaches et al., 2012). Beige Adipozyten stammen vermutlich von weißen Adipozyten ab, die durch geeignete Stimulation unter Vermittlung von Transkriptionsfaktoren wie PPAR $\gamma$ , PRDM 16 und PGC1 $\alpha$  beginnen, vermehrt Mitochondrien und UCP-1 zu bilden. Die geeignete Stimulation kann durch Kälteexposition, erhöhtes Noradrenalin-Angebot oder durch eine Kombination aus beidem erfolgen. Eine wichtige Rolle bei der Zell-Redifferenzierung spielen cAMP und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (Loncar, 1991; Ishibashi und Seale, 2010; Reverte-Salisa et al., 2019). Darüber hinaus fungiert Adenosin als wichtiger Transmitter in der noradrenergen Aktivierung von braunem adipozytären Gewebe (BAT), (Gnad et al., 2014).

Die Möglichkeit, weißes Speicherfett in braunes, thermoaktives Gewebe umzuwandeln und so eine Gewichtsreduktion zu erreichen sowie das Risiko für die Entwicklung von Sekundärkomplikationen wie Diabetes Mellitus Typ 2 zu reduzieren, stellt einen möglichen weiteren Ansatzpunkt für die Therapie der Adipositas dar.

### 1.3 Pathogenese der Adipositas

Zum derzeitigen Standpunkt der Wissenschaft stellt Adipositas eine schwache, chronische Entzündung des weißen Fettgewebes und konsekutiv auch des gesamten Körpers dar (Hotamisligil, 2006). Wie erwähnt stellt die Energie-Speicherung eine der zentralen Funktionen des weißen Fettgewebes dar. Bei übermäßiger Fettspeicherung im Rahmen von Übergewicht oder einer Adipositas werden Anpassungsvorgänge in weißen Adipozyten induziert, um das vermehrte Fettangebot aufnehmen zu können und gleichzeitig Organe vor pathologischen Fetteinlagerungen zu schützen. Dieser Vorgang ist physiologisch. Wird jedoch die Fettaufnahme nicht vermindert, sind die Kompensationsmechanismen insuffizient, sodass ein pathologischer Prozess mit daraus resultierenden Organschädigungen resultiert.

Der physiologische Anpassungsprozess der weißen Adipozyten stellt eine Inflammation des Fettgewebes dar. Ausgelöst werden kann diese über verschiedene Mechanismen wie

etwa eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren oder die mechanische Beanspruchung der Zellmembran durch Zellhypertrophie.

Diese Prozesse dienen der vorübergehenden physiologischen Adaptation des Fettgewebes an das übermäßige Lipidangebot. Besteht dieses dauerhaft, wird auch die adipozytäre inflammatorische Reaktion unterhalten, die chronifiziert und pathophysiologische Umbauprozesse induziert. Die durch den vermehrten zellulären Stress ausgelöste chronische Entzündung des Fettgewebes bedingt auf diesem Wege verschiedene Auswirkungen auf den menschlichen Organismus.

Die übermäßige Lipogenese soll gehemmt und die Glukagon-vermittelte Lipolyse verstärkt werden, um so einer übermäßigen Fettakkumulation entgegenzuwirken. Dadurch steigt die Insulinresistenz (Klöting et al., 2010), hauptsächlich die der weißen Adipozyten sowie der Skelettmuskelzellen, ergo der Zellen, die auf den insulinbedingten Einbau von Glukosetransporter 4 (GLUT 4) in die Phospholipiddoppelschicht angewiesen sind. Anfänglich ist eine körpereigene Kompensation durch gesteigerte Insulin-Ausschüttung möglich. Diese verstärkt allerdings die vorhandene Insulinresistenz und die Ausschüttung wird im zeitlichen Verlauf schwächer, da zunehmend  $\beta$ -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas infolge der chronischen Inflammation sowie aufgrund der Lipoglucotoxizität zerstört werden (Hotamisligil, 2006).

#### 1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind membranständige metabotrope Rezeptoren. Das heterotrimere G-Protein besteht aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit. Die letzteren beiden dienen hauptsächlich der Bindung des G-Proteins an die Zellmembran, entscheidend für die Signaltransduktion ist die  $\alpha$ -Untereinheit. Binden Liganden wie beispielsweise Katecholamine an adrenerge Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembran, kommt es zu einer Konformationsänderung der  $\alpha$ -Einheit, die zuvor Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat und durch die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) in einen aktiven Zustand überführt wird (Weis und Kobilka, 2018). Es gibt drei Subtypen der GPCR.

$G_q$ -Rezeptoren, die ihre Effekte vor allem über die Regulation des intrazellulären Kalzium-Gehalts vermitteln, finden sich zum Beispiel in den vegetativen Ganglien von Sympathikus und Parasympathikus (Klepac et al., 2016).

Des Weiteren gibt es  $G_s$ - bzw.  $G_i$ -gekoppelte Membranrezeptoren, die ihre Signaltransduktion über die Steuerung der cAMP-Spiegel vermitteln. In diesen Fällen reguliert die  $\alpha$ -Untereinheit die Adenylatcyclase; bei  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren wird die Adenylatcyclase aktiviert, bei  $G_i$ -vermittelten Reaktionen wird sie gehemmt. Durch die Adenylatcyclase wird die Aktivität der PKA reguliert, die ihrerseits andere Proteine bzw. Enzyme phosphorylieren bzw. bei Hemmung dephosphorylieren können (Klepac et al., 2016). Ein Beispiel für das von der Proteinkinase regulierte Enzym ist die oben erwähnte HSL.

Dementsprechend spielen GPCR, insbesondere  $G_s$ - und  $G_i$ -, eine wichtige Rolle im adipozytären Metabolismus. Adenosin spielt als Ligand des  $G_s$ - gekoppelten A<sub>2A</sub>-Rezeptors eine wichtige Rolle in der Aktiveringung von braunem Fettgewebe (Gnad et al., 2014). Dieser Rezeptor gehört zur Familie der purinergeren Rezeptoren, zu denen die P<sub>1</sub>-, P<sub>2X</sub>- und P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren gehören. P<sub>2X</sub> werden via ATP aktiviert und dienen als Ionenkanal-gesteuerte Rezeptoren bspw. im kardiovaskulären System. P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren beeinflussen Stoffwechselprozesse im menschlichen Körper betont im zentralnervösen System sowie in der Hämostase (Jacobson et al., 2008).

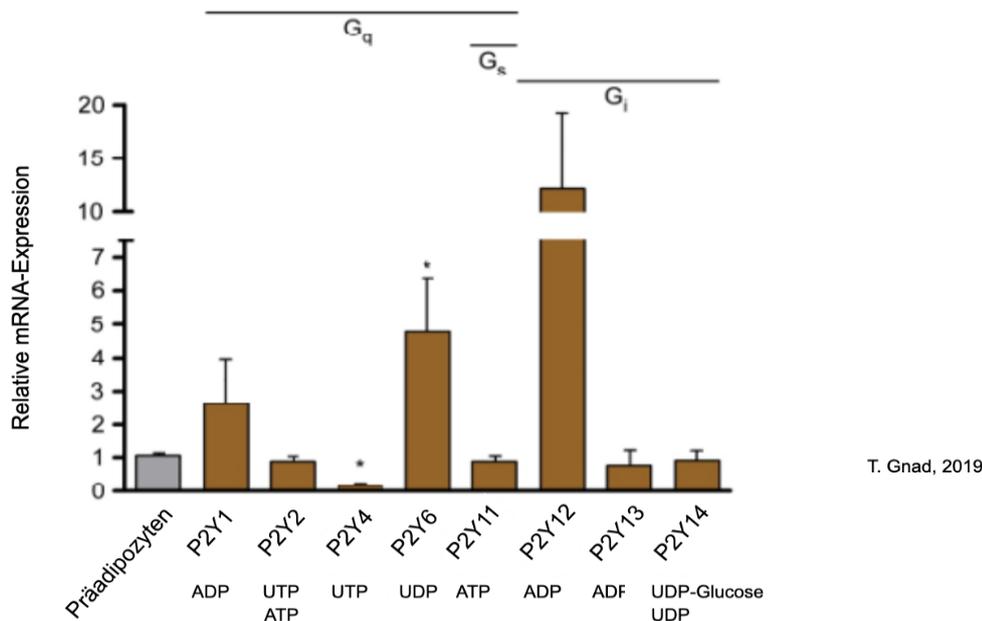
GPCR spielen hingegen ebenfalls eine entscheidende Rolle im Rahmen der Adipositas.

Durch die verminderte Insulinsekretion entsteht eine zunehmende Katecholaminresistenz, besonders des  $\beta$ -2-Rezeptors, um die vorhandenen Energiespeicher zu schützen, da die anabole Wirkung des Insulins zur Synthese von Fettsäuren entfällt. (Reynisdottir et al., 1995; Bougneres et al., 1997; Horowitz et Klein, 2000). Katecholamine sind jedoch entscheidend beteiligt an der Phosphorylierung der oben genannten HSL, da sie den cAMP-Spiegel durch Aktivierung von GPCR im Fettgewebe deutlich erhöhen und so die Lipolyse steigern.

Die Verbrennung von übermäßigem Fett im Rahmen einer Adipositas ist hingegen essenziell für die Gewichtsreduktion.

Dadurch stellt die cAMP-Konzentration im Fettgewebe einen zentralen Regulationspunkt dar, der verschiedenen Einflussfaktoren - wie etwa der Aktivität von GPCR - unterliegt.

### 1.5 P2Y-Rezeptorfamilie



#### Abb. 2: P2Y-Rezeptorexpression in Vorläuferzellen und in ausdifferenzierten murinen braunen Adipozyten (mBA)

Die verschiedenen P2Y-Subtypen werden vornehmlich in ausdifferenzierten mBA exprimiert, drei Typen treten hierbei hervor: P2Y2, P2Y6 und P2Y12. P2Y2 und P2Y6 sind bereits wissenschaftlich bezüglich ihrer Rolle im adipozytären Gewebe examiniert worden, P2Y12 ist bisher lediglich im Hinblick auf seinen regulatorischen Funktionen im Rahmen der Hämostase untersucht worden.

Daten bereitgestellt von Dr. Thorsten Gnad.

Die P2Y-Rezeptoren gehören zu den membranständigen Rezeptoren. Die P2Y-Familie umfasst acht Subtypen (Abb. 2). Die G-Protein abhängige Kopplung variiert innerhalb der Subtypen stark, so ist zum Beispiel P2Y1 G<sub>q</sub>, P2Y6 sowohl G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>- und P2Y12 G<sub>i</sub>-gekoppelt (Tab. 1). Darüber hinaus unterscheiden sich ebenso die purinergen Liganden der P2Y-Rezeptoren (von Kügelgen, 2006).

**Tab. 1:** P2Y-Rezeptoren

Rezeptor	Ligand	Funktion
P2Y1	ATP/ADP	Astrozyten-Regulation
P2Y2	UTP	Astrozyten-Regulation
P2Y4	UTP	Intestinale Regulation
P2Y6	UDP	Regulation der Nahrungsaufnahme
P2Y11	ATP	Immunsystemmodulation
P2Y12	ADP	Thrombozytenaggregation
P2Y13	ADP	Hämostase

P2Y-Rezeptoren besitzen wichtige Regulatorfunktionen sowohl im neuronalen Gewebe als Membranrezeptoren von Mikroglia (Haynes et al., 2006) sowie als Mediatoren der Hämostase auf Thrombozyten. Besonders hervorzuheben ist hierbei der Rezeptor P2Y12 als Bestandteil der Reaktionskette der primären Blutgerinnung (Hollopeter et al., 2001).

Nach Bindung von ADP an den P2Y12-Rezeptor wird aufgrund der  $G_i$ -Kopplung die Aktivität der Adenylatcyclase gehemmt und somit der cAMP-Spiegel gesenkt. Dies hat zur Folge, dass die Proteinkinase B - auch Akt genannt- phosphoryliert und aktiviert wird. Dadurch wird die ADP-Sekretion aus den Delta-Granula der Thrombozyten gesteigert, um weitere Thrombozyten zu aktivieren (Brien et al., 2019).

Aufgrund der Bedeutung für die primäre Hämostase ist P2Y12 zu einem Ziel der pharmakologischen Intervention bezogen auf die Thrombozytenaggregation geworden. Bekannte Vertreter der P2Y12-Inhibitoren sind Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor, die beispielsweise Anwendung in der Therapie der koronaren Herzkrankheit (KHK) oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) finden (Michelson, 2010).



## 1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die metabolischen Funktionen des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors sowohl in verschiedenen murinen als auch in humanen Fettzellen untersucht werden. Diesbezüglich gibt es bisher keine Studien. Bekannt ist, dass P2Y<sub>12</sub> ein Gi-gekoppelter Rezeptor ist und dementsprechend die intrazellulären cAMP-Spiegel senkt. In Studien bezogen auf P2Y<sub>2</sub> (Ali et al., 2018) wird beschrieben, dass der Einfluss auf die basale Lipolyse in humanen weißen Adipozyten über den Einstrom von Kalzium und einer dadurch bedingten Suppression der Adenylatcyclase vermittelt wird. Durch die Aktivierung von P2Y<sub>12</sub> besteht die Möglichkeit, dass die Fettverbrennung gehemmt und die Fettakkumulation gesteigert wird.

Hierbei soll überprüft werden, inwiefern die Aktivierung des Rezeptors durch ein synthetisches ADP-Analogon die zelluläre Fettstoffwechselung beeinflusst, wie frisch entnommenes murines Fettgewebe auf die Stimulation reagiert, wie der Phosphorylierungszustand der hormonsensitiven Lipase beeinflusst wird und welche intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen aktiviert werden. Außerdem soll betrachtet werden, ob P2Y<sub>12</sub>-Inhibitoren Auswirkungen auf die Aktivität des Rezeptors in Fettgewebe haben. Mit Hilfe des CRISPR/Cas 9-Systems (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Endonuklease 9) in murinen Zellen soll untersucht, ob sich eine verringerte Expression des Rezeptors positiv auf die Fettverbrennung und die Expression von UCP-1 auswirkt. Die Auswirkungen der Stimulation mit einem ADP-Analogon soll anschließend ebenfalls sowohl in humanen weißen als auch in humanen braunen Adipozyten überprüft werden.

Durch die Betrachtung von P2Y<sub>12</sub> in Fettgewebe soll eine mögliche weitere Zielstruktur als Ansatzpunkt für eine pharmakologische Therapiemöglichkeit der Adipositas und ihrer Folgeerkrankungen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialliste

#### 2.1.1 Geräteliste

**Tab. 2:** Geräteliste

Name	Hersteller
Analoger Tuben Roller SRT6	Stuart®, Staffordshire, Großbritannien
Autoklav	System GmbH, Linden, Deutschland
BioPhotometer® D30	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Elektrophorese Netzgerät: EV 202	Consort™, Milford Haven, Großbritannien
Ethidiumbromid-Elektrophorese-Gerät	Bio-Rad, Hercules, USA
Flockeneisbereiter: Scotsman AF 20	Scotsman Ice System, Vernon Hills, USA
Gefrierschränke	Siemens, Berlin/München, Deutschland
Heizplatten-Rührer SB 162-3	Stuart®, Staffordshire, Großbritannien
Inkubator: HERACELL™ 150i	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Konfokalmikroskop: ZEISS LSM 900	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Kühlschränke	Siemens, Berlin/München, Deutschland
Mikroskop: Leica 80/0.30	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Pipetten (elektronisch): Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipetten (manuell): Rainin™ Pipetlite XLS	Mettler Toledo, Columbus, USA
Rollenmischer RM 5	VWR™ International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sterile Werkbank MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer®	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

Name	Hersteller
Ultraschall-Homogenisator: Sonopuls	Bandeln, Berlin, Deutschland
Ultratiefkühlschrank -80	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Vortex-Mischer	Velp® Scientifica, Usmate, Italien
Waage N-059-0066	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad WNB 45	Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach, Deutschland
Western Blot Detektionsgeräte: Odyssey® XF Chemifluoreszenz	LI-COR Biotechnology, Nebraska, USA GE, Boston, USA
Western Blot-System	Bio-Rad, Hercules, USA
Zellkultur-Pumpen/Neuberger	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Zellzähler Countess™	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Zentrifuge 5810R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
EnSpire™ Plate Reader	PerkinElmer, Waltham, USA
Milli-Q® Direct Milipore	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2 Allgemeine Materialien

**Tab. 3:** Allgemeine Materialien

Name	Hersteller	Katalognummer
Aufziehspritzen Braun Injekt	B.Braun SE, Melsungen, Deutschland	4606027V
Eppendorf-Tuben	Sarstedt AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland	72.706-.400
Glasgefäße	VWR™ International GmbH, Darmstadt, Deutschland	-

Name	Hersteller	Katalognummer
Greiner Bio-One CELLSTAR™ Zellkultur- Platte	Fisher scientific, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	10345791
Handschuhe Peha-Soft	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland	942 207
Kryo-Eppendorf-Tuben	Sarstedt AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland	72.279.992
Küvetten BioPhotometer	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	XK20
Mr.Frosty	Nalgene, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	10110051
Pipettenaufsätze Rainin™	Mettler Toledo, Columbus, USA	-
Runde Aussähplatten	Sarstedt AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland	83.3902
Schraubröhren	Sarstedt AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland	62.547.254
TC-Flaschen 75	Sarstedt AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland	83.3911.302
TC-Flaschen 175	Sarstedt AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland	83.3912
Zellplatten (braune Adipozyten)	Sarstedt AG&Co.KG, Nürnbrecht, Deutschland	83.392112
Zellplatten (weiße Adipozyten)	TPP, Trasadigen, Schweiz	92412

### 2.1.3 Allgemeine Chemikalien

**Tab. 4:** Allgemeine Chemikalien

Name	Hersteller	Katalognummer
Agarpuder	VWR™ International GmbH, Darmstadt, Deutschland	20767.298

Name	Hersteller	Katalognummer
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A8966
Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B4639
Desoxycholsäure-Na	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	34842
Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F7524
Glucose	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	X997.2
Glycin	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	3908.3
Hefeextrakt	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	2904.3
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P1190
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	3904.1
Milipore Wasser	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	-
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	T106.2
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	2326.2
Nonident P40	Fluka™ Analytical, Honeywell, Seelze, Deutschland	74389
Pantothensäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5155
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland	P 06-07100
Peptone	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	8986.2

Name	Hersteller	Katalognummer
Ribonuclease A (Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R4642
Trypsin-EDTA 0,05% Phenol Red	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	25300054
Trypsin Neutralizer Solution	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	R002100
TRIS	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	AE15.3

#### 2.1.4 Chemikalien-Lipolyse

**Tab. 5:** Chemikalien Lipolyse

Name	Hersteller	Katalognummer
2-Methyl-ADP (2MeA)	Tocris, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	1624
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I5879-56
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D4902
Differenzierungsmedium hWA	PromoCell® GmbH, Heidelberg, Germany	C-27437
Dimehtylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	A994.2
Ernährungsmedium hWA	PromoCell® GmbH, Heidelberg, Germany	C27431
Fettsäurefreies BSA (fBSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A7030
Freie Glycerol Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F6428
Humane weiße Prädipozyten (hWA)	PromoCell® GmbH, Heidelberg, Germany	C-12735

Name	Hersteller	Katalognummer
Humaninsulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I9278
Humaner rekombinanter Fibroblasten- Wachstumsfaktor-2 (hFGF2)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	01-106
Hungermedium	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	21603-029
Isofluran IsoFlo®	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland	TU 061219
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	6781.1
Kollagenes Typ II	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, USA	LS004177
Mesh	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	NY3002500
Noradrenalin (NE)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A9512
PSB 0739	Tocris, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	3983
Puromycin	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	A11138-03
Rosiglitazon	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R2408
Standard Reagenz Lipolyse	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G77393
Steriles Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	W3500
Supplemente Differenzierungsmedium hWA	PromoCell® GmbH, Heidelberg, Germany	C-39436
Supplemente Ernährungsmedium (hWA)	PromoCell® GmbH, Heidelberg, Germany	C-39438

Name	Hersteller	Katalognummer
Supplemente Wachstumsmedium (hWA)	PromoCell® GmbH, Heidelberg, Germany	C-39425
Ticagrelor	Tocris, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	6864/10
Transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T4132
Triiodthyronin (T3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T6397
Trypan Blue	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T8154
Wachstumsmedium (humane braune Adipozyten, hBA)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	11880-028
Wachstumsmedium (humane weiße Adipozyten, hWA)	PromoCell® GmbH, Heidelberg, Germany	C-27411
Wachstumsmedium (murine braune Adipozyten, mBA)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	61965-026
Wachstumsmedium (murine weiße Adipozyten, mWA)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	31966-021

#### 2.1.5. Chemikalien Western Blot

**Tab. 6:** Chemikalien Western Blot

Name	Hersteller	Katalognummer
Acrylamid	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	3029.1
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	9592.2
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M3148

Name	Hersteller	Katalognummer
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A7030
Bromphenolblau	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	115-39-9
Femto-Substrat Western Blot	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	34095
Glycerol	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	50-99-1
Isopropanol	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	6752.4
Methanol	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	8388.6
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T7024
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	K305.1
Nitrocellulose-Membran	Amersham, Cytiva, Marlborough, USA	10600002
Trockenmilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A0830
Tween 20	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	9127.2
Wasser Milipore	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	-
WB-Bandenleiter	New England BioLabs® Inc.	P7719S
Whatman-Papier	Whatman plc, Cytiva, Marlborough, USA	10426892

