

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Wirkung einer 16-stündigen Nahrungskarenz auf die Relaxationsfähigkeit der murinen
thorakalen Aorta**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Dominik Martin Olinger
aus Mainz
Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	II
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
IV.	TABELLENVERZEICHNIS	VII
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURDISKUSSION	3
2.1	METABOLISCHES SYNDROM	3
2.1.1	Übergewicht und Fettleibigkeit	3
2.1.2	Definition Metabolisches Syndrom	3
2.2	VASKULÄRE FUNKTION UND DYSFUNKTION BEIM METABOLISCHEN SYNDROM	4
2.2.1	Normale Funktion der eNOS	4
2.2.2	Dysfunktion der eNOS im Metabolischen Syndrom	6
2.2.3	Normale Funktion des PVAT	7
2.2.4	Dysfunktion des PVAT im Metabolischen Syndrom	8
2.3	BLUTWERTE BEIM METABOLISCHEN SYNDROM	11
2.3.1	Serumlipide im Metabolischen Syndrom	11
2.3.2	Leberenzyme im Metabolischen Syndrom	12
2.4	FASTEN UND KALORIENRESTRIKTION	13
2.4.1	Kalorienrestriktion und Gefäßfunktion	14
2.4.2	Kalorienrestriktion und Serumlipide	14
2.4.3	Kalorienrestriktion und Leberenzyme	15
2.5	ÜBERGEWICHT DURCH HOCH-FETTHALTIGE DIÄT IM MAUSMODELL	15
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	MATERIAL	17
3.1.1	Chemikalien	17
3.1.2	Puffer und Lösungen	20
3.1.3	Antikörper	21
3.1.4	Materialien und Geräte	22
3.1.5	Software	24
3.1.6	Futter	25
3.2	METHODEN	26
3.2.1	Mäuse	26
3.2.2	Diät	26

3.2.3	<i>Gewebeentnahme</i>	28
3.2.4	<i>Myographie im Organbad</i>	31
3.2.5	<i>Serumanalyse</i>	32
3.2.6	<i>Protein-Isolation</i>	33
3.2.7	<i>BCA-Assay</i>	34
3.2.8	<i>SDS-Page</i>	34
3.2.9	<i>Western Blot</i>	35
3.2.10	<i>Statistik</i>	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	MÄUSE	37
4.1.1	<i>Gewicht</i>	37
4.1.2	<i>Wasserverbrauch</i>	41
4.1.3	<i>Gewicht Lebermittellappen</i>	43
4.2	ORGANBAD	44
4.2.1	<i>Aorta mit PVAT</i>	44
4.2.2	<i>Aorta ohne PVAT</i>	46
4.3	WESTERN BLOT	47
4.3.1	<i>Phosphorylierung von eNOS im PVAT</i>	47
4.3.2	<i>Phosphorylierung von Akt</i>	49
4.3.3	<i>Expression von Rictor und Nampt</i>	51
4.4	SERUMLIPIDE.....	52
4.5	LEBERENZYME	54
5	DISKUSSION	56
5.1	KÖRPERGEWICHT UND TRINKWASSER	56
5.1.1	<i>Gewicht</i>	56
5.1.2	<i>Wasserverbrauch</i>	57
5.2	ORGANBAD	57
5.3	WESTERN BLOT	59
5.4	SERUMLIPIDE.....	61
5.5	LEBERENZYME	62
6	ZUSAMMENFASSUNG	64
7	LITERATURVERZEICHNIS	65
8	DANKSAGUNG	73
9	TABELLARISCHER LEBENS LAUF	74

II. Abkürzungsverzeichnis

ACh.....	<i>Acetylcholin</i>
ADRF	<i>adipocyte derived relaxing factor</i>
Akt	<i>Proteinkinase B</i>
ALP	<i>alkalische Phosphatase</i>
B6-Mäuse	<i>C57BL/6J-Mäuse</i>
BH4.....	<i>Tetrahydrobiopterin</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
cGMP.....	<i>zyklisches Guanosin-Monophosphat</i>
CO ₂	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
DIO	<i>diet induced obesity</i>
eNOS.....	<i>endotheliale NO-Synthase</i>
GOT	<i>Glutamat-Oxalacetat-Transaminase</i>
GPT	<i>Glutamat-Pyruvat-Transaminase</i>
HDL	<i>High density Lipoprotein</i>
HFD	<i>High-Fat-Diet</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
KCl.....	<i>Kaliumchlorid</i>
LDL	<i>Low-density-Lipoprotein</i>
MIP1	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>
mRNA.....	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
mTOR.....	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NA.....	<i>Noradrenalin</i>
NAD ⁺	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid</i>
NADPH	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</i>
NAFLD.....	<i>non-alcoholic fat liver disease</i>
Nampt.....	<i>Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase</i>
NCD.....	<i>Normal Control Diet</i>
NCEP.....	<i>National cholesterol education program</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>

O ₂	<i>Sauerstoff</i>
PDK1	<i>Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1</i>
PON1	<i>Paraoxonase 1</i>
PPAR-gamma.....	<i>Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma</i>
PVAT	<i>perivascular adipose tissue</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
SDS-Page.....	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
SEM.....	<i>Standardfehler des Mittelwerts</i>
Ser ¹¹⁷⁷	<i>Serin¹¹⁷⁷</i>
Ser ⁴⁷³	<i>Serin⁴⁷³</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SOD	<i>Superoxiddismutasen</i>
TG.....	<i>Triglyceride</i>
Thr ³⁰⁸	<i>Threonin³⁰⁸</i>
Thr ⁴⁹⁵	<i>Threonin⁴⁹⁵</i>
TNF alpha.....	<i>Tumornekrosefaktor - alpha</i>
VLDL.....	<i>Very-low-density-Lipoprotein</i>
WHO.....	<i>World Health Organisation</i>

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Regulation der eNOS-Aktivität. Übernommen aus [32].	6
Abbildung 2 Das Adipositas-Triade-Modell. Übernommen aus [9].	10
Abbildung 3 Futterzusammensetzung.	27
Abbildung 4 Aortenring ohne PVAT.	29
Abbildung 5 Aortenring mit PVAT.	30
Abbildung 6 Aufbau Myograph.	31
Abbildung 7 Gewichtsentwicklung.	37
Abbildung 8 Gewicht vor der Euthanasie.	38
Abbildung 9 Futterverbrauch.	39
Abbildung 10 Kalorienzufuhr.	40
Abbildung 11 Trinkmengenentwicklung.	41
Abbildung 12 durchschnittlicher Wasserverbrauch.	42
Abbildung 13 Gewicht Lebermittellappen.	43
Abbildung 14 Gefäßfunktion der Aortenringe mit PVAT.	45
Abbildung 15 Gefäßfunktion der Aortenringe ohne PVAT.	46
Abbildung 16 Phosphorylierung der eNOS im PVAT der thorakalen Aorta.	48
Abbildung 17 Phosphorylierung der Akt-Kinase im PVAT der thorakalen Aorta.	50
Abbildung 18 Rictor- und Nampt-Expression im PVAT der thorakalen Aorta.	51
Abbildung 19 Serumlipide.	53
Abbildung 20 Leberenzyme.	55

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	17
Tabelle 2: Puffer und Lösungen	20
Tabelle 3: Antikörper	21
Tabelle 4: Materialien und Geräte	22
Tabelle 5: Verwendete Software	24
Tabelle 6: Futter	25
Tabelle 7: Randomisierung.....	28
Tabelle 8: Verdünnung Serumanalysen	33
Tabelle 9 Standardkurve BCA-Assay	34

1 Einleitung

Übergewicht und Fettleibigkeit haben sich seit 1975 verdreifacht [1]. 2016 waren 39% der über 18-Jährigen übergewichtig und 13% fettleibig [1]. Die Welt-Gesundheitsorganisation (WHO) macht besonders fett- und zuckerhaltiges, verarbeitetes Essen sowie mangelnde Bewegung dafür verantwortlich [1]. Wirklich beeindruckend werden die Zahlen erst vor dem Hintergrund, dass Übergewicht und Fettleibigkeit Hauptrisikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankungen sowie muskuloskeletale Erkrankungen sind. Diese Erkrankungen sind neben Krebserkrankungen die Haupttodesursachen in den Industrienationen [1].