### 2.1.6 Antikörper

**Tab. 7:** Antikörper

Name	Hersteller	Katalognummer	Ursprung	Verdünnung
Anti-Hase Zweitantikörper 800nM LI-COR	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	5151S	Hase	1:10000
Anti-Hase Zweitantikörper Chemifluoreszenz	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	7076S	Hase	1:10000
Calnexin	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	2433S	Hase	1:1000
P2Y12	Alomone Labs, Jerusalem, Israel	APR-012	Hase	1:1000
Phosphorylierte extrazellulär regulierte Kinase (pERK)	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	9101S	Hase	1:1000
pHSL	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	4126S	Hase	1:1000
tERK	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	9102S	Hase	1:1000
tHSL	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	4107S	Hase	1:1000
Tubulin	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	5568S	Hase	1:1000
UCP-1	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA	14670S	Hase	1:1000

### 2.1.7 Chemikalien Proteinisolierung

**Tab. 8:** Chemikalien Proteinisolierung

Name	Hersteller	Katalognummer
cOmplete™, EDTA freier Proteasehemmer-Cocktail	Roche Holding AG, Basel, Schweiz	4693132001
Natriumfluorid (NaF)	VWR™ International GmbH, Darmstadt, Deutschland	27860231
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S6508
Coomasie-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.154.440.25

### 2.1.8 Chemikalien Kalziummessung

**Tab. 9:** Chemikalien Kalziummessung

Name	Hersteller	Katalognummer
μ-Slide Ibidi-Platten (8 Loch)	Ibidi® GmbH, Gräfelfing, Deutschland	80826
Thapsigargin	MedChem Express, Monmouth, USA	HY-13433
Ionomycin	Cayman Chemical Company, Michigan, USA	11932
2-(4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) (HEPES)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz	17-737E
Fluo4-Direct Dye	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	F10471
HBSS	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	14025-092

### 2.1.9 CRISPR-Konstrukte

**Tab. 10:** CRISPR-Konstrukte

Sequenz	Bezeichnung	Hersteller
5' CACCGACCGCTCCTGA AGACCACC	P2Y12-CRISPR 1A	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
5' AAACGGTGGTCTTCAG GTAGCGGTC	P2Y12-CRISPR 1B	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
5' CACCGGGTCTTCAGGT AGCGGTCAA	P2Y12-CRISPR 2A	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
5' AAAGTTGACCGCTACC TGAAGACCC	P2Y12-CRISPR 2B	Microsynth AG, Balgach, Schweiz

## 2.1.10 Chemikalien CRISPR

**Tab. 11:** Chemikalien CRISPR

Name	Hersteller	Katalognummer
CutSmart® Puffer	New England BioLabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland	B7204S
NucleoBond Xtra Maxi EF	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	740424.50
Nukleasefreies Wasser	New England BioLabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland	B1502A
RiboATP	New England BioLabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland	P0756S
p-lenti-CRISPR-V2	Addgene, Watertown, USA	52961
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland	B0202A

Name	Hersteller	Katalognummer
Restriktionsenzym Esp3 I	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	10374280
XL-1 Blue Bakterien	Agilent, Santa Clara, USA	200249
LB-Medium	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	X964.3
Ampicilin	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	K029.2
Ethidiumbromid	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	7870.1
OneTaq-Polymerase	New England BioLabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland	N0486S
Forward-Primer (hU6)	Addgene, Waterton, USA	-
Poly-L-Lysin	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	A3890401
Wachstumsmedium (mBA)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	61965-026
HBSS	Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	14175-046
Sucrose (aus Saccharose)	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	4621.1
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	VWR™ International GmbH, Darmstadt, Deutschland	22.317.297
N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure (BES)	Carl Roth® GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	9134.1

### 2.1.11 Mausmodell

**Tab. 12:** Mausmodell

Name	Typ	Bezugs-Labor
------	-----	--------------

C57BL76J	Wildtyp	Charles River
----------	---------	---------------

### 2.1.12 Software-Versionen

**Tab. 13:** Software-Versionen

Name	Version	Anbieter
Windows	Windows 10	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad	GraphPad 6	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Canvas Draw	Canvas 11	Canvas GFX, Inc., Boston, USA
Image J	2.1.0	
Pages	10.1	Apple Inc., Cupertino, USA
PowerPoint	16.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Keynote	10.1	Apple Inc., Cupertino, USA

### 2.1.13 Statistische Analyse

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism Version 6. Für zwei Stichproben wurde der zweiseitige Student's t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Bei mehr als drei Gruppen wurde der ANOVA Test mit Tukey-Korrektur verwendet. Die Signifikanzgrenze des  $\alpha$ -Fehlers liegt bei 5% und wurde wie folgt dargestellt: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . Mittelwerte werden mit dem Standardfehler (SEM) angegeben.

### 2.2 Reagenzien

Aufgeführt unter der jeweiligen Methode.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1.1 Murine braune Zellisolation

#### Isolationspuffer

NaCl	123 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,3 mM
Glucose	5 mM
HEPES	100 mM
Add. 1000 ml steril filtriertes Wasser	

#### Verdauungs-Puffer:

BSA	1,5 %
Kollagenase II	2 mg/ml

BSA und Kollagenase II werden im Isolationspuffer gelöst und steril filtriert.

#### BA- Isolationskulturmedium

FBS	10 %
HEPES	10 nM
Insulin	4 nM
P/S	1 %
Natriumascorbat	25 µg/ml
T3	4 nM

Die Substanzen wurden zu DMEM (Hochglykämisch, GlutaMAX™ Gibco, Kat. Nu. 61965) hinzugefügt.

Das interskapulare braune Fettgewebe wurde von neugeborenen Mäusen entnommen und jedes Fettläppchen wurde jeweils in eine 1,5 ml Eppendorf-Tube mit 0,5 ml Isolationspuffer überführt. Danach wurde das Gewebe klein geschnitten und in Digestionspuffer überführt. Anschließend erfolgt die 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad.

Nach 30 Minuten sollte eine homogene Suspension ohne sichtbare Gewebestücke entstanden sein. Diese Suspension wurde durch ein 100 µm Nylonmesh steril filtriert. Diese Suspension wurde nun durch ein 30 µm Nylonmesh erneut filtriert. Um die Zellen zu pelletieren, wurde das Filtrat für 10 Minuten bei 700 g zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand abgesaugt und das Zellplättchen in Wachstumsmedium resuspendiert (Passage 1). Die Zellen wurden nun auf einer 6-Loch-Platte ausgesät und bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt.

Nach einem Tag wurden die Präadipozyten mit 200 ng Simian-Virus 40 (SV40) Large-T-Antigen immortalisiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 90 % erreicht haben. Die Zellen wurden nun mit Hilfe von Trypsin gelöst und auf zwei 10 cm-Schalen neu verteilt (P2). Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 nach demselben Verfahren weiter expandiert. Die für die Experimente verwendeten Zellen waren in P4-P6. Resuspendierte Zellen in BA-Wachstumsmedium mit 10 % DMSO wurden 24 Stunden lang bei -80 °C gelagert und anschließend bei -196 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 2.3.1.2 Murine weiße Zellisolation

Verdauungs-Puffer:

BSA	0,5 %
Kollagenase II	1,5 mg/ml

BSA und Kollagenase II wurden in DMEM (Hochglykämisch, GlutaMAX™, Pyruvate Gibco, Kat.Nu. 31966) gelöst.

mWA-Wachstumsmedium:

FBS 10 %

P/S 1 %

FBS und P/S wurden zu DMEM hinzugefügt (Hochglykämisch, GlutaMAX™, Pyruvate Gibco, Kat.Nu. 31966)

Subkutanes weißes Fettgewebe wurde von acht bis zwölf Woche alten Wildtyp-Mäusen entfernt. Danach wurde das Gewebe von drei bis vier Mäusen klein geschnitten, in den Isolationspuffer überführt und bei 37 °C im Wasserbad für 30-45 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die entstandene Lösung bei 1000 Runden pro Minute (rpm) für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellplättchen wurde in 2 ml WA-Wachstumsmedium resuspendiert und durch ein 100 µm-Nylonmesh steril filtriert. Anschließend wurde die Suspension schließlich in T175-Kulturflaschen in WA-Wachstumsmedium ausgesät. Die Zellen wurden in WA-Wachstumsmedium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bis die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten. Die Zellen wurden nun mit Hilfe von Trypsin gelöst, gesammelt und 10 Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in WA-Wachstumsmedium mit 10 % DMSO in einer Dichte von 1 Million Zellen pro ml resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen in Kryofläschchen bei -80 °C gelagert und nach 24 h für eine längere Zeit bei -196 °C gelagert.

### 2.3.2 Murine Zellaussaat und Differenzierung

#### 2.3.2.1 Differenzierung der murinen braunen Adipozyten

## mBA-Wachstumsmedium

## DMEM

P/S	1 %
FBS	5 %

## mBA-Induktionsmedium

## mBA-Differenzierungsmedium

## IBMX

## Dexamethason

## mBA-Differenzierungsmedium

## DMEM

P/S	1 %
FBS	5 %

## T3

## Insulin

Immortalisierte braune Adipozyten wurden in 12-Loch-Platten in einer Dichte von circa 80.000 Zellen pro Loch ausgesät. Die Zellen verblieben bis zur Konfluenz im BA-Wachstumsmedium, das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Bei erreichter 80-90 % Konfluenz (Tag -2) wurden die Zellen für 48 h in BA-Differenzierungsmedium gezüchtet. Nach zwei Tagen wurden die präadipozytären Zellen für weitere 48 h mittels Induktionsmedium induziert (Tag 0). Von Tag 2 bis 7 wurden die Zellen nun wieder in Differenzierungsmedium inkubiert, das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Für alle Experimente wurden vollständig differenzierte murine braune Adipozyten verwendet, außer es wurde explizit erwähnt.

## 2.3.2.2 Differenzierung der murinen weißen Adipozyten

## WA-Wachstumsmedium:

FBS 10 %

P/S 1 %

DMEM (Hochglykämisch, GlutaMAX™, Pyruvate, Gibco, Kat.Nu. 31966)

## WA-Induktionsmedium

## WA-Erhaltungsmedium

IBMX

Rosiglitazon

Dexamethason

## WA-Erhaltungsmedium

DMEM (Hochglykämisch, GlutaMAX™, Pyruvate, Gibco, Kat.Nu. 31966)

FBS 5 %

P/S 1 %

T3

ABP

Insulin

Primäre weiße Präadipozyten wurden in einer 12-Loch-Platte in einer Dichte von circa 80.000 Zellen pro Loch ausgesät. Die Zellen wurden in WA-Wachstumsmedium bis zur Konfluenz gezüchtet, das Medium wurde jeden Tag gewechselt. Sobald die 80-90 % Konfluenz erreicht wurde (Tag -2) wurden die Zellen in WA-Wachstumsmedium für weitere 48 h inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Präadipozyten für zwei Tage inkubiert unter Verwendung des Induktionsmediums. Von Tag 2 bis Tag 12 wurden die Zellen im WA-Erhaltungsmedium wachsen gelassen, das Medium wurde alle zwei Tage

erneuert. Für alle Experimente wurden vollständig differenzierte weiße Adipozyten verwendet, außer es wurde explizit erwähnt.

### 2.3.3 Aussaat und Passagierung der humanen multipotenten, von adipozytärem Gewebe abgeleiteten Stammzellen (hMads, nach Klepac et al., 2016)

FBS	10 %
PenStrep	1 %
Glutamin	2 mM
HEPES-Puffer	10 mM

Die hMads wurden isoliert und von Christina Dani passagiert, wodurch freundlicherweise kryokonservierte undifferenzierte Mads (P14) zur Verfügung gestellt wurden.

Circa 250.000 Zellen wurden pro 10 cm Greiner-Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz von ungefähr 80 % wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und neu ausgesät bis die gewünschte Passagegeneration von P 17-20 erreicht war.

Differenzierung von hMads:

hMads-Wachstumsmedium

hFGF2	2,5 ng/ml
-------	-----------

hMads-nduktionsmedium

hMads-Differenzierungsmedium

IBMX	100 $\mu$ M
------	-------------

Dexamethason	1 $\mu$ M
--------------	-----------

hMads-Differenzierungsmedium

hMads-Wachstumsmedium	50 %
-----------------------	------

HAMS F12 medium	50 %
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	10 µg/ml
T3	0,2 nM
Rosiglitazon	1 µM

Die Zellen wurden auf einer 12-Loch-Platte mit Wachstumsmedium, das mit hFGF2 supplementiert wurde, ausgesät und nach 48 h mit Wachstumsmedium ersetzt, das kein hFGF2 beinhaltet. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt bis die Zellen konfluent waren. Danach wurden die Zellen für 72 h induziert. Das Induktionsmedium wurde durch Differenzierungsmedium ersetzt, das für insgesamt weitere neun Tage alle zwei Tage gewechselt wurde, bis die Zellen am 12. Tag nach Induktion vollständig differenziert waren. Bei allen Experimenten wurden hMads an Tag 12 verwendet, außer es wurde explizit anders erwähnt.

#### 2.3.4 Aussaat und Passagierung der hWA

Humane weiße Präadipozyten wurden von Promocell käuflich erworben und gemäß Herstellerangaben behandelt.

#### 2.3.5 Humane weiße Zellaussaat

Präadipozyten Wachstumsmedium (PromoCell® GmbH, Heidelberg, Kat.Nu. C-27411)

Humane weiße Präadipozyten wurden auf einer Dichte von 40.000 Zellen pro Milliliter ausgesät. Das Wachstumsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen konfluent waren.

#### 2.3.6 Differenzierung der hWA

Präadipozyten Differenzierungsmedium (PromoCell® GmbH, Heidelberg, Kat.Nu. C-39436)

Prädipozyten Nahrungsmedium (PromoCell® GmbH, Heidelberg,  
Kat.Nu. C-39438)

Die konfluenten Zellen erhielten das humane Prädipozyten-Differenzierungsmedium (1% PenStrep, Supplemente hinzugefügt) für 72 h zur vollständigen Induktion. Nach diesem Zeitraum wurde das Medium auf das humane Adipozyten-Ernährungsmedium umgestellt. Dieses Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Adipozyten waren meist am 14. Tag vollständig differenziert. Bei allen Experimenten wurden hWA an Tag 14 verwendet, außer es wurde explizit anders erwähnt.

## 2.4 Lipolyse-Reaktion

### Lipolyse-Medium

DMEM

Fettsäurefreies BSA 2 %

Glycerol Reagent

Glycerol Standard

EnSpire™ Plate Reader (PerkinElmer, Waltham)

Ausdifferenzierte murine weiße und braune Adipozyten wurden für die Lipolyse-Messung verwendet. Die Zellen inkubierten hierfür zwei (murin) oder vier Stunden (human) im jeweiligen Lipolyse-Medium. Nach zwei bzw. vier Stunden wurde das entstandene freie Glycerol gemäß den Herstellerangaben photometrisch bestimmt. Zur statistischen Normalisierung wurden die Adipozyten zur Proteinisolation weiterverwendet.

### 2.4.1 Stimulation von P2Y12 Rezeptoren mit und ohne Stimulation von adrenergen Rezeptoren

Direkt nach Hinzugabe des Mediums wurde die jeweilige Konzentration 2MeA (1nM, 10nM, 100nM und 1µM) in das jeweilige Loch der Platte pipettiert. Nach 15 Minuten

wurden 10 nM bzw 1  $\mu$ M NE addiert und das freie Glycerol wurde nach zwei (murin) oder vier (human) Stunden nach Start des Essays photometrisch bestimmt.

#### 2.4.2 Lipolyse mit dem P2Y12-Antagonist PSB 0739

2MeA

NE

PSB 0739

Das Experiment erfolgte analog zu Punkt 2.4.1. 15 Minuten vor der Zugabe von 2MeA wurden 10  $\mu$ M PSB 0739 in das korrespondierende Loch hinzugefügt.

#### 2.4.3 Proteinisolation Lipolyse

RiPA-Puffer

Desoxycholsäure-Na 0.1 %

NaCl 150 mM

NP-40 1 %

SDS 0.1 %

Tris HCl (pH 7.5) 50 mM

Alle Substanzen wurden in 1000 ml Milipore-Wasser gelöst, steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Lyse-Puffer

Complete 40  $\mu$ l/ml

NaF 10 mM

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM

Diese Substanzen wurden unmittelbar vor Nutzung des RiPA-Puffers frisch hinzugefügt. Für die Isolation der Proteine wurde RiPA-Puffer benötigt. Mithilfe eines Schabers wurde der Zellrasen abgelöst und das Lysat anschließend mit Hilfe eines Ultraschallgenerators behandelt, um die Zellproteine freisetzen zu können. Folgend wurde das Lysat bei 13.300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Proteine befanden sich im Überstand und die Lösung wurde in eine neue Eppendorf-Tube überführt.

#### 2.4.4 Bradford-Messung des Proteingehalts

##### Bradford-Assay und Proteinquantifizierung

##### Coomassie-Lösung

Coomassie Brilliant bBue G-250	0.01 %
EtOH	5 %
Phosphorsäure	8.5 %

Alle Substanzen wurden in Wasser gelöst und bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden 2 µl der isolierten Proteinflüssigkeit mit 98 µl einer 0,15 M NaCl-Lösung vermengt und mit 1 ml einer Coomassie-Lösung vermischt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm unter Verwendung des Eppendorfs BioPhotometer D30 gemessen. Die Proteinkonzentration wurde ausgehend von der BSA-Standardkalibrationskurve mit verschiedenen bekannten BSA-Standardkonzentrationen kalkuliert.

#### 2.5 MeA- und NE - Stimulation: Western Blot pHSL und pERK

##### 2.5.1 Stimulation der murinen und humanen Zellen

DMEM ohne FBS

2MeA

NE

Die Adipozyten wurden für 45 Minuten in einem Hungermedium inkubiert. Anschließend wurde die jeweilige Konzentration von 2MeA (1nM, 10nM, 100nM und 1µM) in das entsprechend Loch pipettiert und für 15 Minuten erneut inkubiert. Darauffolgend wurde 1 µM NE hinzugefügt und wiederum für eine Viertelstunde inkubiert. Dann wurden die Proteine gemäß Punkt 2.4.3 isoliert.

### 2.5.2 Proteinisolation: Western Blot

Die Proteinisolation für die Proben des Western Blots erfolgte analog zu Punkt 2.4.3..

### 2.5.3 SDS-PAGE und Western Blot

#### Material und Geräte

Erst- und Zweitantikörper (Cell Signalling, Danvers, Alomone Labs, Jerusalem)

Mini-PROTEAN Tetra Cell-Electrophorese-System

Zentrifuge 5810R

Nitrocellulose-Membran, Amersham Protran 0.45 NC

WB Protein-Leiter

Stromgenerator Consort EV 202

Analoger Tuben-Roller SRT6

Rotiphorese®Gel 30 "Acrylamide"

Thermomixer

Odyssey® XF

Chemifluoreszenz-System

#### Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli-Lösung      3x

Bromphenol Blau	0.015 %
Glycerol	20 %
SDS	17 %
TrisHCl (pH 6.8)	125 mM

Alle Substanzen wurden in Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Vor Benutzung wurde 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugefügt.

Elektrophorese-Puffer 10 x

Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	0.1 %

Alle Substanzen wurden in Wasser verdünnt und der pH wurde auf 8,3 eingestellt.

Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 verdünnt.

Nach Proteinquantifizierung wurde eine entsprechende Menge der Proben mit 3x Laemmli gemischt, sodass eine endgültige Konzentration von 1x entstand. Nach kurzer Zentrifugierung (30 Sekunden, 13.000 rpm) wurde die Proteinlösung für fünf Minuten bei 98 °C inkubiert.

Die Proteine wurden durch Verwendung von SDS-Page Gelen separiert, indem man sich die jeweiligen charakteristischen elektrophoretischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins zu Nutze macht. Die Gele stellten eine Kombination aus Separations- und Stapelgel dar. Verschiedene Konzentrationen des Separationsgels wurden abhängig von der Proteinmasse präpariert (Tab. 14), wohingegen die Zusammensetzung des Stapelgels konstant blieb.

**Tab. 14:** Anleitung zur Herstellung des Separationsgels

	8 %	10 %	15 %
Milipore Wasser	4.6 ml	4 ml	2.3 ml
Acrylamid	2.7 ml	3.3 ml	5 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
20 % APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	6 µl	4 µl	4 µl

**Tab. 15:** Anleitung zur Herstellung des Stapelgels

Milipore Wasser	3.4 ml
Acrylamid	830 µl
1.5 M Tris (pH 6.8)	630 µl
20 % APS	25 µl
TEMED	5 µl

Die Proben wurden in das SDS-PAGE Gel pipettiert, sodass sie zuerst durch das Stapelgel laufen, wodurch sie räumlich konzentriert wurden, und anschließend abhängig von ihrer Molekülmasse beim Gellauf durch das Separationsgel aufgetrennt wurden. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in Elektrophorese-Puffer unter Verwendung des Mini-PROTEAN Tetra-Cell-Elektrophoresesystems bei Raumtemperatur durchgeführt.

Western-Blot und Proteinnachweis

Transferpuffer

10x Elektrophoresepuffer      10 %

Methanol	20 %
Milipore-Wasser	70 %

## 10x TBS

Tris	100 mM
NaCl	1.4 M
SDS	0,1 %

Alle Substanzen wurden in Wasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 8,0 adjustiert.