Ob es sich bei Übergewicht und Fettleibigkeit um eine Erkrankung handelt oder ob es Symptome einer Krankheit sind, ist schwierig zu beantworten. Einig ist sich die Fachwelt aber darüber, dass es sich bei Übergewicht und Adipositas um eine weltweite Pandemie handelt, die unbedingt behandelt werden muss [2].

Optimale Ernährung ist mit einer erhöhten Lebenserwartung verbunden. Zeitgleich geht mit chronischen Erkrankungen eine dramatische Erhöhung des Lebenszeitrisikos einher [3].

Dass einfache Kalorienrestriktion und auch körperliches Training sich positiv auf die Gewichtsentwicklung sowie andere messbare Körperfunktionen ausüben, konnte längst nachgewiesen werden [4]. Die bariatrische Chirurgie konnte nicht nur das Gewicht reduzieren, sondern auch die vaskuläre Funktion wieder verbessern [5]. Xia et al. haben in einem Mausmodell gezeigt, dass bestimmte Nahrungsergänzungsmittel einen Einfluss auf die vaskuläre Dysfunktion haben und diese wieder deutlich verbessern [6].

Viele Diäten und Fastenkonzepte können sich zumindest kurzfristig positiv auf das Körpergewicht auswirken [7]. Oft werden diese Diäten oder Fastenkonzepte mit körperlichem Training verbunden und können so die gewünschten Effekte, wie Gewichtsverlust oder Verminderung der kardio-vaskulären Risikomarker, steigern [7, 8].

Das intermittierende Fasten ist ein solches Konzept, das immer mehr an Popularität gewinnt. Tägliche Fastenphasen von 16 Stunden gefolgt von 8 Stunden der Nahrungsaufnahme ermöglichen eine Kalorienrestriktion und Gewichtsverlust [7]. Ein positiver Effekt auf den Stoffwechsel von Blutfetten konnte trotz weiterer Aufnahme von Fetten und Zucker nachgewiesen werden [8].

In den letzten Jahren ist das perivaskuläre Fettgewebe (PVAT) immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt, da das PVAT viele vasoaktive Substanzen produziert und sezerniert und damit maßgeblichen Einfluss auf die Gefäßfunktion nimmt [9].

Mit der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere der Einfluss des Fastens auf das Gefäßsystem untersucht. Dabei lag der Fokus im Speziellen auf dem Einfluss des Fastens auf das PVAT. Im Modellversuch wurden Mäuse 16 Stunden einer Nahrungskarenz unterzogen, und die Auswirkungen auf deren Aorta anschließend im Organbad untersucht. Des Weiteren wurde versucht mit molekularbiologischen Methoden eine Erklärung für die beobachteten Effekte zu finden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Metabolisches Syndrom

2.1.1 Übergewicht und Fettleibigkeit

Die WHO definiert Übergewicht und Fettleibigkeit als übermäßige oder abnormale Fettansammlung, die die Gesundheit gefährden kann.

Als Maßeinheit wird der Body-Mass-Index (BMI) (Gewicht in kg geteilt durch die Körpergröße zum Quadrat in m^2) zu Hilfe genommen. Ein BMI über 25 wird als Übergewicht definiert und ein BMI über 30 als Fettleibigkeit (Adipositas) [1].