## TBST

Tween-20	0.1 %
----------	-------

Tween-20 wurde in 1 x TBS gelöst und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

## 5% BSA-Lösung

BSA	5 %
-----	-----

BSA wurde in TBST gelöst, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

## Blocklösung

Milchpuder	5 %
------------	-----

Milchpuder wurde in TBST gelöst und bei 4 °C gelagert.

Femto-Substrat Western Blot (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Kat.Nu. 34095)

Nach dem Gellauf wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Proteine wurden bei 300 mA für 1 Stunde und 45 Minuten in kaltem Transferpuffer übertragen. Wenn der Transfer erfolgt ist, wurden die Membranen zweimal in TBST gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in der jeweiligen

Blocklösung unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach dem Blocken wurden die Membranen erneut dreimal für jeweils fünf Minuten in TBST gewaschen. Die Membranen wurden über Nacht im Erstantikörper (in 5 % BSA) rollend bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen wieder dreimal für fünf Minuten in TBST gewaschen und mit dem Zweitantikörper in der Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung lichtgeschützt inkubiert. Die Membranen wurden für dreimal fünf Minuten in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Analyse im Odyssey® XF mittels Immunfluoreszenz-Messung. Eine zweite verwendete Methode war die Auswertung durch Chemifluoreszenz, hierbei inkubierten die Membranen nach dem Waschen für zwei Minuten in 1ml Femto-Substrat und wurden anschließend mittels Messung der Chemifluoreszenz analysiert.

## 2.6 cAMP-ELISA: Stimulation mit 2MeA und NE

### 2.6.1 Vorbereitung der murinen und humanen Zellen

mBA/ hMads-Differenzierungsmedium

DMEM ohne FBS

IBMX 0,5 mM

DMSO

KCl 0,5 M

2-MeA

NE

Bevor die vollständig differenzierten Adipozyten mit Hungermedium versetzt wurden, wurden sie zuvor mit IBMX behandelt. Dafür wurde das Differenzierungsmedium mit IBMX versetzt, in die entsprechenden Löcher pipettiert und für 30 Minuten inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde Differenzierungsmedium durch Hungermedium ersetzt und das Experiment folgte analog zu Punkt 2.4.1 unter Verwendung von 10 nM NE. Nach zwei Stunden (murin) oder vier Stunden (human) erfolgte die Proteinisolation.

### 2.6.2 cAMP-ELISA

cAMP-ELISA-Set (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Kat.Nu. ADI-900-067A)

EnSpire™ Plate Reader (PerkinElmer, Waltham)

Zu jedem Loch der 12-Loch-Platte wurden 300 µl HCl pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lysat heruntergekratzt und in ein entsprechendes Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde bei 10000 g zentrifugiert, sodass sich entsprechend eine obere Fett-, eine mittlere Flüssigkeits- und eine untere Zellsedimentphase bildet. Die mittlere Phase wurde nun abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Laut Herstellerangaben:

Für die Experimente wurde die nicht acetylierte Form verwendet.

Die cAMP-Standard-Lösung wurde derart mit HCL verdünnt, dass schließlich fünf verschiedene Konzentrationen vorlagen.

Der Assay verlief anschließend nach den Herstellerangaben. Die quantitative Messung erfolgte mittels photometrischer Bestimmung durch den EnSpire™ Plate Reader.

### 2.7 Messung des intrazellulären Kalziums in mBA

HBSS	1 x
HEPES	1 M
2-MeA	100 nM
Thapsigargin	1 µM
Ionomycin	2 µM

Fluo4-Direct Dye (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Kat.Nu. 14025-092)

Konfokalmikroskop: ZEISS LSM 900 (Carl Zeiss AG, Jena)

Zur Messung des intrazellulären Kalzium-Spiegels wurden die braunen Präadipozyten auf eine 8-Loch Ibidi-Platte ausgesät, wobei jedes Loch ungefähr mit 18.000 Zellen kultiviert wurde. Die Adipozyten wurden nun analog zu 2.3.2.2 bis zur vollständigen Ausdifferenzierung gezüchtet.

Für die Messung werden die Zellen in HBSS/HEPES-Puffer gewaschen und 150 µl Fluoreszenzfarbstoff wurde hinzugefügt. Die Zellen inkubierten nun lichtgeschützt für 1 h bei 37 °C und wurden anschließend erneut mit dem HBSS/HEPES-Gemisch gewaschen. Die Platte wurde unter dem Objektiv positioniert, ein geeigneter Bildausschnitt gewählt und nach 120 Sekunden wurde 2MeA hinzugefügt. Nach weiteren 480 Sekunden wurde Thapsigargin und wiederum nach weiteren 360 Sekunden Ionomycin hinzugefügt. Die Messung des intrazellulären Calciumgehalts erfolgte kontinuierlich.

## 2.8 CRISPR

1x CutSmart® Puffer	10 %
NucleoBond Xtra Maxi EF	
Nukleasefreies Wasser	
RiboATP	10 %
p-lenti-CRISPR-V2	12,5 %
10x T4 DNA-Ligase	5 %
Restriktionsenzym Esp3	5 %
XL-1 Blue Bakterien	10 %
LB-Medium	
Ampicilin	0,1 %
Ethidiumbromid	1 %
TBE-Laufpuffer	
2x OneTaq-Polymerase	10 %
Forward-Primer (hU6)	100 µM, 5 %
mBA-Wachstumsmedium	(Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Kat.Nu. 61965-026)

CRISPR-Konstrukte	100 $\mu$ M, 5 % (Microsynth AG, Balgach)
Puromycin	2,5 $\mu$ l/ml
Thermocycler T3000	

### 2.8.1 Restriktionsverdau

Jeder Primer wurde in Cut Smart gelöst und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend kühlte das Gemisch bei Raumtemperatur aus. Die Oligonukleotide wurden nun 200-fach in steril filtriertem Wasser verdünnt. Es wurde eine Lösung aus den Oligonukleotiden, ATP, des Plasmids, Restriktionsenzym Esp3 I, T4-DNA-Ligase, CutSmart und steril filtriertem Wasser vermischt. Für insgesamt zwei Stunden wurde das Gemisch für alle 3 Minuten zwischen 16 und 37 °C wechselnd inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 65 °C Hitze-inaktiviert.

### 2.8.2 Transformation

Das CRISPR-Plasmid wurde in ein Eppendorfggefäß mit den Bakterien hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für genau 45 Sekunden bei 42 °C Hitze geschockt. Danach wurden die Proben wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Das Bakterien-DNA-Gemisch wurde mit LB-Medium vermischt und mit einem thermosterilisierten Drigalski-Spatel auf eine Ampicillin-Agar-Platte ausgestrichen. Diese Platte inkubierte bei 37 °C so lange, bis sich makroskopisch sichtbare Bakterienkolonien gebildet haben.

### 2.8.3 Kontroll-PCR

Um den korrekten Einbau des Plasmids zu überprüfen, wurden einzelne Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze abgeimpft und mit OneTaq-Polymerase, Forward-Primer und Reverse-Primer sowie nukleasefreiem-Wasser vermischt. Die PCR erfolgte nach folgendem Schema:

#### **Tab. 16:** Kontroll-PCR

Abfolge	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1.	94°C	30 Sekunden	1x
2.	94°C	20 Sekunden	1x
3.	65°C	30 Sekunden	1x
4.	68°C	25 Sekunden	30x
6.	68°C	300 Sekunden	1X
7.	4°C	unbegrenzt	-

#### 2.8.4 Ethidiumbromid-Kontrolle

Zur Überprüfung der PCR erfolgte ein Nachweis mittels Ethidiumbromid-Elektrophorese. Hierfür wurde Agarosepulver mit TBE-Laufpuffer und Ethidiumbromid-Lösung vermengt. Die Mischung wurde für eine Minute erwärmt. Der Gellauf erfolgte bei 110 V, 300 mA und 50 W für eine Stunde.

#### 2.8.5 Mini-Präparation

Ampicillin

LB-Medium

Ethanol 70 %

Isopropanol 100 %

Nukleasefreies Wasser

NanoDrop™

Zentrifuge 5810R

MP1-Puffer

Tris-HCl pH 8,0 50 mM

EDTA 10 mM

Range 100 µg/ml

Die Substanzen wurden in Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

#### MP2-Puffer

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Die Substanzen wurden in Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

#### MP3-Puffer

Kaliumacetat pH 5,5	3 M
---------------------	-----

Die Substanz wurde in Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

Es wurden LB-Medium-Röhrchen mit den Bakterienkolonien beimpft und Ampicillin hinzugefügt. Die Röhrchen wurden schüttelnd (225 rpm) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde nun in ein neue Eppendorf-Tube überführt. Diese wurde bei Raumtemperatur für 100 Minuten mit 3500 rpm zentrifugiert.

Das Zellplättchen wurde in MP1-Puffer resuspendiert. Folgend wurde MP2-Puffer hinzugefügt, die Lösung kurz gemischt und maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde MP-3-Puffer hinzugegeben. Die Suspension wurde gemischt und für 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Im Anschluss wurde sie für 15 weitere Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde in ein neue Eppendorf-Tube pipettiert. Dazu wurde Isopropanol gegeben und bei Raumtemperatur gemischt. Das Gemisch wurde dann für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm erneut zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde Ethanol hinzugefügt, die Suspension für 5 Minuten bei 4 °C mit 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dabei entstehende Zellplättchen wurde nach Trocknung in nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des

NanoDrop™ bestimmt und anschließend zur Sequenzierung extern eingeschickt (Microsynth AG).

### 2.8.6 Maxi-Präparation

LB-Medium

Ampicillin

NucleoBond Xtra Maxi EF

Ethanol 70 %

Isopropanol 100 %

Es wurden 5 ml-LB-Medium-Röhrchen mit einigen der gezüchteten Bakterienkolonien beimpft und 5 µl Ampicillin hinzugefügt. Die Röhrchen wurden schüttelnd (225 rpm) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Dann wurden die Röhrchen bei 6000 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. RES-EF-Puffer und LYS-EF-Puffer wurden in das Maxi-Röhrchen mit eingesetztem Filter pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. EQU-EF-Puffer wurde addiert. Nun folgte der NEU-EF-Puffer, der für 5 Minuten auf Eis inkubiert und dreimal gedreht wurde. Nun wurde die Bakterienprobe hinzugefügt. Der FIL-EF-Puffer wurde langsam über den Filterrand in diesen pipettiert. Der Filter wurde nun entfernt. Der ENDO-EF-Puffer und der WASH-EF-Puffer wurden in das Röhrchen pipettiert. Nach Durchlauf dieser Waschpuffer wurde ELU-EF-Puffer addiert. Im Anschluss wurde das Röhrchen mit Isopropanol gefüllt und für 30 Minuten bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert.

Ethanol wurde hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 10000 g zentrifugiert. Der Ethanol wurde verworfen und das Röhrchen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, bis ein Zellplättchen sichtbar war.

### 2.8.7 Viruspräparation

Die Insertion des Plasmids in Lentiviren ist freundlicherweise von der Virus-Plattform des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsklinik Bonn übernommen worden.

#### 2.8.8 Murine Zellaussaat CRISPR

mBA-Wachstumsmedium

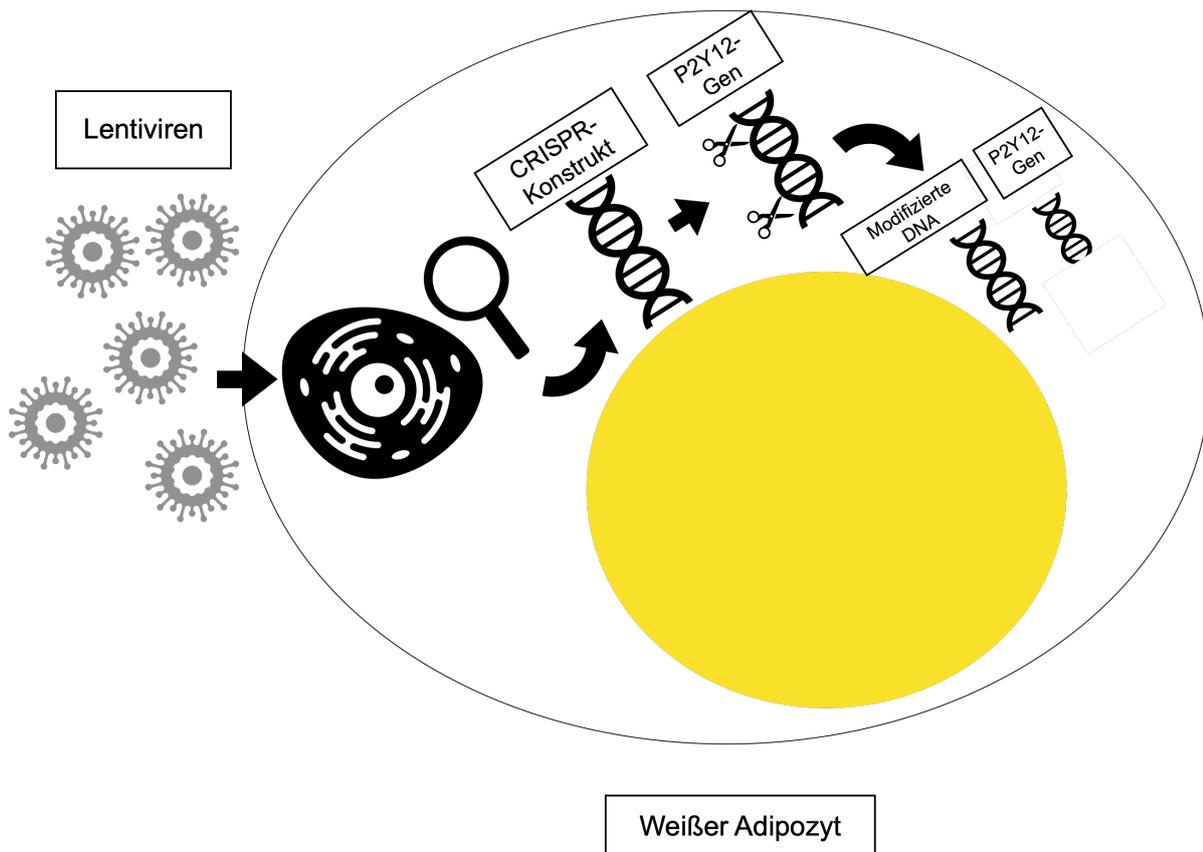
mB-Induktionsmedium

mBA-Differenzierungsmedium

Viruskonstrukt

Puromycin 2,5 µg/ml

MBA wurden analog zu 2.3.2.1 ausgesät. Zehn Stunden später wurde lichtmikroskopisch überprüft, ob die Zellen sich adäquat an den Boden angeheftet haben. Anschließend wurde das entsprechende Viruskonstrukt in das korrespondierende Loch pipettiert. 48 h Stunden nach Transfektion wurde Puromycin hinzugegeben. Puromycin verblieb für weitere 48 h Stunden auf den Zellen. Die folgende Zelldifferenzierung und Messung des freien basalen Glycerols erfolgte gemäß 2.3.2.1 und 2.4.1.



#### Abb. 4: CRISPR/Cas 9 Wirkungsweise in einem weißen Adipozyten

Nach lentiviraler Injektion erkennt die eingebrachte CRISPR-DNA die Zielstruktur innerhalb der DNA der Zelle. Nach Anlagerung wird in mehreren Schritten das Cas-Enzym aktiviert und schneidet den zuvor markierten Teil aus dem Genom heraus. Die Zelle versucht, den Schaden innerhalb der DNA zu reparieren, gelingt dies nicht suffizient, kann die Expression der Zielstruktur suffizient vermindert werden.

### 2.9 Ex vivo Lipolyse

#### 2.9.1 Gewebeentnahme

C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse

Lipolyse-Medium

Nach Überprüfen des sicheren Todeseintritts nach zervikaler Dislokation wurde den Mäusen braunes (BAT), weißes subkutanes (WATi) als auch weißes inguinales (perigonadales, WATg) Fettgewebe entnommen.

Nach Entnahme wurde das Gewebe auf gekühltes PBS gelegt. Das Fettgewebe wurde in vergleichbar große Stücke geteilt. Die einzelnen Gewebstücke wurden dann separat in gekühltem Hungermedium gelagert.

### 2.9.2 Stimulation des adipozytären Gewebes

2MeA

NE

Lipolyse-Medium

Die Gewebestücke wurden anschließend mit einer Schere zerkleinert. Anschließend wurde die entsprechende Konzentration von 2MeA in das korrespondierende Loch pipettiert und inkubiert. NE wurde hinzugefügt und nun für weitere 1 3/4 Stunden inkubiert. Der nun weitere Ablauf folgte analog zu Punkt 2.4.1.

### 2.9.3 Stimulation und Inhibition des adipozytären Gewebes

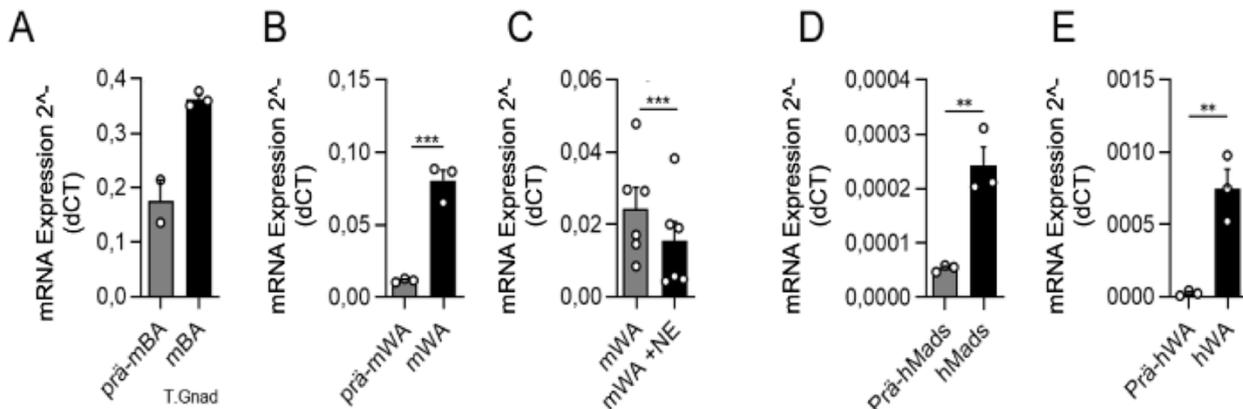
Ticagrelor

Die Lipolyse-Reaktion erfolgte wie unter Punkt 2.9.2 beschrieben, mit dem Unterschied, dass 15 Minuten vor der Zugabe von 2MeA 1  $\mu$ M Ticagrelor als P2Y<sub>12</sub>-Antagonist in das jeweilige Loch hinzugegeben wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.0.1 Rezeptor-Expression in Adipozyten

Zuerst wurden die Expressionslevel von P2Y12 in braunen und weißen präadipozytären Zellen bestimmt. P2Y12 ist in ausdifferenzierten Zellen im Vergleich zu den Vorläuferzellen signifikant hochreguliert (Abb. 5 A-B). Hier zeigten mWA, die einem Bräunungsvorgang mittels NE unterzogen worden sind (beige Adipozyten) eine geringere P2Y12-Expression als differenzierte WA ohne Behandlung (Abb. 5 C). Korrelierend mit den Ergebnissen der murinen Zellen zeigten ebenfalls die ausdifferenzierten hWA und hMads eine deutlich höhere Rezeptorexpression im Vergleich zu den Vorläuferzellen (Abb 5 D-E). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die P2Y12-Expression ausdifferenzierten Adipozyten vorbehalten ist.



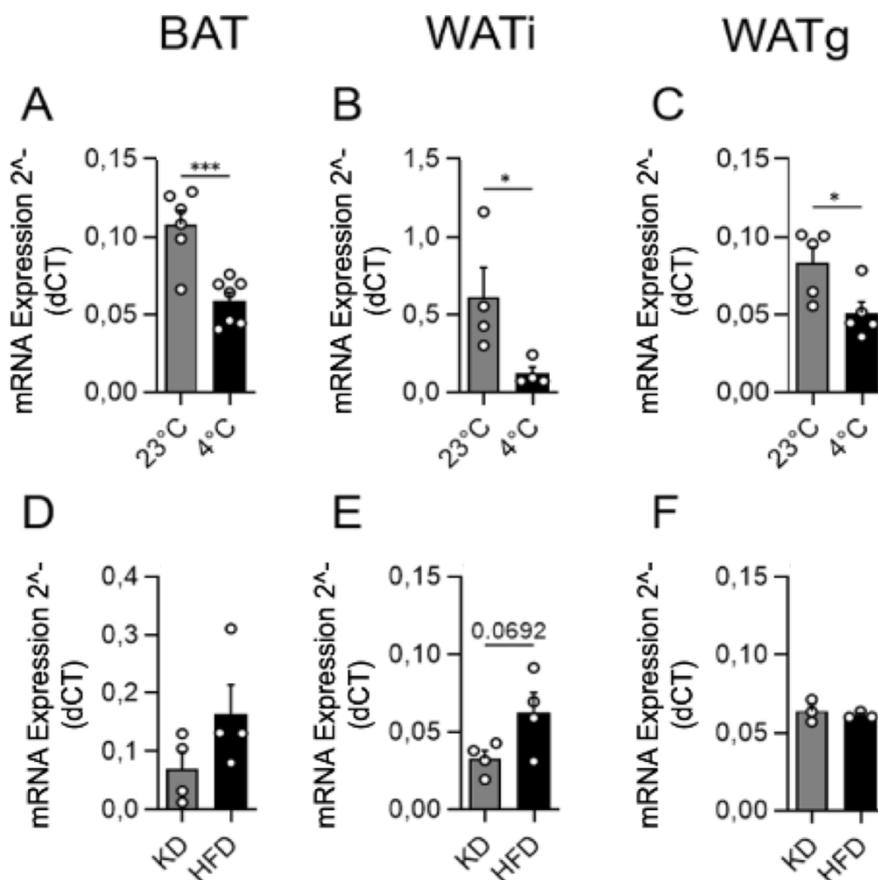
**Abb. 5: P2Y12-Rezeptor-Expression in murinen und humanen Vorläuferzellen sowie in ausdifferenzierten Adipozyten**

(A) Die Rezeptorexpression in murinen braunen Prä- und ausdifferenzierten Adipozyten (n=3, ± SEM). (B-C) Die Rezeptorexpression in murinen weißen Prä- und ausdifferenzierten Adipozyten sowie in ausdifferenzierten beige Adipozyten nach Stimulation mit NE (n=3/n=5, ±SEM, t-Test). (D) Die Rezeptorexpression in humanen braunen Prä- und ausdifferenzierten Adipozyten (n=3, ± SEM). (E) Die Rezeptorexpression in humanen weißen Prä- und ausdifferenzierten Adipozyten (n=3, ± SEM).

### 3.0.2 Rezeptor-Expression in adipozytärem Gewebe

Aufgrund der *in vitro*-Ergebnisse erfolgte die Untersuchung des Expressionsmusters von P2Y12 im adipozytären Gewebe (BAT, WAT<sub>i</sub> und WAT<sub>g</sub>). Bei Betrachtung des Expressionsmusters von P2Y12 ließ sich feststellen, dass unter Kälteexposition die Expression in allen drei Geweben, besonders stark im braunen Fettgewebe, signifikant supprimiert wurde (Abb. 6 A-C).

Mäuse unter Hochfetttdiät zeigten angedeutet in BAT und WAT<sub>i</sub> eine vermehrte



**Abb. 6: Veränderung der P2Y12-Rezeptor-Expression bei Kälteexposition und Hochfetttdiät**

(A-C) Die Rezeptorexpression in Mäusen, die für zehn Tage bei 23 °C und die für 3 Tage bei 16 °C und für weitere 7 Tage bei 4 °C gehalten wurden (n=4/4/3, ±SEM, t-Test). (C-F) Die Rezeptorexpression in Mäusen, die eine Kontrolldiät und eine hochkalorische Ernährung erhalten haben, jeweils betrachtet in BAT, WAT<sub>i</sub> und WAT<sub>g</sub> (n=3, ± SEM).

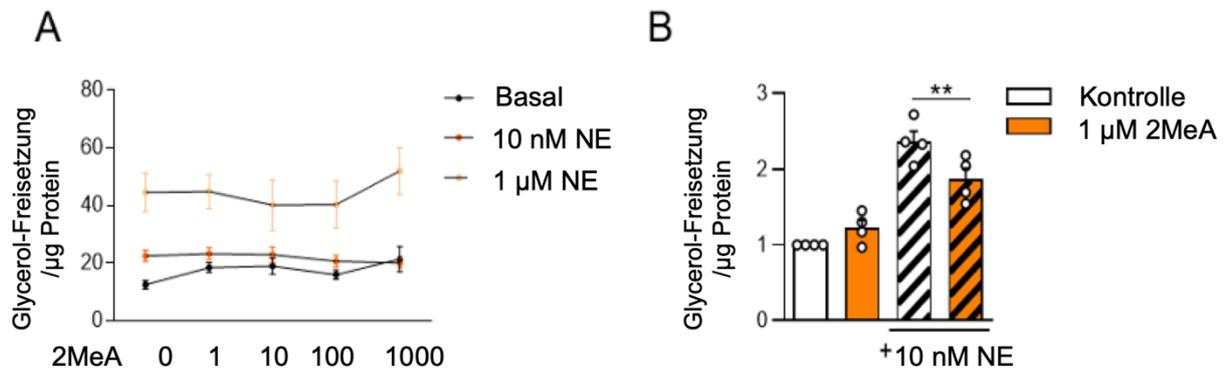
Daten bereitgestellt von Dr.rer.nat. Laia Reverte-Salisa (A-F).

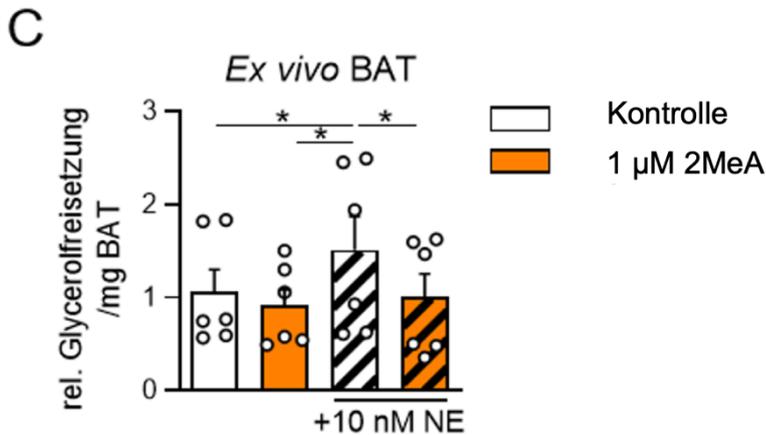
Expression von P2Y12, jedoch nicht in WATg (Abb. 6 D-F).

In Zusammenschau deutete sich an, dass P2Y12 unter Regulation des vegetativen Nervensystems, besonders des sympathischen Anteils, steht und abhängig von den äußere Einflüssen wie Temperaturschwankungen und Nahrungsangebot in seiner Expression beeinflusst wird.

### 3.1 Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der *in vitro* Lipolyse in mBA

Bei Betrachtung des aktivierten P2Y12-Rezeptors in murinem braunen Fettgewebe ließ sich in der basalen Lipolyse sowohl in den isolierten Zellen als auch in frisch entnommenem BAT kein Unterschied in der Glycerolfreisetzung feststellen (Abb. 7 A-B). Wurden die Adipozyten *in vitro* sympathisch mittels NE stimuliert, ließ sich eine signifikant verminderte Glycerolfreisetzung feststellen (Abb. 7 B). Der in isolierten mBA moderat auftretende Effekt der verminderten Lipolyse zeigte sich deutlich verstärkt in frisch entnommenem BAT, nach Stimulation mit 2MeA wurde die mittels NE-aktivierte Lipolyse signifikant supprimiert (Abb. 7 C).





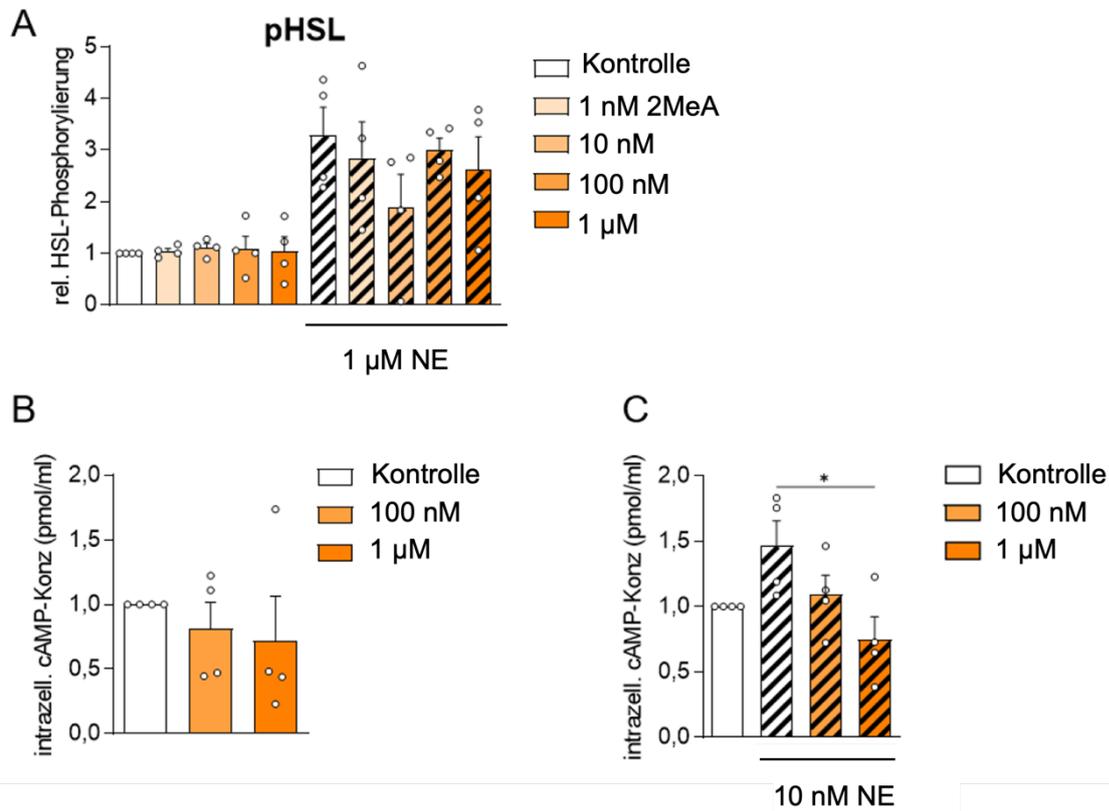
**Abb. 7: Regulation der Lipolyse in mBA und BAT durch P2Y12-Aktivierung**

(A-B) Die gemessene Glycerolfreisetzung bei Stimulation des P2Y12-Rezeptors mit verschiedenen Konzentrationen von 2MeA und in An- oder Abwesenheit von NE in kultivierten mBA. Betrachtung des Einflusses der Konzentration von 1 µM 2MeA mit und ohne 10 nM NE (n=7/6/13, n=6, ±SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons). (C) Die gemessene Glycerolfreisetzung bei Stimulation des P2Y12-Rezeptors mit 1 µM 2MeA mit und ohne 1 µM NE in BAT (n=6, ± SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons).

3.2 Signaltransduktions-Mechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors in mBA

Einer der zentralen Schaltpunkte der Regulation von P2Y12 stellt somit die noradrenerge Stimulation dar, die primär mittels des sekundären Botenstoffes cAMP vermittelt wird (Lafontan et al., 2000), durch den wiederum der Phosphorylierungszustand der HSL beeinflusst wird (Wang et al., 2009).

Bis dato ist der P2Y12-Rezeptor als G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptor bekannt, der seine Effekte über eine Senkung der intrazellulären cAMP-Spiegel vermittelt. Somit stellte sich die Frage nach der mittels cAMP gesteuerten (De-)Phosphorylierung der HSL.



### Abb. 8: Signaltransduktionsmechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors in mBA

(A) Nach halbstündigem Hungern und anschließender Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen 2MeA sowie mit und ohne NE erfolgte die Messung des Anteils der pHSL im Verhältnis zur tHSL ( $n=6$ ,  $\pm$ SEM). (B-C) mBA wurden mit IBMX für eine halbe Stunde behandelt und anschließend mit 100 nM und 1  $\mu$ M 2MeA sowie mit und ohne NE-Stimulation stimuliert. Danach wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration photometrisch bestimmt ( $n=4$ ,  $\pm$  SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons).

Analog zu den Lipolysedaten zeigte sich auch hier, dass 1  $\mu$ M 2MeA unter Stimulation von 1  $\mu$ M NE die Phosphorylierungsrate angedeutet senkt, (Abb. 8 A), jedoch war der Effekt deutlich geringer ausgeprägt als die Lipolyse supprimiert wurde.

Daher wurde ein cAMP-ELISA durchgeführt, um Veränderungen in den intrazellulären cAMP-Spiegeln bei Rezeptor-Stimulation sensitiver darzustellen. Hier zeigte sich eine signifikante Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration bei noradrenerger Stimulation des aktivierten P2Y12-Rezeptors bereits bei reduzierten NE-Konzentrationen korrelierend zu den Lipolyse-Daten in BAT (Abb. 8 B-C). Die Beobachtung, dass die

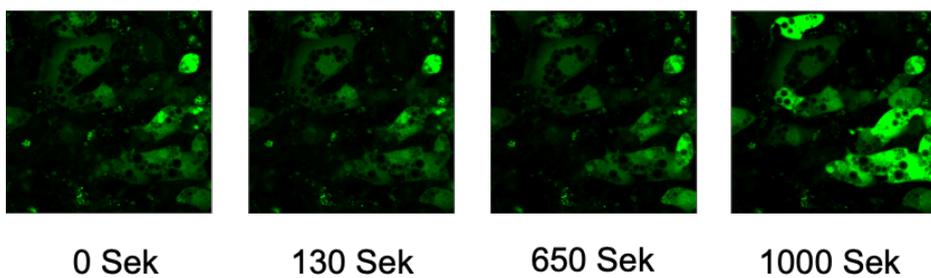
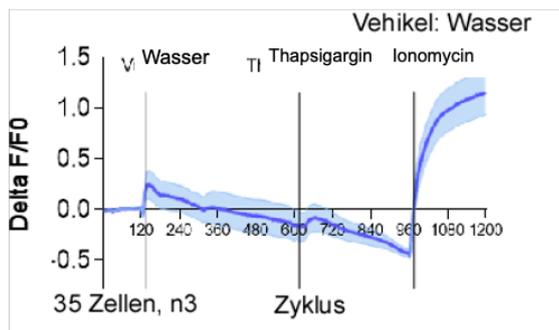
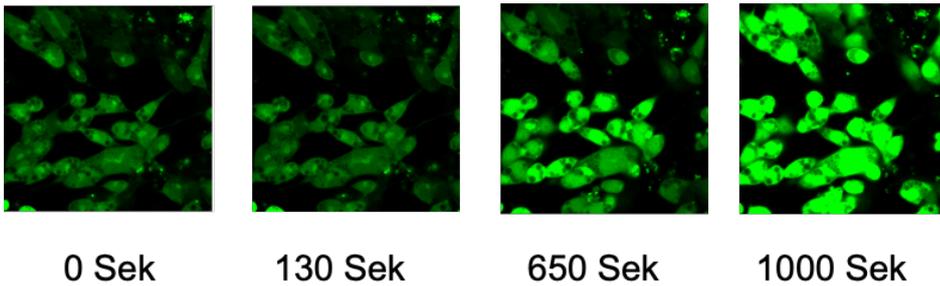
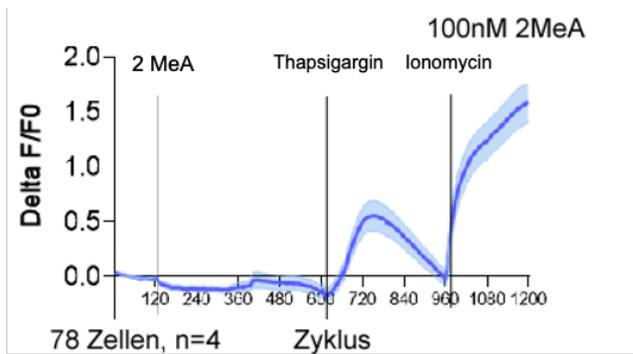
basale Lipolyse kaum berührt wurde, stellte sich ebenfalls in den ermittelten cAMP-Konzentrationen ohne sympathische Stimulation dar (Abb. 8 B).

### 3.3 Einfluss des intrazellulären Kalzium-Spiegels auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration in mBA

In diversen Publikationen wurde die Rolle des intrazellulären Kalzium-Spiegels in der Regulation von P2Y<sub>12</sub> hervorgehoben (bspw. Ali. et al., 2018). Da 2MeA keinen Effekt auf die basale cAMP-Kaskade zeigt, sollte untersucht werden, ob P2Y<sub>12</sub>, ähnlich zu P2Y<sub>2</sub>, Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration induziert.

Ali et al. (2018) haben in ihrer Studie gezeigt, dass der intrazelluläre Kalziumspiegel einen wichtigen Mediator der non-adrenergen Lipolyse in humanen Adipozyten darstellt mit besonderem Augenmerk auf P2Y<sub>2</sub>. P2Y<sub>12</sub> wird hierbei die Funktion eines Regulators der Kalziumkonzentration zugeschrieben. Daher wurde die Funktion von ionisiertem intrazellulären Kalzium als potenzieller Co-Mediator der P2Y<sub>12</sub>-vermittelten Lipolyse neben cAMP untersucht.

Bei Stimulation von kultivierten, ausdifferenzierten mBA ließ sich kein Abfall der basalen intrazellulären Kalziumkonzentration nachweisen (Abb. 9 A-B). Die Kontrollsubstanzen Thapsigargin und Ionomycin, die ihrerseits die Freisetzung von Kalzium in das Zytoplasma fördern, erhöhten den Spiegel deutlich, sodass die zelluläre Funktionalität der Adipozyten gewährleistet war. Die Kontrollgruppe mit Wasser als Vehikel wies lediglich einen Anstieg des Kalziumgehaltes nach Behandlung mit Ionomycin nach (Abb. 9 B). Zusammenfassend ließ sich in dieser Studie kein Nachweis einer P2Y<sub>12</sub>-vermittelten Regulation der basalen intrazellulären Kalziumhomöostase erbringen.



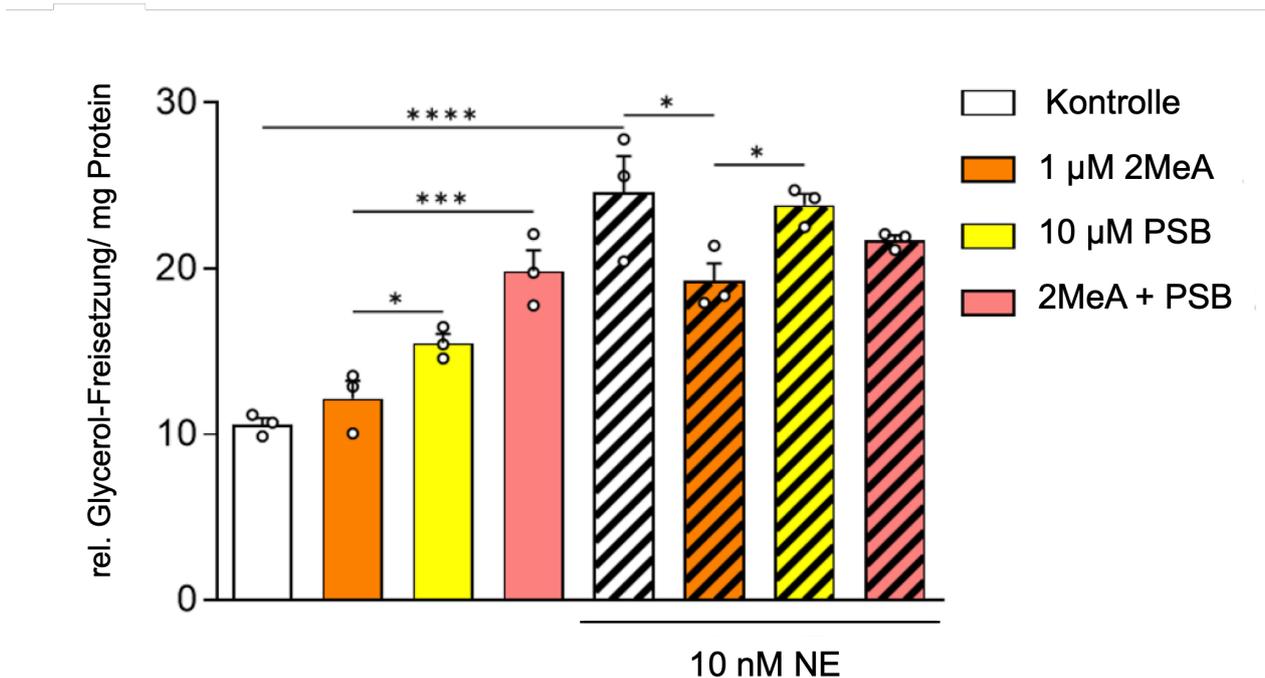
**Abb. 9: Kalziumaufnahme des aktivierten P2Y12-Rezeptors in mBA**

**(A)** Nach einstündiger Inkubation des Fluo-4-Direct Dye wird die intrazelluläre Kalziumaufnahme der mBA zu Beginn der Messung, nach Zugabe von 100 nM 2MeA, nach Zugabe von Thapsigargin und nach Injektion von Ionomycin mikroskopisch bestimmt (n=4, 78 Zellen,  $\pm$ SEM). **(B)** Bestimmung der intrazellulären Kalziumaufnahme ebenfalls nach einstündiger Inkubation mit dem Fluo-4-Direct Dye, anstatt des 2MeA wird jedoch nach 120 Sekunden steril filtriertes Wasser als Kontrollsubstanz hinzugegeben (n=3, 35 Zellen,  $\pm$ SEM).

### 3.4 Inhibition mittels PSB 0739 von mBA *in vitro*

Nach dem Nachweis, dass 2MeA in Kombination mit noradrenerger Stimulation die Glycerolfreisetzung sowohl in kultivierten Adipozyten als auch in BAT signifikant via cAMP-Modulation verminderte, sollte nun untersucht werden, inwiefern sich der Effekt mittels pharmakologischer Inhibition antagonisieren lässt. Hierfür wurde der selektive P2Y12-Inhibitor PSB 0739 verwendet.

Bei Aktivierung mittels 2MeA und NE bei Hinzugabe von PSB 0739 zeigte sich keine vollständige Aufhebung des 2MeA-Effektes (Abb. 10). Interessanterweise wurde die aktivierte Lipolyse bei alleiniger Gabe von PSB 0739 deutlich gesteigert, in diesem Experiment sowohl basal als auch mittels NE-Stimulation.