Die Ursachen für Übergewicht sind multifaktoriell. So spielen mangelnde Bewegung, ungesunde Ernährungsgewohnheiten, erhöhte Energiedichte in verarbeiteten Lebensmitteln sowie einfacher und schneller Zugang zu Nahrungsmitteln jeglicher Art eine Rolle [1, 10]. Vor allem in den reichen Industrienationen sind Übergewicht und Fettleibigkeit ein wachsendes Problem [11]. Auch niedrige Kosten für kalorienreiches aber nährstoffarmes Essen spielen eine wichtige Rolle [12]. Lavie et al. postulieren, dass Adipositas zahlreiche nachteilige Auswirkungen auf den Kreislauf und die kardiovaskuläre Struktur und Funktion hat. Adipöse Patienten entwickeln mit größerer Wahrscheinlichkeit Bluthochdruck und Kardiomyopathie und haben ein höheres Schlaganfallrisiko als normalgewichtige Menschen [13].

Da ist es nicht verwunderlich, dass Adipositas das größte Gesundheitsproblem der Menschen in den Industrieländern ist und mit einer erhöhten Prävalenz von metabolischen Erkrankungen einhergeht [14].

2.1.2 Definition Metabolisches Syndrom

Das Metabolische Syndrom ist ein Komplex aus diversen Erkrankungen, Symptomen und Laborwerten. Daraus ergibt sich die natürliche Schwierigkeit eine einheitliche Definition zu bilden. Das ist der Grund, warum viele Fachgesellschaften und Organisationen ihre eigene Definition des Metabolischen Syndroms haben. Zum Beispiel beschreibt die WHO 1999 das Metabolische Syndrom als einen pathologischen Zustand, der durch abdominale Adipositas, Insulinresistenz, Bluthochdruck und Hyperlipidämie gekennzeichnet ist [15]. Die International Diabetes Federation (IDF) beschreibt 2006 das Metabolische Syndrom in Abhängigkeit vom Taillenumfang, dem Blutzuckerspiegel, den Serumlipiden und dem Blutdruck [16]. Das

National Cholesterol Education Programm (NCEP) beschreibt das 2005 sehr ähnlich, nur dass als Taillenumfang ein anderer Wert angegeben wird [17]. Andere Fachgesellschaften haben auch eigene Definitionen, die aber nicht so im Mittelpunkt stehen. Diese Unterschiedlichkeit der Definitionen lässt erkennen, dass am Metabolischen Syndrom derzeit noch viel Forschung betrieben wird.

Im Rahmen der Diskussion um die richtige Definition des Metabolischen Syndroms müssen auch noch weitere Zusammenhänge betrachtet werden. Wildman et al. zeigen, dass die metabolisch gesunden Adipösen einen größeren Anteil an den fettleibigen Patienten ausmachen könnten als bisher angenommen [18].

Auch ein genetischer Beitrag zur Adipositas-Entwicklung wurde bereits nachgewiesen. Locke et al. haben 97 Genloci identifiziert, die Auswirkung auf den BMI haben, allerdings sind diese nicht ausreichend, um die pandemischen Ausmaße des Metabolischen Syndroms zu erklären [19].

1993 wurde von Despres das abdominelle Fett als ein entscheidendes Symptom des Metabolischen Syndroms identifiziert [20]. Einige Regulationsmechanismen wie die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), der Proteinkinase B (Akt) oder die Menge der Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase (Namt) im Fettgewebe scheinen einen großen Einfluss auf die Dysfunktion des Fettgewebes zu haben [21-23].

2.2 Vaskuläre Funktion und Dysfunktion beim Metabolischen Syndrom

2.2.1 Normale Funktion der eNOS

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger lokal wirkender Vasodilatator. Zudem werden ihm antiinflammatorische und thrombozythenaggregationshemmende Eigenschaften zugeschrieben, weshalb eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit eine wichtige Rolle bei der Genese der Arteriosklerose spielt [24, 25].

NO wird durch die Reaktionsfreudigkeit mit Sauerstoff schnell inaktiviert, was seine kurze Halbwertszeit erklärt [24]. Aus diesem Grund muss NO lokal produziert werden und wirkt nicht systemisch.