**Abb. 10: Antagonisierung von P2Y12 in mBA mit PSB 0739**

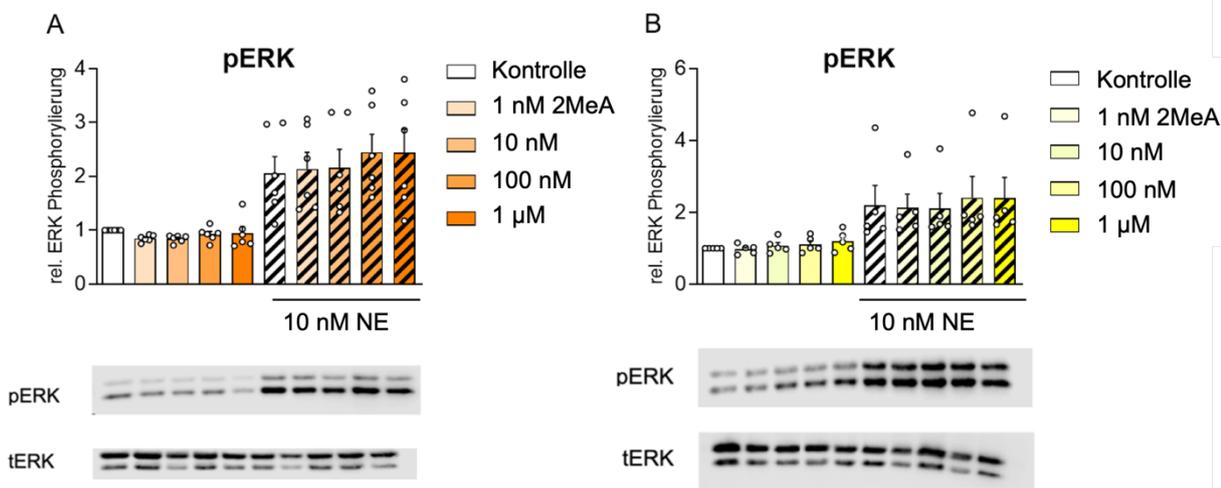
15 Minuten vor Zugabe von 2MeA werden 10 μM PSB 0739 (P2Y12-Antagonist) hinzugefügt. Basal zeigt sich sowohl für PSB allein als auch in Kombination mit 2MeA eine signifikante Steigerung der Glycerolfreisetzung in Bezug auf die Kontrolle (n=3, ±SEM, One-way-Anova, Turkey Multiple Comparisons).

Diese Daten deuten darauf hin, dass möglicherweise via ADP-vermittelte Effekte von P2Y12 auf den Fettstoffwechsel existieren, die nicht auf einer exogenen ADP-Zufuhr beruhen. Ali et al. (2018) vermuten einen Kalzium-Tonus, durch den die basale Lipolyse supprimiert wird. Die hier gewonnenen Daten indizieren, dass ADP möglicherweise an der Regulation dieses basalen Tonus beteiligt ist und sich der Effekt mittels PSB 0739 antagonisieren lässt. Es stellte sich weitergehend die Frage, inwieweit P2Y12 nicht nur akut den Fettstoffwechsel beeinflusst, sondern möglicherweise in der Akutphase zelluläre Differenzierungsprozesse reguliert.

### 3.5 Einfluss des P2Y12-Rezeptors auf Zelldifferenzierung in mBA und mWA

Zur Beurteilung, ob P2Y12 nicht nur Auswirkungen auf die Lipolyse, sondern auf weitere Signalwege wie etwa den Ras/Raf/MAPK (ERK)-Signalweg besitzt, wurde dies mittels Western-Blot untersucht.

Weder für mBA (Abb. 11 A) noch für mWA (Abb. 11 B) ließ sich eine Aktivierung des Signalweges in Form einer akuten ERK-Phosphorylierung feststellen.



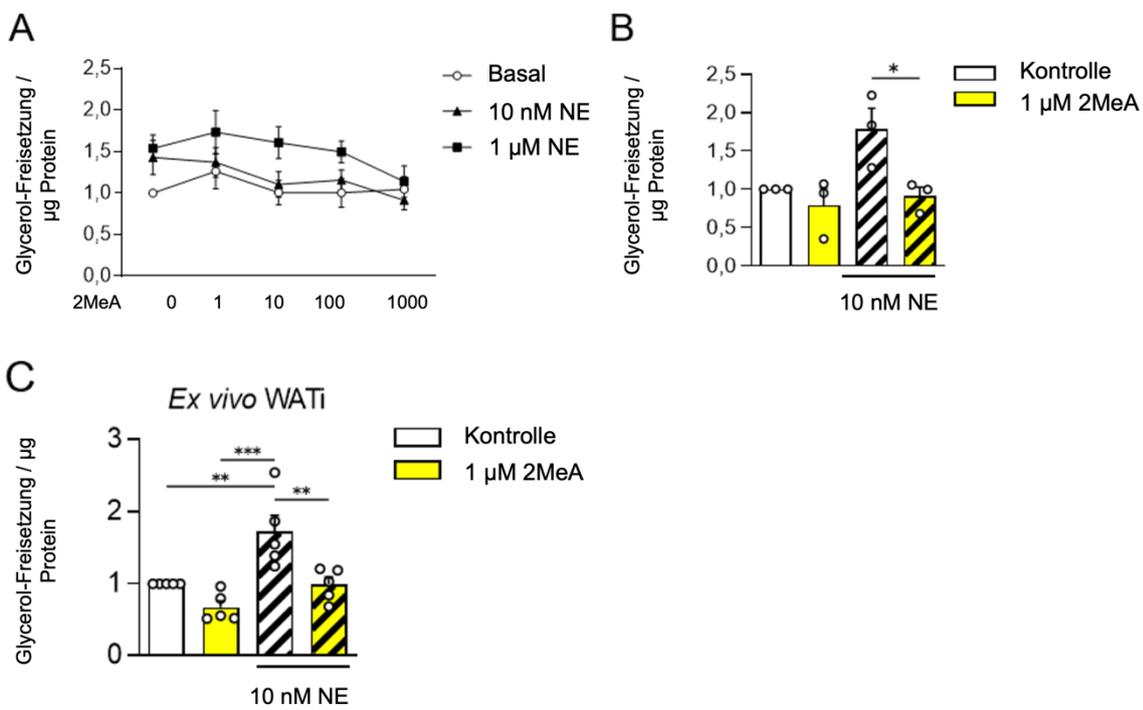
#### Abb. 11: Einfluss von P2Y12 auf Zelldifferenzierung und -Wachstum

**(A)** Nach halbstündigem Hungern und anschließender Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen 2MeA sowie mit und ohne NE in mBA erfolgte die Messung des Anteils des pERK im Verhältnis zu tERK (ERK 1/2, n=4, ±SEM). **(B)** Analoge Versuchsdurchführung für mWA (n=6, ±SEM).

Die Akuteffekte von P2Y12 lassen sich auf metabolischer Ebene durch eine verminderte Glycerolfreisetzung darstellen, scheinen jedoch hingegen sowohl basal und unter sympathischer Stimulation keinen Einfluss auf kurzfristige, zelluläre Differenzierungsprozesse zu haben.

### 3.6 Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der *in vitro* Lipolyse in mWA

Da weiße Adipozyten entscheidend an der Pathogenese der Adipositas beteiligt sind, stellt sich Frage nach der Rolle des P2Y12-Rezeptors in weißem Fettgewebe.



#### Abb. 12: Regulation der Lipolyse in mWA und WATi durch P2Y12-Aktivierung.

(A-B) Die gemessene Glycerolfreisetzung bei Stimulation des P2Y12-Rezeptors mit verschiedenen Konzentrationen von 2-MeA und in An- oder Abwesenheit von NE in kultivierten mWA. Betrachtung des Einflusses der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  2MeA mit und ohne 10 nM NE ( $n=4/3/7$ ,  $n=3$ ,  $\pm\text{SEM}$ , One-way-Anova, Turkey Multiple Comparisons). (C) Die gemessene Glycerolfreisetzung bei Stimulation des P2Y12-Rezeptors mit 1  $\mu\text{M}$  2MeA mit und ohne 1  $\mu\text{M}$  NE in WATi ( $n=5$ ,  $\pm\text{SEM}$ , One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons).

Bei Verwendung eines 2MeA-Konzentrationsgradienten und zwei verschiedenen Konzentrationen NE zeigte sich für höhere 2MeA-Dosierungen eine Senkung der relativen Glycerolfreisetzung bei noradrenerger Stimulation (Abb. 12 A-B). Bei Betrachtung der

basalen Lipolyserate fand sich diese Veränderung analog zu den Ergebnissen bei Betrachtung des murinen braunen Fettgewebes nicht (Abb. 12 A-B). Bei Untersuchung von WATi zeigte sich sowohl basal als auch bei Gabe von NE eine signifikant verminderte Glycerolfreisetzung (Abb. 12 C). Hier ließ sich also eine ADP-vermittelte Reduktion der basalen Lipolyse nachweisen, die in kultivierten murinen Adipozyten und in BAT nicht nachweisbar war.

Zusammengenommen ist der Effekt von 2MeA auf mWA vergleichbar mit den Resultaten von mBA, in mWA ließ sich die verminderte Glycerolfreisetzung unter sympathischer Stimulation verstärkt nachweisen. Basal zeigten kultivierte murine Adipozyten keinen ADP-vermittelten Effekt. WATi zeigte überraschenderweise sogar basal eine supprimierte Glycerolfreisetzung.

### 3.7 Verwendung des P2Y<sub>12</sub>-Inhibitors Ticagrelor in WATi *ex vivo*

Den Resultaten bei der Untersuchung von WATi folgend, wurde weitergehend untersucht, ob der P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor Ticagrelor potenziell die 2MeA-Effekte revidieren kann.

Die basal verminderte Konzentration des freien Glycerols ließ sich erneut nachweisen (Abb. 13). Ticagrelor inhibierte seinerseits den ADP-Effekt, jedoch nicht statistisch signifikant. Dennoch deuten diese Daten darauf hin, dass P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten die durch P2Y<sub>12</sub>-vermittelte verminderte Lipolyserate normalisieren können.



**Abb. 13: Antagonisierung von P2Y12 in WATi mit Ticagrelor**

Fünfzehn Minuten vor Zugabe von 2MeA wurden 10  $\mu$ M Ticagrelor (P2Y12-Antagonist) hinzugefügt. Es zeigte sich, dass Ticagrelor den durch 2MeA vermittelten Effekt der verminderten Glycerolfreisetzung aufhebt, dies war jedoch nicht signifikant (n=3,  $\pm$ SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons).

### 3.8 Nachweis der mittels CRISPR/Cas 9 vermittelten Deletion des P2Y12-Rezeptors in mWA

Um die Auswirkungen des P2Y12-Rezeptors auf die metabolischen Vorgänge *in vitro* bzw. den Ausfall dieser Regulationsmechanismen näher zu untersuchen, sollte mittels CRISPR/Cas 9 der Rezeptor partiell ausgeschaltet werden.

Hierfür sind zwei verschiedene Konstrukte verwendet worden, die zu einer partiellen Deletion des P2Y12-Rezeptors geführt haben. Beide Konstrukte zeigten eine signifikante Suppression der Rezeptorexpression (Abb. 14 A).

#### 3.8.1 Metabolismus der KO-Zellen in mBA

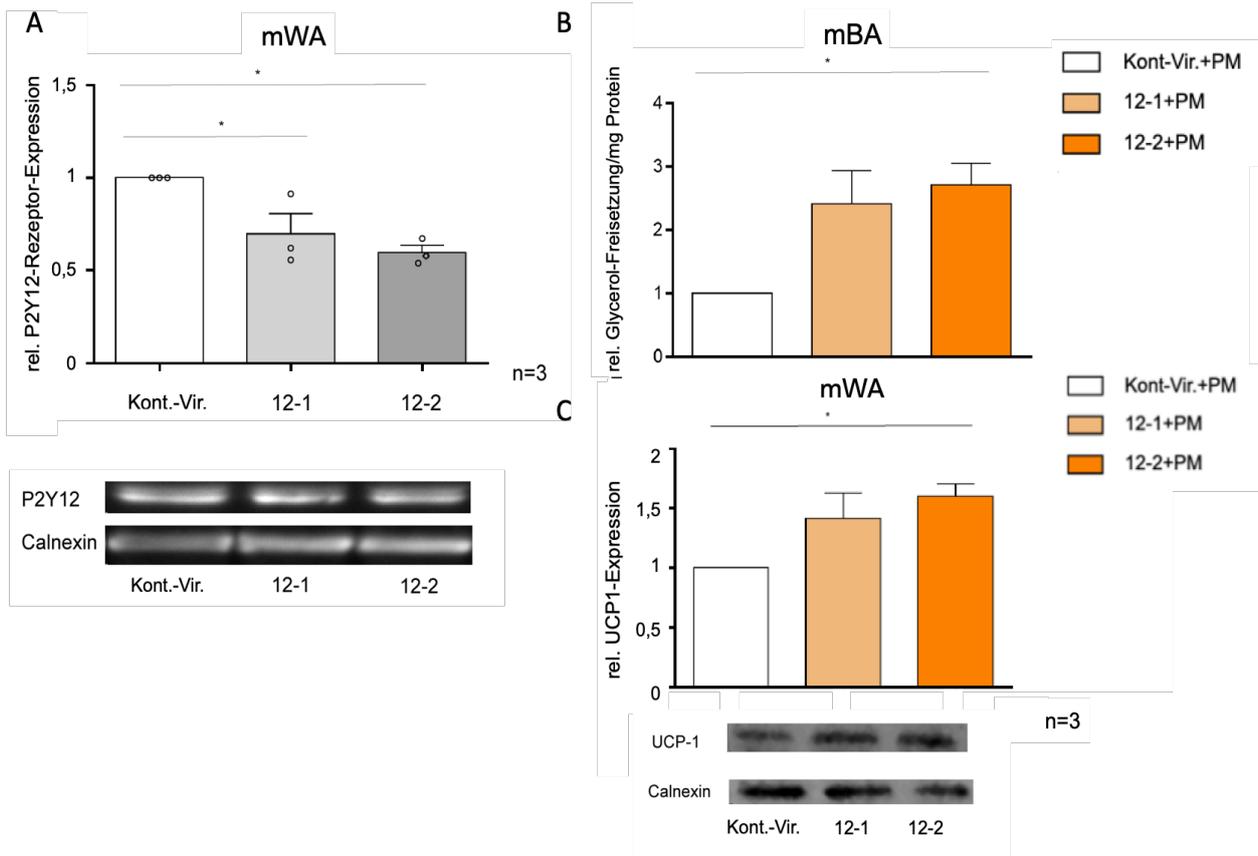
In diesem Experiment sollte untersucht werden, inwiefern sich die durch die CRISPR/Cas 9-Konstrukte verringerte P2Y12-Rezeptor-Expression auf die in den Experimenten zuvor

nachgewiesene Verminderung der Lipolyse-Rate und konsekutiv auf die Bräunungsmarker des braunen Fettgewebes auswirkte.

Bei Betrachtung der basalen Lipolyserate zeigte das erste Konstrukt eine tendenzielle Steigerung, das zweite Konstrukt eine signifikante Steigerung der basalen Glycerolfreisetzung im Vergleich zu nicht mit CRISPR-Konstrukten behandelten Zellen (Abb. 14 B).

Bei Betrachtung der relativen UCP-1-Expression stellte sich ebenfalls eine Tendenz (Konstrukt 1) bzw. eine signifikante Steigerung des UCP-1-Gehalts in den CRISPR-Zellen dar (Konstrukt 2, Abb. 14 C). Dies entspricht einer verstärkten Bräunung des braunen adipozytären Gewebes.

Zusammenfassend verursachte die partielle Deletion von P2Y12 im mBA eine verstärkte basale Lipolyse in mBA, sodass P2Y12 nicht nur die sympathisch vermittelte Lipolyse reguliert, wie die Daten aus der murinen Zellkultur indiziert haben, sondern ebenfalls die basale Lipolyse.



**Abb. 14: CRISPR/Cas9 von P2Y12 in mWA und funktionelle Auswirkungen in mBA**  
**(A)** Partielle Deletion des P2Y12-Rezeptors in mWA mittels CRISPR/Cas 9-System durch zwei verschiedene Konstrukte und Nachweis mittels Western Blot, normalisiert zur Calnexin-Expression (n=3,  $\pm$ SEM, One-Way-Anova, Tukey Multiple Comparisons). **(B-C)** Funktionelle Veränderungen bei partieller P2Y12-Ausschaltung. Die Lipolyserate der mit verschiedenen Konstrukten behandelten mBA stieg basal signifikant an (n=3, n=3,  $\pm$ SEM, One-Way-Anova, Tukey Multiple Comparisons).

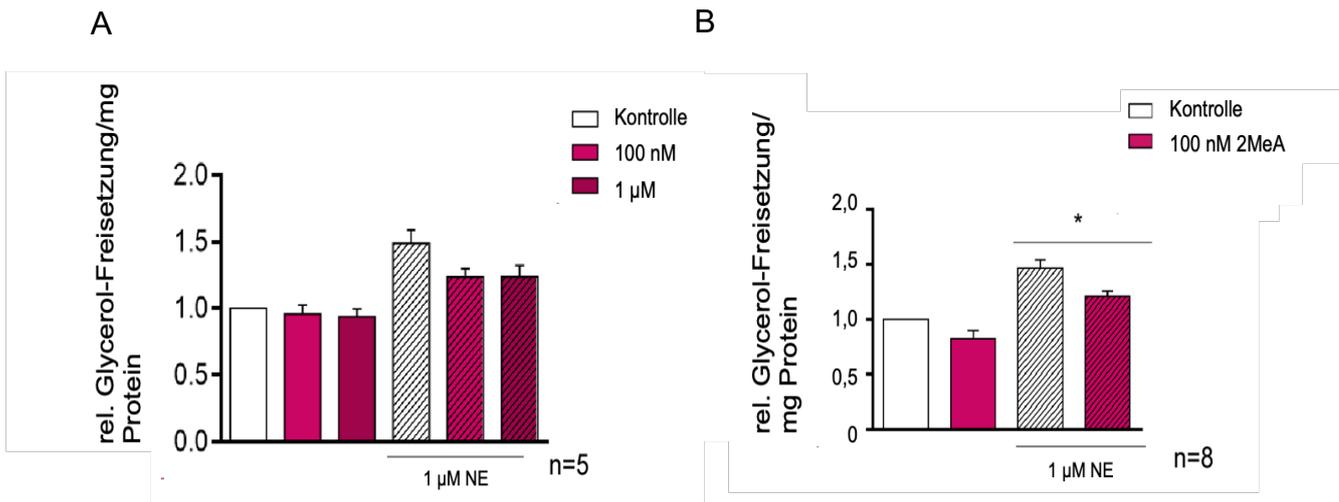
### 3.9 Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der *in vitro* Lipolyse in hBA

Weitergehend sollte die P2Y12-vermittelte Regulation des humanen adipozytären Metabolismus untersucht werden.

Bei Aktivierung des P2Y12-Rezeptors in hMads ließen sich ähnlich zu den murinen braunen Adipozyten keine Unterschiede bezüglich der basalen Lipolyse nachweisen.

Unter Noradrenalin-Einfluss sank die Konzentration des freien Glycerols signifikant (Abb. 15 A).

Interessanterweise ließ sich der Effekt von P2Y12 hierbei bereits bei niedrigeren Konzentrationen von 2MeA im Vergleich zu mBA nachweisen (Abb. 15 B). hMads weisen somit ein analoges Reaktionsmuster zu mBA auf.



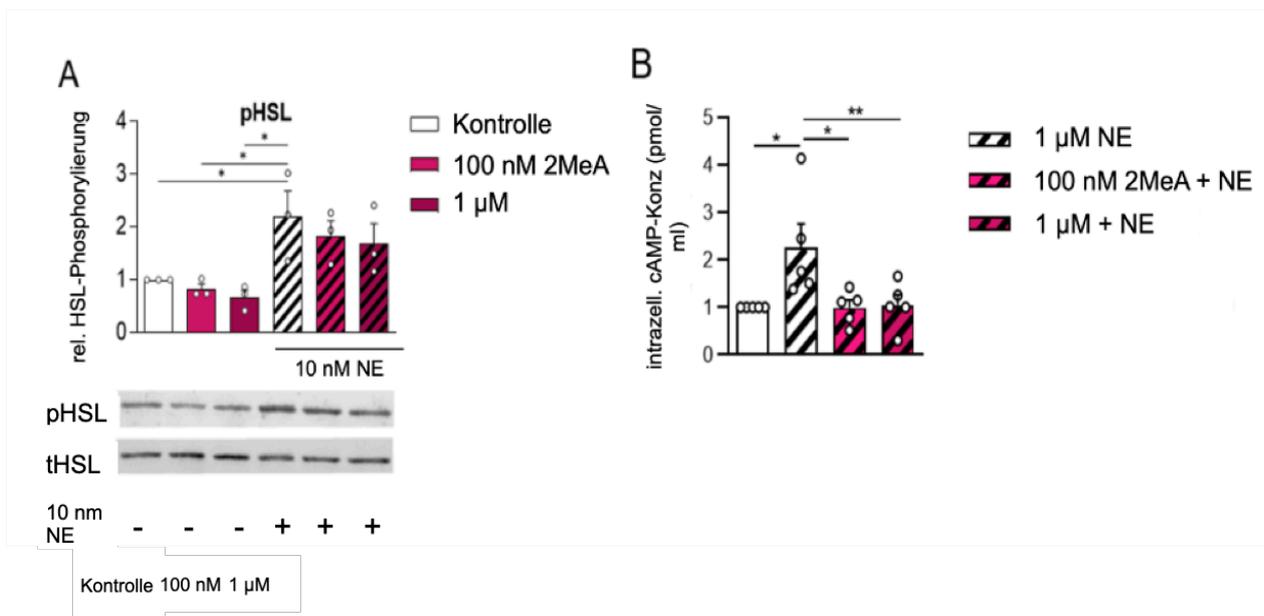
**Abb. 15: Regulation der Lipolyse in hBA durch P2Y12-Aktivierung.**

(A) Die gemessene Glycerolfreisetzung bei Stimulation des P2Y12-Rezeptors mit verschiedenen Konzentrationen von 2MeA und in An- oder Abwesenheit von NE in kultivierten hBA. Betrachtung des Einflusses der Konzentration von 1 µM 2MeA mit und ohne 1 µM NE (n=5, ±SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons). (B) Die gemessene Glycerolfreisetzung bei Stimulation des P2Y12-Rezeptors mit 100 nM 2MeA mit und ohne 1 µM NE in hMads (n=8, ± SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons).

3.9.1 Signaltransduktions-Mechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors in hMads

Nach Untersuchung des Signalweges für murine braune Adipozyten wurde der Transduktionsmechanismus nun für hMads betrachtet.

Basal zeigte sich eine moderate Verminderung des phosphorylierten Anteils der HSL (Abb. 16 A). Bei sympathischer Aktivierung ließ sich ein signifikanter Abfall der pHSL nachweisen (Abb. 16 A).



### Abb. 16: Signaltransduktionsmechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors in hBA

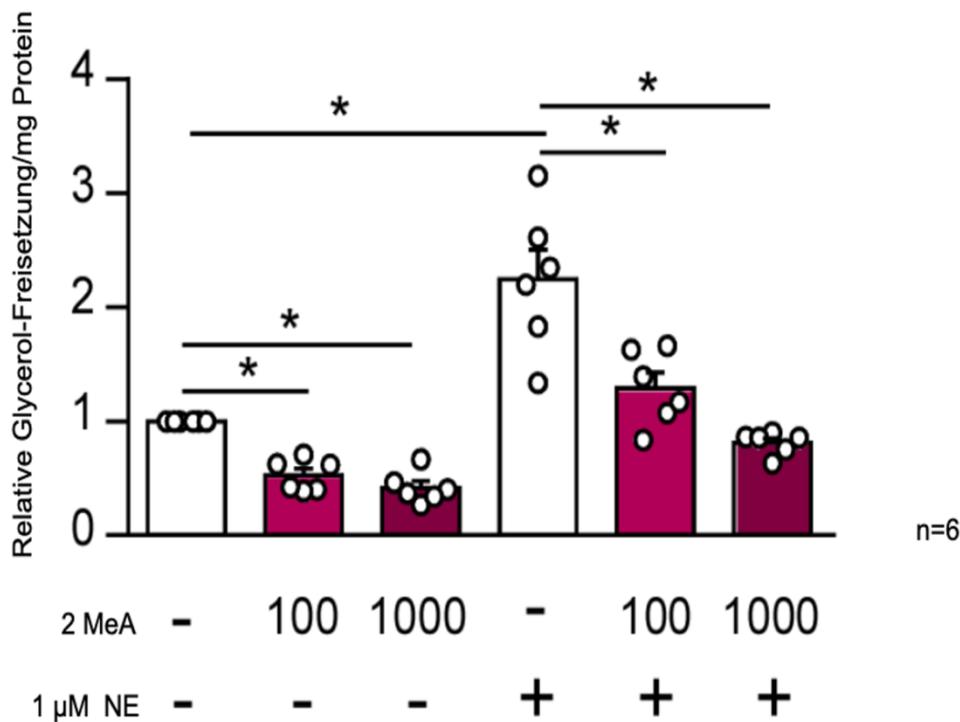
(A) Nach halbstündigem Hungern und anschließender Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen 2MeA sowie mit und ohne 1  $\mu$ M NE erfolgte die Messung des Anteils der pHSL im Verhältnis zur tHSL ( $n=5$ ,  $\pm$ SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons). (B) hBA wurden mit IBMX für eine halbe Stunde behandelt und anschließend mit 100 nM und 1  $\mu$ M 2MeA mit NE-Stimulation stimuliert. Danach wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration photometrisch bestimmt ( $n=5$ ,  $\pm$  SEM, One-way-Anova, Tukey Multiple Comparisons).

Die erhobenen Daten aus der Auswertung des cAMP-ELISA korrelierten mit den Resultaten des Western Blots, bei noradrenerger Stimulation sank die intrazelluläre cAMP-Konzentration um mehr als 50% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 16 B).

Die P2Y12-gesteuerten Effekte auf den Fettstoffwechsel werden also sowohl murin als auch human durch cAMP und den nachgeschalteten Transduktionsweg vermittelt, jedoch hauptsächlich bei zuvor erfolgter sympathischer Stimulation.

#### 3.9.2 Die Rolle des aktivierten P2Y12-Rezeptors während der *in vitro* Lipolyse in hWA

Bei Betrachtung muriner Zellen ließen sich die P2Y12-gesteuerten Regulationen der Lipolyse ausgeprägt in weißen Adipozyten nachweisen, hier ist besonders WATi hervorzuheben.



**Abb. 17: Regulation der Lipolyse in hWA durch P2Y12-Aktivierung.**

Die gemessene Glycerolfreisetzung bei Stimulation des P2Y12-Rezeptors mit verschiedenen Konzentrationen von 2MeA und in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M NE in kultivierten hWA. Betrachtung des Einflusses der Konzentration von 1  $\mu$ M 2MeA mit und ohne 1  $\mu$ M NE. Signifikante Reduktion sowohl basal als auch aktiviert für 100 nM und 1  $\mu$ M 2MeA. (n=6  $\pm$ SEM, One-way-Anova, Turkey Multiple Comparisons). Daten bereitgestellt von Dr.rer.nat Laia Reverte-Salisa.

Die erhobenen Daten aus der humanen Zellkultur zeigten, dass P2Y12 ebenfalls die humane Lipolyse in braunen Adipozyten via ADP reguliert.

Bei Betrachtung der lipolytischen Aktivität von hWA zeigte sich bereits basal eine signifikante Verminderung der Glycerolfreisetzung (Abb. 17), die in mWA nicht nachweisbar war.

Durch Sympathikusaktivierung ließ sich eine deutlich herabgesetzte Lipolyserate nachweisen (Abb. 17).

Konsistent zu den zuvor gewonnenen Daten zeigte sich die noradrenerg aktiviert Lipolyse auch in hWA vermindert. Interessanterweise wiesen hWA eine herabgesetzte Glycerolfreisetzung bereits basal auf.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor die Lipolyse negativ beeinflusst; dadurch wird die Lipogenese gefördert. Hervorzuheben ist, dass in humanen weißen Adipozyten dieser Effekt sowohl ohne als auch mit nordadrenerger Stimulation beobachtet wird. Deshalb könnte die Inhibition von P2Y<sub>12</sub> in Adipozyten, wie bereits durch die partielle Rezeptordeletion via CRISPR/Cas nachgewiesen, helfen, weiße Adipozyten in einen lipolytischen Phänotyp (beige Adipozyten) zu transformieren.

## 4. Diskussion

Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor wird primär in ausdifferenzierten Adipozyten exprimiert. Interessanterweise zeigten mWA, die einem Bräunungsvorgang mittels NE unterzogen worden sind (beige Adipozyten) eine geringere P2Y<sub>12</sub>-Expression als differenzierte WA. Des Weiteren konnte die Rezeptorexpression in adipozytärem Gewebe durch Modulation der Außentemperatur einerseits und der Ernährung andererseits beeinflusst werden. In den oben genannten Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Signalweg des adipozytären P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors sowohl in murinen als auch in humanen Zellen über einen G<sub>i</sub>-vermittelten Mechanismus mit konsekutiver Anpassung des cAMP-Spiegels und damit verbundener (De)Phosphorylierung vor allem der HSL reguliert wird. Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration hingegen scheint unter basalen Bedingungen in den gewählten Konzentrationen nicht von ADP beeinflusst zu werden.

Bei NE-aktivierter Rezeptorstimulation wurde signifikant weniger cAMP gebildet, sodass der Anteil der pHSL und dadurch auch die Menge freien Glycerols im Rahmen der Lipolyse reduziert wurde. Dies gilt sowohl für braunes als auch weißes murines und humanes Fettgewebe, besonders für hWA und WAT<sub>i</sub>, hier wurde bereits die basale Lipolyse nachweisbar supprimiert. Die gewonnenen Daten bei Antagonisierung mit PSB 0739 zeigten, dass möglicherweise via ADP-vermittelte Effekte von P2Y<sub>12</sub> auf den adipozytären Stoffwechsel existieren, die nicht auf einer exogenen ADP-Zufuhr beruhen, sodass intrazelluläres ADP möglicherweise an der Regulation dieses basalen Tonus beteiligt ist und sich der Effekt mittels PSB 0739 antagonisieren lässt.

Mit Hilfe des CRISPR/Cas 9-Systems konnte der Rezeptor partiell ausgeschaltet und gezeigt werden, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe die Glycerolfreisetzung basal deutlich gesteigert werden konnte. Darüber hinaus wurde die UCP-1 Expression in braunem murinen Fettgewebe signifikant erhöht.

Die Expressierung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors hauptsächlich in ausdifferenzierten Adipozyten indiziert, dass dieser für die präadipozytäre Zelldifferenzierung nicht essenziell zu sein scheint. Diese Ergebnisse fanden sich sowohl für murine als auch humane braune und weiße Adipozyten.

#### 4.1 Modulation der Rezeptor-Expression

Eine Untersuchung aus dem Jahr 2006 zeigt, dass ATP als Substrat verschiedener P2Y-Rezeptoren das Zellwachstum bzw. die Zelldifferenzierung von 3T3-L1-Prädipozyten nicht wesentlich beeinflusst und unterstützt somit die Beobachtung für P2Y<sub>12</sub>, dass der Rezeptor nicht an der Zelldifferenzierung beteiligt ist (Omatsu-Kanbe et al., 2006). Der MAPK-Signalweg, der einen wesentlichen Bestandteil der Zellproliferation und -differenzierung darstellt (Geest und Coffee, 2009), wird analog zu den Voruntersuchungen nicht durch kurzzeitige Stimulation des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors beeinflusst (Abb. 11).

Von weiterem Interesse ist, wie sich der Rezeptor unter Veränderung der Nahrungszufuhr bzw. der Umgebungstemperatur verändert, da besonders Kälte durch sympathische Stimulation einen starken Aktivator der Thermogenese darstellt (van Marken Lichtenberg et al., 2009). Darüber hinaus wird durch hochkalorische Nahrung die Bildung von UCP-1 in männlichen Raten gesteigert (Oliver et al., 2007) und ebenso die Synthese anderer Bräunungsparameter wie Cidea sowohl in BAT als auch in WAT als Gegenregulation zur übermäßigen Fettakkumulation (Garcia-Ruiz et al., 2015). Bei Wildtyp-Mäusen, die entweder einer hochkalorischen Diät (HFD) oder einem Kältereiz (KE) von 4 °C ausgesetzt worden sind, zeigen sich Veränderungen der Rezeptorexpression (Abb. 6).

P2Y<sub>12</sub> wird in entnommenem BAT und WAT<sub>i</sub> unter hochkalorischer Diät leicht hochreguliert, es finden sich jedoch keine signifikanten Änderungen. P2Y<sub>12</sub> dient in diesem Fall aufgrund seiner Gi-Kopplung mutmaßlich dazu, das übermäßige Energieangebot in Form von Fetttröpfchen zu akkumulieren und wird dadurch vermehrt exprimiert. In P2Y<sub>12</sub>-KO-Zellen könnte versucht werden, Bräunungsparameter zu bestimmen, um festzustellen, ob P2Y<sub>12</sub> an der bei Garcia-Ruiz (2015) beschriebenen mutmaßlichen Hochregulation dieser Parameter beteiligt ist.

Im Gegensatz dazu wird P2Y<sub>12</sub> in Kälte exponierten Mäusen in allen drei Fettgewebetypen runterreguliert, besonders stark ist dieser Effekt in BAT sichtbar. Unter diesen Bedingungen steht besonders die Fettverbrennung bzw. die Thermogenese im Vordergrund, sodass P2Y<sub>12</sub> als Lipolyse-Inhibitor vermindert exprimiert wird. Weitere Experimente sind nötig, um festzustellen, ob die dadurch gesteigerte cAMP-Bildung zu

einer vermehrten Expression beispielsweise von UCP-1 *in vivo* sowohl in BAT als auch in WATi in Form einer verstärkten Bildung beigen Fettgewebes führt.

Die durch Kältereize erzeugte Sympathikus-Aktivierung bedingt eine verstärkte Katecholamin-Ausschüttung und dadurch eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration, die essenziell für die Thermogenese sind (Cannon und Nedergaard, 2004). Für P2Y<sub>12</sub> konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Rezeptors gegenteilig zu einem signifikanten Abfall der intrazellulären cAMP-Konzentration sowohl in murinen als auch humanen Adipozyten führt.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass zur Steigerung der cAMP-Synthese der G<sub>i</sub>-gekoppelte P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor vermindert synthetisiert wird.

#### 4.2 Einfluss des sekundären Botenstoffes cAMP

cAMP stellt einen zentralen Regulationspunkt sowohl der basalen als auch der stimulierten Lipolyse dar (Lafontan et al., 2000). Eine andere Studie beschreibt ebenfalls, dass bei Inhibition des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors die basale Lipolyse deutlich gesteigert wird, indem vermehrt cAMP synthetisiert wird (Ali et al., 2018).

Die Untersuchungen zu P2Y<sub>12</sub> haben ergeben, dass die intrazellulären cAMP-Spiegel in murinen und humanen braunen Adipozyten bei NE-Stimulation signifikant supprimiert wurden (Abb. 8 und 16). Zusätzlich zeigten sich diese Effekte ebenfalls bei Betrachtung von *ex vivo* WAT-Studien und könnten durch Ticagrelor-Inhibition aufgehoben werden. Zur weiteren Evaluation können die intrazellulären cAMP-Spiegel bei P2Y<sub>12</sub>-KO-Mäusen bestimmt werden, um eine mögliche Steigerung der cAMP-Konzentration bei ausgeschaltetem G<sub>i</sub>-Rezeptor zu untersuchen.

#### 4.3 Intrazelluläre Kalziumkonzentration

Ali et al. (2018) führten weiter aus, dass bei pharmakologischer Behandlung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors mit ATP, ADP sowie UDP in humanen weißen Adipozyten eine deutlich gesteigerte intrazelluläre Kalzium-Aufnahme besteht und P2Y<sub>12</sub> eine regulierende Funktion zugeschrieben wird. Die beschriebene Kalziumumverlagerung von extra- nach intrazellulär bedingt eine negative Rückkopplung der Expression der Adenylatcyclase-

Isoformen 5 und 6, sodass weniger cAMP gebildet wird und dementsprechend die Lipolyserate sinkt.

In einer weiteren Studie wurde die ähnliche Beobachtung gemacht, dass eine Steigerung des intrazellulären Kalziums in braunen Adipozyten durch P2Y-Rezeptoren vermittelt wird (Lee et al., 2005). Bei Betrachtung des Einflusses des P2X7- und des P2Y11-Rezeptors in Bezug auf die Migration von tumorösen Endothelzellen wurde gezeigt, dass die cAMP-Bildung durch die intrazelluläre Kalzium-Konzentration beeinflusst wird (Avanzato et al., 2016). Der Einfluss von 2MeA auf den basalen intrazellulären Kalzium-Spiegel konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 9). Ein deutlicher Unterschied zwischen den Experimenten besteht in der Gewebeart sowie in den verwendeten ADP-Konzentrationen. Während für das Experiment 3.3 murines braunes Fettgewebe und eine 2MeA-Konzentration von 100 nM bzw. 1  $\mu$ M verwendet wurden, sind bei Ali et al. humane weiße Adipozyten sowie eine deutlich höhere Konzentration von 10  $\mu$ M ADP benutzt worden. Bei Ali et al. sind die Zellen zudem für weitere 30 Minuten mit dem jeweiligen Substrat inkubiert worden, bevor die Kalziumkonzentration gemessen wurde. Dies ist in dieser Studie nicht der Fall und stellt eine Möglichkeit dar, dass längere Inkubationszeiten mit höheren ADP-Konzentrationen, die dann jedoch nicht mehr als physiologisch einzustufen sind, verwendet werden, um den intrazellulären Kalzium-Einstrom zu erzeugen. Zudem könnte zur weitergehenden Untersuchung die Messung des intrazellulären Kalziumspiegels nach stattgehabter sympathischer Aktivierung erfolgen, sodass mögliche moderate Unterschiede in basalen Bedingungen unter NE-Stimulation besser dargestellt werden können, analog zu den Ergebnissen des Einflusses von P2Y12 auf die Lipolyse.

#### 4.4 Einfluss von P2Y12 auf den Fettstoffwechsel

Bei Antagonisierung des P2Y12-Rezeptors zeigte sich eine signifikante Steigerung der basalen Lipolyse bei alleiniger Stimulation mit PSB 0739 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 10). In hWA sowie in WATi zeigt sich zudem die basale Lipolyse reduziert, sodass vermutet werden kann, dass P2Y12 ebenfalls an der Regulation der basalen Lipolyse beteiligt ist. Dies ist konsistent zu den Beobachtungen anderer Studien, dass ein basaler Kalzium-Tonus (ergo ein erniedrigter ATP/ADP-Spiegel) die basale Lipolyse supprimiert.

Dass besonders hWA und WAT<sub>i</sub> sensibel auf eine ADP-Stimulation reagieren, liegt möglicherweise darin begründet, dass diese Zellen bzw. dieses Gewebe eine verminderte Dichte an Mitochondrien aufweisen und die intrazellulären cAMP-Konzentrationen nach sympathischer Aktivierung nicht derart hochreguliert werden, dass die 2MeA-vermittelten Effekte partiell maskiert werden. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Hauptfunktion der weißen Adipozyten die Fetteinlagerung ist und deshalb mehr Mechanismen, die die Lipogenese garantieren, existieren als in BAT.

Zudem supprimiert P2Y<sub>12</sub> nicht nur die basale, sondern auch die mittels NE stimulierte Lipolyse in kultivierten murinen und humanen Adipozyten als auch im Fettgewebe.

Methodisch zeigten sich experimentelle Unterschiede hinsichtlich des Ablaufes sowohl der *in-vitro*- als auch der *ex vivo*- Lipolyse.

Gallardo-Montejano et al. benutzten für die *ex vivo* Lipolyse Forskolin (Fsk), einen pflanzlich gewonnenen cAMP-Stimulator. Forskolin wurde in einer Konzentration von 10 µM für eine Gesamt-Einwirkzeit von 2 Stunden mit einer Zugabe von frischem Fsk nach einer Stunde eingesetzt. Durch die nicht human-endogene Herstellung von Forskolin lässt sich keine Aussage über die Anwendbarkeit auf die Physiologie des Menschen treffen. Noradrenalin hingegen als im Nebennierenmark produziertes Katecholamin ist ein sympathischer Neurotransmitter. Die verwendeten Konzentrationen von 10 nM und 1 µM NE für die *in vitro* bzw. *ex vivo* Lipolyse hingegen ergeben umgerechnet Konzentrationen von unter 275 ng/l, die als physiologisch eingestuft werden (Labor Lademannbogen, Labor Dr. Wisplinghoff).

#### 4.5 HSL als zentrales Enzym der sympathisch stimulierten Lipolyse

Miyoshi et al. (2008) haben demonstriert, dass vor allem die ATGL maßgeblich für die Regulation der basalen Lipolyse verantwortlich ist, nicht die HSL. P2Y<sub>12</sub> reguliert hauptsächlich die noradrenerg stimulierte Lipolyse, sodass mutmaßlich die HSL das Zielenzym darstellt. Die Regulation der ATGL hingegen erfolgt ähnlich wie bei der HSL über Proteinkinase A vermittelte Phosphorylierung. Hierbei wird die Aktivität der ATGL über das Membranprotein Perilipin 5, das PKA abhängig reguliert wird, gesteuert (Wang et al. 2011).

In hWA und WAT<sub>i</sub> ließ sich bereits eine Suppression der basalen Lipolyse feststellen, sodass P2Y<sub>12</sub> ebenfalls die ATGL zu regulieren scheint. Korrelierend hierzu steigert der selektive P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor PSB 0739 bei alleiniger Zugabe die basale Lipolyse, sodass mutmaßlich basale, tonische ADP-Konzentrationen hier eine entscheidende Rolle spielen.

Wang et al. (2009) erläuterten, dass für die Aktivierung der HSL sowohl die Bindung an Membranproteine der Fetttröpfchen als auch die PKA-abhängige Phosphorylierung notwendig sind.