Die eNOS ist ein auf der Plasmamembran von Endothelzellen exprimiertes Protein, das NO produziert [26]. Es konnte gezeigt werden, dass die eNOS auch im PVAT zu finden ist [22].

Die eNOS produziert NO in zwei Schritten. Zuerst wird L-Arginin zu N-Hydroxy-L-Arginin hydroxyliert und in einem zweiten Schritt weiter zu NO und L-Citrullin oxidiert [27]. Ein wichtiger Punkt bei der Reaktion ist die Übertragung von Elektronen von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) auf ein Hämmolekül, das als Kofaktor dient [27]. Die Elektronen werden zur Aktivierung von molekularem Sauerstoff genutzt [27].

Die eNOS kann Calcium-abhängig und Calcium-unabhängig reguliert werden. Calcium-abhängig erfolgt die Aktivierung der eNOS über Stimuli wie Acetylcholin (ACh) oder Bradykinin [28].

Calcium-unabhängig wird die eNOS über Akt vermittelte Phosphorylierung reguliert [26, 29]. Serin¹¹⁷⁷ (Ser¹¹⁷⁷) wird als die wichtigste Stelle angesehen, an der eNOS phosphoryliert werden kann und dadurch der Elektronenfluss von NADPH auf das Hämmolekül erhöht wird [30, 31].

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist der laminare Scherstress. Dieser aktiviert die Phosphorylierung von Serin⁴⁷³ (Ser⁴⁷³) der Akt, was ebenfalls die NO-Produktion über gesteigerte Phosphorylierung von eNOS an Ser¹¹⁷⁷, erhöht [23].

Die wichtige vasodilatatorische Wirkung erzeugt NO über die Bindung und Aktivierung der intrazellulären Guanylatzyklase von glatten Muskelzellen in Gefäßwänden [24]. Die konsekutive Erhöhung des intrazellulären zyklischen Guanosin-Monophosphat-Spiegels (cGMP) führt über die Aktivierung der Proteinkinase G zur Dephosphorylierung der Myosin-Leichtketten in glatten Muskelzellen. Die Dephosphorylierung an der Myosin Leichtkette führt zur Entspannung der Muskelzelle. Eine Vasodilatation ist die Folge [24].

Die Regulation der eNOS kann über eine Phosphorylierung erfolgen. Einerseits wirkt eine Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷, zum Beispiel durch die Akt-Kinase oder die Proteinkinase A, aktivierend auf die eNOS. Andererseits hemmt eine Phosphorylierung an Threonin⁴⁹⁵ (Thr⁴⁹⁵), zum Beispiel durch die Proteinkinase C das eNOS-Enzym [32].

In einer Studie von Xia et al. wurde im PVAT keine verminderte Expression der eNOS bei fettleibigen Mäusen beobachtet, sondern eine verringerte Phosphorylierung der Ser¹¹⁷⁷ [22].