Die Bedeutung der HSL besonders für die stimulierte Lipolyse zeigten Pajed et al. (2021), indem die HSL adipozytenspezifisch ausgeschaltet wurde und anschließend die Lipolyserate sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* bestimmt wurde. Die basale Glycerolfreisetzung wurde signifikant reduziert, vor allem jedoch die mit einem  $\beta$ -3-Agonisten (*in vivo*) bzw. Isoproterenol (*ex vivo*) stimulierte Lipolyse.

Ein kompletter Wegfall der adipozytenspezifischen HSL führte in diesem Fall zu einer Lipiddystrophie mit konsekutiver Steatosis hepatis aufgrund einer stark gesteigerten Lipogenese.

Aufgrund der zentralen Rolle der HSL im sympathisch gesteuerten, lipolytischen Stoffwechsel wurde ebenfalls der Phosphorylierungsstatus der HSL via Western Blot betrachtet. Besonders in hMads ließ sich besonders für die mit NE stimulierte Lipolyse eine deutliche Reduktion des phosphorylierten Anteils feststellen und korreliert mit der signifikanten Reduktion des intrazellulären cAMPs, ebenfalls besonders für die NE-aktivierte Lipolyse. Diese beobachtete Regulation der HSL via cAMP ist konsistent mit anderen Experimenten bezüglich der G-Protein vermittelten Kontrolle der HSL (Yanes-Carmen und Victor, 2006). Weiterführend sollte eine Untersuchung von P2Y<sub>12</sub>-KO-Mäusen erfolgen, um zu untersuchen, inwiefern sich der Anteil der pHSL im Vergleich zu der Kontrollgruppe unterscheidet, um eine verstärkte lipolytische Aktivität zu differenzieren.

#### 4.6 Sympathische Stimulation

Eine Problematik in der Betrachtung der aktivierten Lipolyse bzw. in der Western-Blot-Detektion bestand darin, dass das verwendete Noradrenalin als hochpotenter Aktivator

der Adenylatcyclase zu einer massiven cAMP-Produktion führte, sodass der NE-Effekt zu dominant war, um Unterschiede in der Behandlung mit 2MeA darzustellen. Dies zeigte sich besonders in der Lipolyse sowie im Western-Blot für murine braune Adipozyten bei Verwendung von 1  $\mu$ M NE, da dort die Effekte des 2MeA nicht oder nur dezent sichtbar wurden. Bei Reduktion der NE-Konzentration auf 10 nM konnte die Senkung der Glycerolfreisetzung sowie der cAMP-Spiegel verdeutlicht werden. Dieses Problem stellte sich nicht bei Behandlung der mWA, hWA und hBA als auch des Gewebes selbst dar. Eine Ursache liegt sicherlich in der deutlich höheren Beta-Rezeptor-Expression der kultivierten (murinen) braunen Adipozyten, gerade durch die Stimulation des  $\beta$ 3-Rezeptors, die zu einer erhöhten cAMP-Produktion führt (Bornikov et al., 2003; Cannon und Nedergaard, 2004; Pfeiffer und Hoffmann, 2015). Allerdings weisen die in dieser Studie verwendeten hBA im Gegensatz zu mBA geringe intrazelluläre cAMP-Konzentrationen auf, trotz vorheriger IBMX-Stimulation.

Die hier verwendeten hMads wurden aus humanen multipotenten Vorläuferzellen unter geeigneter Stimulation differenziert, sodass diese Eigenschaften des weißen Fettgewebes aufweisen können, gleichzeitig jedoch UCP-1 exprimieren und somit in erster Linie als beige Zellreihe zu werten sind. Diese stellen also kein Äquivalent zu aus hauptsächlich Mfy5 + -positiven Vorläuferzellen gebildeten humanen braunen Adipozyten dar und weisen somit ebenfalls Unterschiede zu murinen braunen Adipozyten auf, die dem interskapularen braunen Fettgewebe von Mäusen entnommen und kultiviert worden sind. Zudem wiesen die hMads keine derartige Konfluenz von ausdifferenzierten Zellverbänden auf wie die der mBA, sodass zur Stimulation der aktivierten Lipolyse in humanen Zellen höhere NE-Konzentrationen benötigt wurden. Diesbezüglich ist ein Abgleich mit originären interskapulären bzw. zervikalen hBA interessant, um eine adäquate Aussage in Bezug auf den Einfluss von P2Y12 auf hBA zu treffen.

Während in braunen Adipozyten selbst vor allem der  $\beta$ 3-Rezeptor vorherrscht, befindet sich im umgebenden Bindegewebe, besonders in den Gefäßen, mit einem hohen Anteil der  $\beta$ 2-Rezeptor (Cannon und Nedergaard, 2004). Darüber hinaus ist Fett ein stark immunologisch aktives Gewebe und wird in seinem Wachstum bzw. seiner Struktur durch Immunzellen moduliert (Gallerand et al., 2021). Harms und Seale (2013) beschreiben, dass die Differenzierung von weißen zu beigen Adipozyten stark vom Nervensystem und anderen Faktoren beeinflusst wird, sodass Fettgewebe multifaktoriell reguliert wird und

diverse weitere Einflüsse auf den adipozytären Metabolismus neben der (nor)adrenergen Stimulation existieren.

#### 4.7 CRISPR/Cas 9

Der  $G_i$ -gekoppelte P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor stellt folglich einen wichtigen Regulationspunkt sowohl der basalen, besonders jedoch der sympathisch stimulierten Lipolyse in braunen und weißen Adipozyten dar, sowohl für murine als auch für humane Zellen. Um die Bedeutung des Rezeptors weiter zu evaluieren, wurde dieser mit Hilfe des CRISPR/Cas 9-Systems in murinen Zellen *in vitro* partiell ausgeschaltet und die Auswirkungen sowohl auf die Lipolyse als auch auf die Markerproteine des braunen Fettgewebes wie etwa UCP-1 betrachtet.

Die Zellen wurden nach Zugabe der Viren mit Puromycin behandelt, um nicht-transduzierte Zellen gezielt auszuschalten. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit Puromycin inkubiert und anschließend bis zur Konfluenz gezüchtet, hier lag der Anteil erfolgreich transduzierter Zellen bei jeweils ungefähr 40 %. In einer anderen Studie aus dem Jahr 2016 wurden die transfektierten Zellen für vier Tage mit Puromycin behandelt und nach Selektion für drei weitere Wochen wachsen gelassen. Hiermit konnte ein Anteil circa 96% erfolgreich behandelter Zellen erreicht werden. Der Nachweis erfolgte via FACS-Analyse (Schmidt-Burgk et al., 2016).

Die erreichte Reduktion wies jedoch bereits Unterschiede im Metabolismus als auch bei Betrachtung der Bräunungsparameter nach. Die Bildung freien Glycerols konnte bereits basal in beiden Konstrukten mehr als verdoppelt werden. P2Y<sub>12</sub> beeinflusst also nicht nur die aktivierte Lipolyse via cAMP-Regulation, sondern ebenfalls die basale. Wie bereits erläutert, stellt P2Y<sub>12</sub> einen Regulator des intrazellulären Kalzium-Haushalts in humanen Adipozyten dar (Ali et al., 2018). Durch Wegfall dieses Regulators lässt sich ein möglicher Transduktionsmechanismus darstellen: Durch die verminderte P2Y<sub>12</sub>-Expression kann der basale Kalzium-Tonus nicht suffizient aufrecht erhalten werden und führt dementsprechend zur Aufhebung der negativen Regulation der Adenylatcyclasen 5 und 6, sodass die Inhibition der cAMP-Synthese wegfällt und die Lipolyse gefördert wird. Eine Studie aus dem Jahr 2020 schaltete alle  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren in murinen Adipozyten

mittels Adiponektin-Cre-Technik aus und stellte ebenso eine basal deutlich gesteigerte Lipolyse sowie eine erheblich vermehrte Expression der pHSL fest (Wang et al., 2020). Gleichzeitig beobachteten Wang et al. (2020), dass die deutlich vermehrte Freisetzung freier Fettsäuren zu einer verstärkten Insulinresistenz und einer Steatosis hepatis führten. Dies sind Pathomechanismen, die sich derart im Rahmen der Adipositas bzw. das metabolischen Syndroms finden lassen, die ebenfalls unter anderem auf einer Erhöhung der freien Fettsäuren beruhen, die wiederum eine Inflammation mit Insulinresistenz begünstigen (Klötting et al., 2010).

Folglich wären weitere eigene Experimente nötig, um die Auswirkungen der partiellen Ausschaltung des P2Y12-Rezeptors auf die Insulinsensitivität bzw. weitere assoziierte metabolische Veränderungen darzustellen.

Neben der gesteigerten Lipolyse stellte sich in den transfizierten murinen braunen Adipozyten eine signifikante Erhöhung von UCP-1 dar, ohne vorherige noradrenerge Stimulation. Die partielle Ausschaltung des P2Y12-Rezeptors führt ergo zu einer verstärkten Bräunung des Fettgewebes. Leiss et al. (2020) fanden heraus, dass bei einer Deletion einer Isoform eines  $G_i$ -gekoppelten Rezeptors in murinen Adipozyten unter NE-Stimulation der cAMP-Anstieg deutlich stärker ausfiel als bei Mäusen, die die Rezeptor-Isoform noch besaßen. cAMP als essentieller Bestandteil für die Differenzierung von braunen Adipozyten (Reverte-Salisa et al., 2019) wird also in den CRISPR-Zellen vermehrt synthetisiert und könnte so als Stimulator für eine vermehrte Bräunung dienen, die sich in den erhöhten UCP-1-Spiegeln darstellt.

Die in den murinen braunen CRISPR-Zellen nachgewiesene verstärkte UCP-1 Expression unterstützt diese Ergebnisse, dass cAMP einen wesentlichen Bestandteil in der Regulation der Differenzierung von beigem bzw. braunem Fettgewebe darstellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehrere Studien cAMP als zentralen Regulator und die HSL als zentrales Enzym des (sympathisch aktivierten) Fettstoffwechsels ansehen und dies ebenfalls auf den Signalweg für P2Y12 zutrifft. In den verwendeten Konzentrationen von 2MeA ließ sich in der eigenen Studie jedoch kein signifikanter Kalziumanstieg beobachten. Ein möglicher Erklärungsansatz sind die in dieser Studie

verwendeten, geringeren ADP-Konzentrationen. Weiterführend sollten Messungen nach sympathischer Stimulation erfolgen.

Des Weiteren konnte mit Hilfe des CRISPR/Cas 9-Systems der Rezeptor partiell ausgeschaltet werden, sodass die Lipolyse gesteigert und die Bräunungsparameter - in diesem Fall UCP-1 - der murinen braunen Adipozyten vermehrt synthetisiert werden konnten. Andere Studien unterstützen dieses Ergebnis insofern, als dass der Wegfall eines G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptors zu einem deutlichen cAMP-Anstieg führt, der essenziell für die Differenzierung von braunen Adipozyten ist. Weiterführende Experimente besonders *in vivo* sind nötig, um die Rolle von P2Y<sub>12</sub> in Bezug auf Einflüsse des extraadipozytären Gewebes, besonders des vaskulären sowie des neuronalen Systems, zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Insulinsensitivität betrachtet werden, um Auswirkungen auf den Glukose-Stoffwechsel darstellen zu können.

Zusätzlich kann der analoge CRISPR-Versuchsaufbau für den humanen P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor verwendet werden, um Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel im Menschen ableiten zu können.

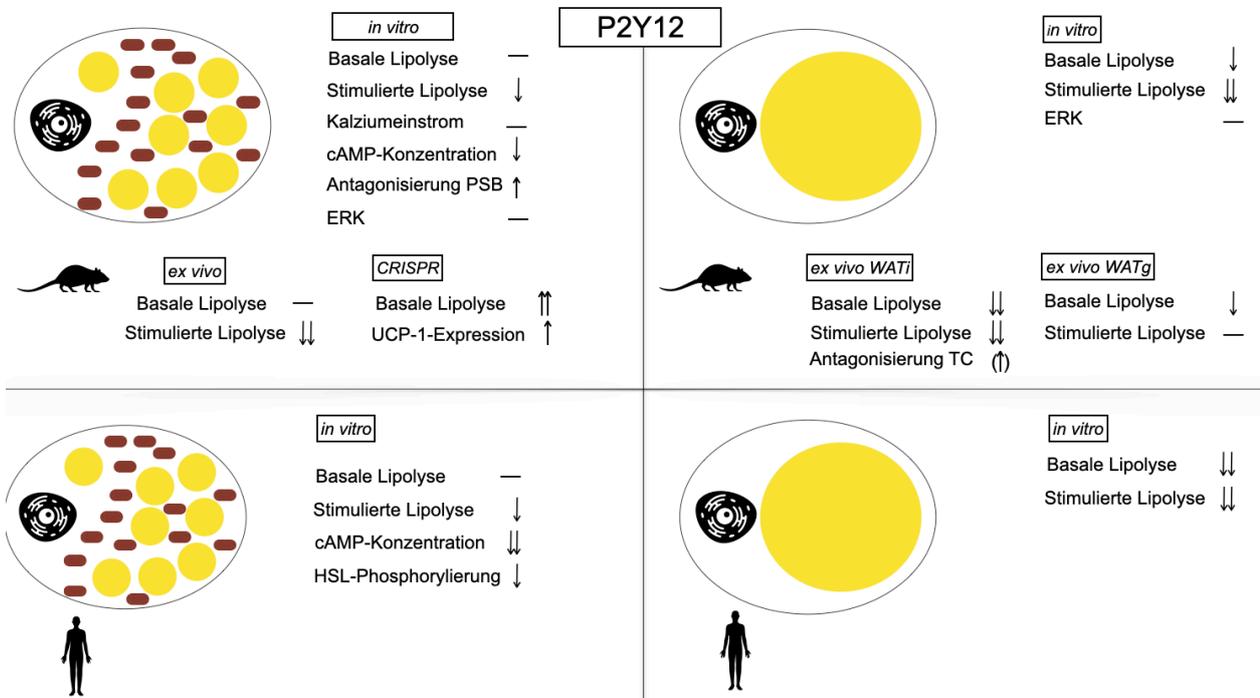
## 5. Zusammenfassung

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor sowohl in ausdifferenzierten murinen als auch in humanen braunen und weißen Adipozyten exprimiert wird. Die Expression ließ sich sowohl durch Ernährung als auch durch die Umgebungstemperatur verändern. Bei Aktivierung durch 2MeA, vor allem in Zusammenspiel mit noradrenerger Stimulation, wurde die Lipolyserate sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* signifikant vermindert. Diese Daten indizieren eine neuartige Rolle von P2Y<sub>12</sub> in der Regulation der Lipolyse in Fettgewebe. Hervorzuheben ist, dass die hier präsentierten Daten indizieren, dass P2Y<sub>12</sub> eine potenziell entscheidende Rolle in der Pathogenese der Adipositas darstellt, indem die Lipolyse bereits unter basalen Bedingungen supprimiert wird (Abb. 16). Gerade die partielle Deletion des Rezeptors mit einer hierdurch deutlich gesteigerten basalen Lipolyse sowie einer vermehrten UCP-1 Expression in braunen Adipozyten lässt P2Y<sub>12</sub> als ein mögliches, noch nicht erforschtes Ziel der pharmakologischen Behandlung der Adipositas erscheinen. Hierfür stehen zurzeit hauptsächlich die Verminderung der Kalorienzufuhr, verschiedene Diäten und intensivierter Sport im Vordergrund. Medikamentöse Ansätze sind zurzeit vor allem ergänzende Ansätze, um den Gewichtsverlust zu unterstützen. Durch Entdeckung des braunen Fettgewebes und induzierbaren weißen Fettzellen zur Bildung von beige Adipozyten entstehen verschiedene neue pharmakologische Ziele, um die Differenzierung hin zu deutlich stoffwechselaktiveren braunen Adipozyten zu fördern. Intrazelluläre cAMP-Konzentrationen stellen hierbei einen zentralen Angriffspunkt dar. P2Y<sub>12</sub> greift als G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptor in diesen Mechanismus ein.

In der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen besitzen P2Y<sub>12</sub>-Inhibitoren bereits einen hohen Stellenwert. Für den Einsatz zur Adipositas-Therapie sind diese Wirkstoffe noch nicht zugelassen und müssten in ihrer chemischen Struktur bzw. Zusammensetzung derart verändert werden, dass die Thrombozytenaggregation nicht beeinflusst wird, um Komplikationen in Form von Blutungen zu vermeiden. Zur weiteren Erforschung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors ist eine adipozytenspezifische Deletion des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors notwendig, um etwaige extraadipozytäre Einflüsse differenzieren zu können.

Gerade jedoch die Tatsache, dass P2Y<sub>12</sub> bereits ein pharmakologisches Ziel darstellt, lässt hoffen, dass in Zukunft weitere Wirkstoffe entwickelt werden können, um die gezielte

medikamentöse Therapie neben der Kalorienreduktion und Diäten als einen Hauptbestandteil der Adipositas-Behandlung zu etablieren.



### Abb. 18 Die Rolle des P2Y12-Rezeptors in adipozytärem Gewebe:

Der P2Y12-Rezeptor senkt die Lipolyserate sowohl in braunen als auch in weißen Adipozyten, in murinen und in humanen Zellen *in vitro*. Der Transduktionsmechanismus besteht in der Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration. *Ex vivo* zeigt sich ebenfalls eine deutlich verminderte Glycerolfreisetzung, besonders in WATi. P2Y12-Antagonisten sind in der Lage, die ADP-vermittelten Effekte von P2Y12 zumindest teilweise aufzuheben, zeigen basal jedoch bereits ein vermehrte Glycerol-Konzentration. Die Zelldifferenzierung bzw.-Proliferation wird durch Akutstimulation nicht beeinflusst. Durch Ausschaltung des Rezeptors wird die basale Lipolyse deutlich gesteigert und die UCP-1-Expression in mBA verstärkt.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Metabolismus eine braunen Adipozyten	17
Abb. 2:	P2Y-Rezeptorexpression in Vorläuferzellen und in ausdifferenzierten murinen braunen Adipozyten (mBA)	21
Abb. 3:	Einfluss von P2Y-Rezeptoren auf den Fettstoffwechsel	23
Abb. 4:	CRISPR/Cas 9 Wirkungsweise in einem weißen Adipozyten	60
Abb. 5:	P2Y12-Rezeptorexpression in murinen und humanen Vorläuferzellen sowie in ausdifferenzierten Adipozyten	62
Abb. 6:	Veränderung der P2Y12-Rezeptor-Expression bei Kälteexposition und Hochfettdiät	63
Abb.7:	Regulation der Lipolyse in mBA und BAT durch P2Y12-Aktivierung	65
Abb. 8:	Signaltransduktionsmechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors in mBA	66
Abb. 9:	Kalziumaufnahme des aktivierten P2Y12-Rezeptors in mBA	68
Abb.10:	Antagonisierung von P2Y12 in mBA mit PSB 0739	69
Abb.11:	Einfluss von P2Y12 auf Zelldifferenzierung und -Wachstum	70
Abb.12:	Regulation der Lipolyse in mWA und BAT durch P2Y12-Aktivierung	71
Abb.13:	Antagonisierung von P2Y12 in WATi mit Ticagrelor	73
Abb.14:	CRISPR/Cas 9 von P2Y12 in mWA und funktionelle Auswirkungen in mBA	75
Abb. 15:	Regulation der Lipolyse in hBA durch P2Y12-Aktivierung	76
Abb. 16:	Signaltransduktionsmechanismen des aktivierten P2Y12-Rezeptors in hBA	77
Abb. 17:	Regulation der Lipolyse in hWA durch P2Y12-Aktivierung	78
Abb. 18:	Die Rolle des P2Y12-Rezeptors in adipozytärem Gewebe	91

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab.1:	P2Y-Rezeptoren	22
Tab. 2:	Geräteliste	25
Tab. 3:	Allgemeine Materialien	26
Tab. 4:	Allgemeine Chemikalien	27
Tab. 5:	Chemikalien Lipolyse	29
Tab. 6:	Chemikalien Western Blot	31
Tab. 7:	Antikörper	32
Tab. 8:	Chemikalien Proteinisolierung	33
Tab. 9:	Chemikalien Kalziummessung	34
Tab. 10:	CRISPR-Konstrukte	34
Tab. 11:	Chemikalien CRISPR	35
Tab. 12:	Mausmodell	36
Tab. 13:	Software-Versionen	36
Tab. 14:	Anleitung zur Herstellung des Separationsgels	49
Tab. 15:	Anleitung zur Herstellung des Stapelgels	49
Tab. 16:	Kontroll-PCR	55

## 8. Literaturverzeichnis

Ali SB, Turner JJO, Fountain SJ. Constitutive P2Y2 receptor activity regulates basal lipolysis in human adipocytes. *J Cell Sci* 2018; jcs.221994

Ali SB, Turner JJO, Fountain SJ. Constitutive P2Y2 receptor activity regulates basal lipolysis in human adipocytes. *J Cell Sci* 2018; jcs.221994

Arnold M, Pandeya N, Byrnes G, Renehan AG, Stevens GA, Ezzati M, Ferlay J, Miranda JJ, Romieu I, Dikshit R, Forman D, Soerjomataram I. Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 36–46

Asturias FJ, Chadick JZ, Cheung IK, Stark H, Witkowski A, Joshi AK, Smith S. Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 225–232

Avanzato D, Genova T, Fiorio Pla A, Bernardini M, Bianco S, Bussolati B, Mancardi D, Giraud E, Maione F, Cassoni P, Castellano I, Munaron L. Activation of P2X7 and P2Y11 purinergic receptors inhibits migration and normalizes tumor-derived endothelial cells via cAMP signaling. *Sci Rep* 2016; 6: 32602

Avanzato D, Genova T, Fiorio Pla A, Bernardini M, Bianco S, Bussolati B, Mancardi D, Giraud E, Maione F, Cassoni P, Castellano I, Munaron L. Activation of P2X7 and P2Y11 purinergic receptors inhibits migration and normalizes tumor-derived endothelial cells via cAMP signaling. *Sci Rep* 2016; 6: 32602

Bartelt A, Merkel M, Heeren J. A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue. *J Mol Med* 2012; 90: 887–893

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7: 947–953

Birk RZ, Regan KS, Boyle-Roden E, Brannon PM. Pancreatic Lipase and Its Related Protein 2 Are Regulated by Dietary Polyunsaturated Fat during the Postnatal Development of Rats. *Pediatr Res* 2004; 56: 256–262

Bjørnbæk C, Flier JS. Identification of novel hypothalamic genes that are regulated by leptin and play a role in development of leptin-resistance and obesity. *Nat Genet* 1999; 23: 33  
Bjørnbæk C, Uotani S, Da Silva B, Flier JS. Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 32686–32695

Bougnères P, Stunff CL, Pecqueur C, Pinglier E, Adnot P, Ricquier D. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *J Clin Invest* 1997; 99: 2568–2573

Boyer JL. Bile Formation and Cholestasis. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, editors. *Schiff's Diseases of the Liver*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2002. pp. 135–165

Bronnikov G, Bengtsson T, Kramarova L, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J.  $\beta$ 1 to  $\beta$ 3 Switch in Control of Cyclic Adenosine Monophosphate during Brown Adipocyte Development Explains Distinct  $\beta$ -Adrenoceptor Subtype Mediation of Proliferation and Differentiation<sup>1</sup>. *Endocrinology* 1999; 140: 4185–4197

Burston HE, Kent OA, Communal L, Udaskin ML, Sun RX, Brown KR, Jung E, Francis KE, La Rose J, Lowitz J, Drapkin R, Mes-Masson A-M, Rottapel R. Inhibition of relaxin autocrine signaling confers therapeutic vulnerability in ovarian cancer. *J Clin Invest* 2021; 131: e142677

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nat Med* 2005; 11: 183–190

Camell CD, Sander J, Spadaro O, Lee A, Nguyen KY, Wing A, Goldberg EL, Youm Y-H, Brown CW, Elsworth J, Rodeheffer MS, Schultze JL, Dixit VD. Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature* 2017; 550: 119–123

Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277–359

Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277–359

Carmen G-Y, Víctor S-M. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 2006; 18: 401–408

Cooper TG, Beevers H.  $\beta$  Oxidation in Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. . *J Biol Chem* 1969; 244: 3514–3520

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 1509–1517

Deng J, Chen Q, Chen Z, Liang K, Gao X, Wang X, Makota FV, Ong HS, Wan Y, Luo K, Gong D, Yu X, Camuglia S, Zeng Q, Zhou T, Xue F, He J, Wei Y, Xiao F, Ma J, Hill DL, Pierson W, Nguyen THO, Zhou H, Wang Y, Shen W, Sun L, Li Z, Xia Q, Qian K, Ye L, Rockman S, Linterman MA, Kedzierska K, Shen N, Lu L, Di Yu. The metabolic hormone leptin promotes the function of TFH cells and supports vaccine responses. *Nat Commun* 2021; 12: 3073

Ding L, Zhang F, Zhao M-X, Ren X-S, Chen Q, Li Y-H, Kang Y-M, Zhu G-Q. Reduced lipolysis response to adipose afferent reflex involved in impaired activation of adrenoceptor-cAMP-PKA-hormone sensitive lipase pathway in obesity. *Sci Rep* 2016; 6: 34374

Domingues L, Hurbain I, Gilles-Marsens F, Sirés-Campos J, André N, Dewulf M, Romao M, Viaris de Lesegno C, Macé A-S, Blouin C, Guéré C, Vié K, Raposo G, Lamaze C, Delevoye C. Coupling of melanocyte signaling and mechanics by caveolae is required for human skin pigmentation. *Nat Commun* 2020; 11: 2988

Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 2007; 27: 79–101

Effertz T, Engel S, Verheyen F, Linder R. The costs and consequences of obesity in Germany: a new approach from a prevalence and life-cycle perspective. *Eur J Health Econ* 2016; 17: 1141–1158

Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1984; 25: 1017–1058

Enerbäck S. Human Brown Adipose Tissue. *Cell Metab* 2010; 11: 248–252

Fink CS, Hamosh P, Hamosh M. Fat Digestion in the Stomach: Stability of Lingual Lipase in the Gastric Environment. *Pediatr Res* 1984; 18: 248–254

Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96: 12737–12742

Franks I. Orlistat 60 mg reduces levels of visceral adipose tissue in obese individuals. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 476

Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Acta Biochim Biophys- Lipids and Lipid Metabolism* 1986; 876: 288–293

Fritz I. The Effects of Muscle Extract on the Oxidation of Palmitic Acid by Liver Slices and Homogenates<sup>1</sup>. *Acta Physiol (Scandinavica)* 1955; 34: 367–385

Fritz IB, Yue KT. Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. *J Lipid Res* 1963; 4: 279–288

Frontini A, Cinti S. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metab* 2010; 11: 253–256

Gallardo-Montejano VI, Yang C, Hahner L, McAfee JL, Johnson JA, Holland WL, Fernandez-Valdivia R, Bickel PE. Perilipin 5 links mitochondrial uncoupled respiration in brown fat to healthy white fat remodeling and systemic glucose tolerance. *Nat Commun* 2021; 12: 3320

Gallerand A, Stunault MI, Merlin J, Luehmann HP, Sultan DH, Firulyova MM, Magnone V, Khedher N, Jalil A, Dolfi B, Castiglione A, Dumont A, Ayrault M, Vaillant N, Gilleron J, Barbry P, Dombrowicz D, Mack M, Masson D, Bertero T, Becher B, Williams JW, Zaitsev K, Liu Y, Guinamard RR, Yvan-Charvet L, Ivanov S. Brown adipose tissue monocytes support tissue expansion. *Nat Commun* 2021; 12: 5255

García-Ruiz E, Reynés B, Díaz-Rúa R, Ceresi E, Oliver P, Palou A. The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. *Int J Obes* 2015; 39: 1619–1629

Geest CR, Coffey PJ. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 237–250

Glickman RM, Green PHR, Lees RS, Tall A. Apoprotein A-I Synthesis in Normal Intestinal Mucosa and in Tangier Disease. *N Engl J Med* 1978; 299: 1424–1427

Gnad T, Scheibler S, Kügelgen I von, Scheele C, Kilić A, Glöde A, Hoffmann LS, Reverte-Salisa L, Horn P, Mutlu S, El-Tayeb A, Kranz M, Deuther-Conrad W, Brust P, Lidell ME, Betz MJ, Enerbäck S, Schrader J, Yegutkin GG, Müller CE, Pfeifer A. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 2014; 516: 395–399

Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 2577–2604

Green PHR, Glickman RM, Saudek CD, Blum CB, Tall AR. Human Intestinal Lipoproteins. *J Clin Invest* 1979; 64: 233–242

Guo D-H, Yamamoto M, Hernandez CM, Khodadadi H, Baban B, Stranahan AM. Beige adipocytes mediate the neuroprotective and anti-inflammatory effects of subcutaneous fat in obese mice. *Nat Commun* 2021; 12: 4623

Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R. Hormone-sensitive Lipase Deficiency in Mice Causes Diglyceride Accumulation in Adipose Tissue, Muscle, and Testis. *J Biol Chem* 2002; 277: 4806–4815

Hamosh M. Lingual and gastric lipases. *Nutrition* 1990; 6: 421–428

Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252–1263

Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan W-B, Julius D. The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1512–1519

Hollopeter G, Jantzen H-M, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang R-B, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202–207

Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1120–1124

Horowitz JF, Klein S. Whole body and abdominal lipolytic sensitivity to epinephrine is suppressed in upper body obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E1144-E1152

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860–867

Hoy AJ, Nagarajan SR, Butler LM. Tumour fatty acid metabolism in the context of therapy resistance and obesity. *Nat Rev Cancer* 2021; 21: 753–766

Hudgins LC, Hellerstein M, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsch J. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Invest* 1996; 97: 2081–2091

Ishibashi J, Seale P. Beige Can Be Slimming. *Science* 2010; 328: 1113–1114

Jacobson KA, Ivanov AA, Castro S de, Harden TK, Ko H. Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors. *Purinergic Signalling* 2009; 5: 75–89

Jensen-Urstad AP, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Acta Biochim Biophys - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2012; 1821: 747–753

Kim K, Kang JK, Jung YH, Lee SB, Rametta R, Dongiovanni P, Valenti L, Pajvani UB. Adipocyte PHLPP2 inhibition prevents obesity-induced fatty liver. *Nat Commun* 2021; 12: 1822

Klepac K, Kilić A, Gnad T, Brown LM, Herrmann B, Wilderman A, Balkow A, Glöde A, Simon K, Lidell ME, Betz MJ, Enerbäck S, Wess J, Freichel M, Blüher M, König G, Kostenis E, Insel PA, Pfeifer A. The Gq signalling pathway inhibits brown and beige adipose tissue. *Nat Commun* 2016; 7: 10895

Klöting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, Stumvoll M, Blüher M. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299: E506-E515

Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall SC, Innerarity TL, Blackhart B, Taylor WH, Marcel Y, Milne R, Johnson D, Fuller M, Lusic AJ, McCarthy BJ, Mahley RW, Levy-Wilson B, Scott J. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 1986; 323: 734–738

Koster J de, Nelli RK, Strieder-Barboza C, Souza J de, Lock AL, Contreras GA. The contribution of hormone sensitive lipase to adipose tissue lipolysis and its regulation by insulin in periparturient dairy cows. *Sci Rep* 2018; 8: 13378

Krintel C, Osmark P, Larsen MR, Resjö S, Logan DT, Holm C, Fox D. Ser649 and Ser650 Are the Major Determinants of Protein Kinase A-Mediated Activation of Human Hormone-Sensitive Lipase against Lipid Substrates. *PLoS ONE* 2008; 3: e3756

Kügelgen I von. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006; 110: 415–432

Kulkarni BV, Mattes RD. Lingual lipase activity in the orosensory detection of fat by humans. *Am J Physiol, Integrative and Comparative Physiology* 2014; 306: R879-R885

Lafontan M, Sengenès C, Galitzky J, Berlan M, Glisezinski I de, Crampes F, Stich V, Langin D, Barbe P, Rivière D. Recent developments on lipolysis regulation in humans and discovery of a new lipolytic pathway. *Int J Obes* 2000; 24: S47-S52

Leiss V, Schönsiegel A, Gnad T, Kerner J, Kaur J, Sartorius T, Machann J, Schick F, Birnbaumer L, Häring H-U, Pfeifer A, Nürnberg B. Lack of Gai2 proteins in adipocytes attenuates diet-induced obesity. *Mol Metab* 2020; 40: 101029

Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: A Nexus for Lipid Metabolism and Cellular Signaling. *Cell Metab* 2014; 19: 380–392

Lončar D. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res*. 1991; 266: 149–161

Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Seminars Cell Dev Biol*; 10: 51–58

Lu X, Ji Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang S, An Y, Liu P, Zheng Y. Resistance to Obesity by Repression of VEGF Gene Expression through Induction of Brown-Like Adipocyte Differentiation. *Endocrinology* 2012; 153: 3123–3132

Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 154–169

Miyoshi H, Perfield JW, Obin MS, Greenberg AS. Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. *J Cell Biochem* 2008; 105: 1430–1436

Nakamura K, Kishida T, Ejima A, Tateyama R, Morishita S, Ono T, Murakoshi M, Sugiyama K, Nishino H, Mazda O. Bovine lactoferrin promotes energy expenditure via the cAMP-PKA signaling pathway in human reprogrammed brown adipocytes. *Biometals* 2018; 31: 415–424

Né Chad M, Kuusela P, Carneheim C, Björntorp P, Nedergaard J, Cannon B. Development of brown fat cells in monolayer culture. *Experimental Cell Research* 1983; 149: 105–118

Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444-E452

O'Brien KA, Gartner TK, Hay N, Du X. ADP-Stimulated Activation of Akt During Integrin Outside-In Signaling Promotes Platelet Spreading by Inhibiting Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ . *ATVB* 2012; 32: 2232–2240

Oliver P, Sánchez J, Caimari A, Miralles O, Picó C, Palou A. The intake of a high-fat diet triggers higher brown adipose tissue UCP1 levels in male rats but not in females. *Genes Nutr* 2007; 2: 125–126

Olofsson S. Intracellular Assembly of VLDL Two Major Steps in Separate Cell Compartments. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 338–345

Omatsu-Kanbe M, Inoue K, Fujii Y, Yamamoto T, Isono T, Fujita N, Matsuura H. Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem J* 2006; 393: 171–180

Pajed L, Taschler U, Tilp A, Hofer P, Kotzbeck P, Kolleritsch S, Radner FPW, Pototschnig I, Wagner C, Schratler M, Eder S, Huetter S, Schreiber R, Haemmerle G, Eichmann TO, Schweiger M, Hoefler G, Kershaw EE, Lass A, Schoiswohl G. Advanced lipodystrophy reverses fatty liver in mice lacking adipocyte hormone-sensitive lipase. *Commun Biol* 2021; 4: 323

Pfeifer A, Hoffmann LS. Brown, Beige, and White: The New Color Code of Fat and Its Pharmacological Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015; 55: 207–227

Brown Adipose Tissue. Pfeifer A, Klingenspor M, Herzig S, Reg. Cham: Springer International Publishing 2018

Purdom T, Kravitz L, Dokladny K, Mermier C. Understanding the factors that effect maximal fat oxidation. *J Int Soc Sports Nutr* 2018; 15: 3

Qureshi AA, Jenik RA, Kim M, Lornitzo FA, Porter JW. Separation of two active forms (holo-a and holo-b) of pigeon liver fatty acid synthetase and their interconversion by

phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 66: 344–351

Raje V, Ahern KW, Martinez BA, Howell NL, Oenarto V, Granade ME, Kim JW, Tundup S, Bottermann K, Gödecke A, Keller SR, Kadl A, Bland ML, Harris TE. Adipocyte lipolysis drives acute stress-induced insulin resistance. *Sci Rep* 2020; 10: 18166

Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 633–643

Reverte-Salisa L, Sanyal A, Pfeifer A. Role of cAMP and cGMP Signaling in Brown Fat. In: Pfeifer A, Klingenspor M, Herzig S, Hrsg. *Brown Adipose Tissue*. Cham: Springer International Publishing, 2018: 161–182

Reynisdottir S, Ellerfeldt K, Wahrenberg H, Lithell H, Arner P. Multiple lipolysis defects in the insulin resistance (metabolic) syndrome. *J Clin Invest* 1994; 93: 2590–2599

Richard D. The 17th international symposium in obesity; targeting the gut to treat obesity and its metabolic comorbidities. *Int J Obes Supp* 2016; 6: S1-S2

Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty Acid Oxidation Disorders. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 477–502

Ross R, Epstein FH. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–126

Ross R, Glomset JA. The Pathogenesis of Atherosclerosis: (First of Two Parts). *N Engl J Med* 1976; 295: 369–377

Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG. Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol*; 111: 2931–2938

Rothman SS. The Digestive Enzymes of the Pancreas: A Mixture of Inconstant Proportions. *Annu Rev Physiol* 1977; 39: 373–389

Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. *Diabetes* 2009; 58: 1526–1531

Sanchez-Gurmaches J, Hung C-M, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN Loss in the Myf5 Lineage Redistributes Body Fat and Reveals Subsets of White Adipocytes that Arise from Myf5 Precursors. *Cell Metab* 2012; 16: 348–362

Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a008417-a008417

Schlossman DM, Bell RM. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Evidence that the sn-glycerol-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities are dual catalytic functions of a single microsomal enzyme. *J Biol Chem* 1976; 251: 5738–5744

Schmid-Burgk JL, Höning K, Ebert TS, Hornung V. CRISPaint allows modular base-specific gene tagging using a ligase-4-dependent mechanism. *Nat Commun* 2016; 7: 12338

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; 454: 961–967

Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB j* 1994; 8: 1248–1259

Spector AA, Kim H-Y. Discovery of essential fatty acids. *J Lipid Res* 2015; 56: 11–21

Steculorum SM, Timper K, Engström Ruud L, Evers N, Paeger L, Bremser S, Kloppenburg P, Brüning JC. Inhibition of P2Y6 Signaling in AgRP Neurons Reduces Food Intake and Improves Systemic Insulin Sensitivity in Obesity. *Cell Rep* 2017; 18: 1587–1597

Steinberg D, Huttunen JK. The role of cyclic AMP in activation of hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1972; 1: 47–62

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 85–96

van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med* 2009; 360: 1500–1508

van Veldhoven PP. Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *J Lipid Res* 2010; 51: 2863–2895

Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim K-H, Sul HS. Desnutrin, an Adipocyte Gene Encoding a Novel Patatin Domain-containing Protein, Is Induced by Fasting and Glucocorticoids. *J Biol Chem* 2004; 279: 47066–47075

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N-J, Enerbäck S, Nuutila P. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med* 2009; 360: 1518–1525

Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 1989; 28: 4523–4530

Wang H, Bell M, Sreenevasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, Londos C, Yamaguchi T, Rizzo MA, Coleman R, Gong D, Brasaemle D, Sztalryd C. Unique Regulation of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) by Perilipin 5, a Lipid Droplet-associated Protein. *J Biol Chem* 2011; 286: 15707–15715

Wang H, Hu L, Dalen K, Dorward H, Marcinkiewicz A, Russell D, Gong D, Londos C, Yamaguchi T, Holm C, Rizzo MA, Brasaemle D, Sztalryd C. Activation of Hormone-sensitive Lipase Requires Two Steps, Protein Phosphorylation and Binding to the PAT-1 Domain of Lipid Droplet Coat Proteins. *J Biol Chem* 2009; 284: 32116–32125

Wang H, Klein MG, Zou H, Lane W, Snell G, Levin I, Li K, Sang B-C. Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22: 581–585

Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* 2018; 87: 897–919

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796–1808

Wongkittichote P, Ah Mew N, Chapman KA. Propionyl-CoA carboxylase – A review. *Mol Genet Metab* 2017; 122: 145–152

Xu D, Xia L, Shen L, Lei Y, Liu L, Zhang L, Magdalou J, Wang H. Prenatal nicotine exposure enhances the susceptibility to metabolic syndrome in adult offspring rats fed high-fat diet via alteration of HPA axis-associated neuroendocrine metabolic programming. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 1526–1534

Zechner R, Strauss J, Frank S, Wagner E, Hofmann W, Kratky D, Hiden M, Levak-Frank S. The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. *Int J Obes* 2000; 24: S53-S56

Zhou QG, Zhou M, Hou FF, Peng X. Asymmetrical dimethylarginine triggers lipolysis and inflammatory response via induction of endoplasmic reticulum stress in cultured adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E869-E878

Zilversmit DB. The composition and structure of lymph chylomicrons in dog, rat, and man. *J Clin Invest* 1965; 44: 1610–1622

## 9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Betreuung von Prof. Alexander Pfeifer durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Laia Reverte Salisa (Betreuerin) und Prof. Alexander Pfeifer (Doktorvater).

Sämtliche Versuche/Analysen wurden nach Einarbeitung durch Dr. Reverte von mir mit Unterstützung durch Dr. Reverte durchgeführt.

Die Tierversuche wurden von mir mit Unterstützung durch Dr. Reverte durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Reverte generiert / zusammengestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Reverte durch mich.

Ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

## 10. Danksagung

Vielen Dank an Dr. Laia Reverte-Salisa! Laia, ohne deine Hilfe wäre diese Dissertation nicht entstanden. Deine permanente Hilfsbereitschaft, dein Aufmuntern und dein großes Verständnis nicht nur für die inhaltliche Materie, sondern auch für meine Fehler haben dieses Projekt erst möglich gemacht! Gleichzeitig war immer Platz für Humor und Neckigkeiten, die vieles leichter gemacht haben.

Vielen Dank an das gesamte Team des IPT des UKB für Eure große Hilfsbereitschaft und ein offenes Ohr für jede mögliche Frage. Hervorzuheben sind hier Dr. Jelena Zurkovic, Dr. Birte Niemann, Dr. Staffan Hildebrand, Dr. Viktoria Götz-Miroschnikow, Dr. Dennis de Coninck, Dr. Thorsten Gnad, Dr. Ju-Hee Yang, Elena Weidner, Laura Pütz und Karsten Motzler. Danke Euch allen!

Vielen Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Alexander Pfeifer für Ihre ständigen Anregungen zu den Verbesserungen des Projekts, Ihre Supervision und Ihre Offenheit, dass Dr. Reverte-Salisa und ich das Projekt in die Richtung lenken durften, die wir uns vorgestellt haben.

Vielen Dank an all diejenigen, die diese Arbeit Korrektur gelesen und ihr damit den Feinschliff verpasst haben.

Vielen Dank an Lisann Jahnel für viele Anregungen und noch mehr Hilfestellungen, ohne die das Verfassen dieser Dissertation deutlich komplizierter geworden wäre. Danke dir, Lisann, für noch vieles mehr; immer.

Der größte und wichtigste Dank geht an meine Eltern. Ohne euch hätte ich diesen Weg nicht gehen können. Für eure permanente Unterstützung, eure Ratschläge und eure Hilfe werde ich niemals dankbar genug sein können.