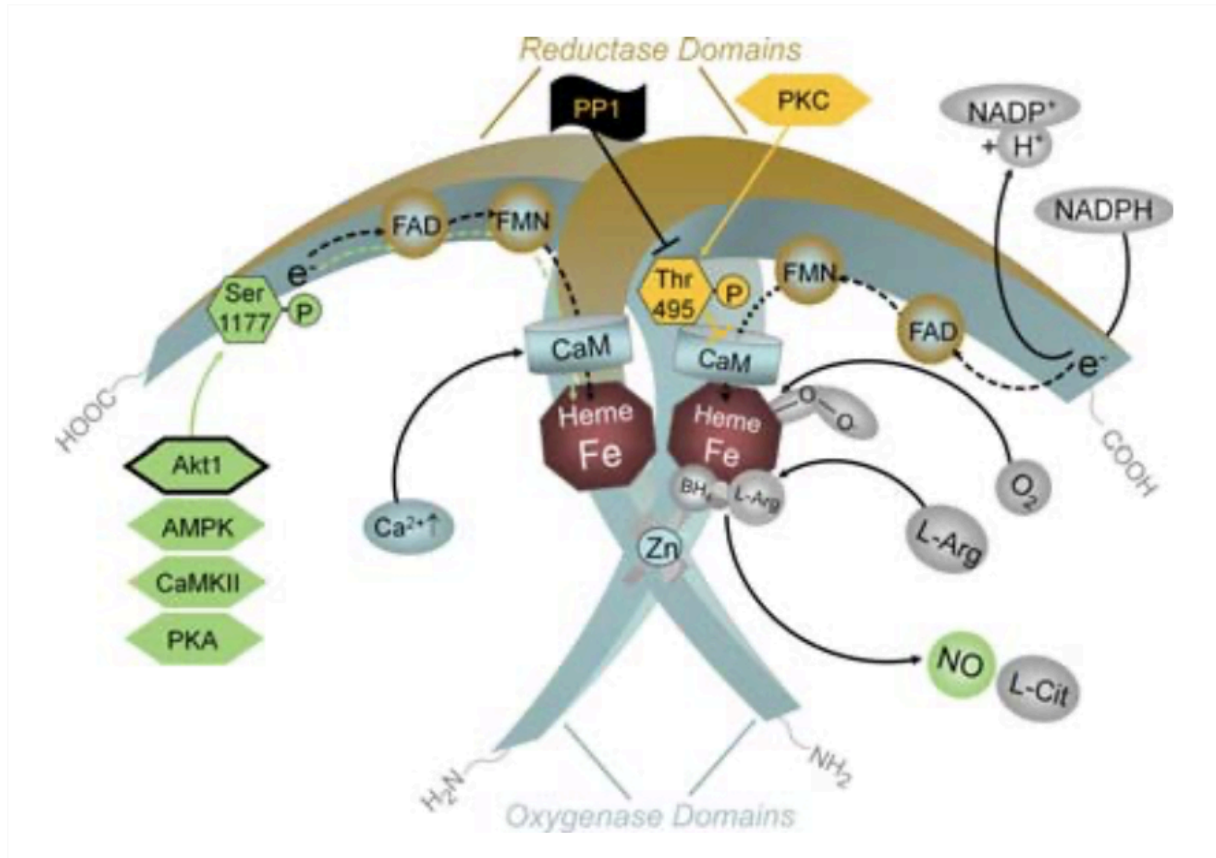


Abbildung 1 Regulation der eNOS-Aktivität. Übernommen aus [32].

2.2.2 Dysfunktion der eNOS im Metabolischen Syndrom

NO ist neben anderen Stoffen unter physiologischen Bedingungen ein wichtiger vasoprotektiver Faktor. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, hat NO zusätzlich einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenaktivität und die Inflammation im Fettgewebe [28]. Mit diesen Eigenschaften wirkt es der für kardiovaskuläre Erkrankungen wichtigen Arteriosklerose entgegen [28].

Unter anderem durch dauerhafte latente Entzündung des Fettgewebes bei Fettleibigkeit und Metabolischem Syndrom [33] erhöht sich die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanionen und dadurch der Oxidative Stress im Gewebe [28]. Selbst unter physiologischen Konditionen inaktivieren ROS das NO. Bei erhöhtem Oxidativem Stress steht weniger NO zur Verfügung als im physiologischen Zustand. Zusätzlich entsteht intrazellulär

Peroxyinitrit, welches den Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH4) der eNOS oxidiert [28]. Der dadurch resultierende Mangel an BH4 entkoppelt die Sauerstoffreduktion der eNOS von der NO-Bildung. Durch diese Entkopplung produziert das eigentlich vasoprotektive Enzym Superoxidanionen, welche den Oxidativen Stress weiter steigern [28].

Die eNOS benötigt als Substrat nur geringe Mengen an L-Arginin. Trotzdem kann ein Mangel an L-Arginin zu einer verminderten Synthese von NO führen. Zusätzlich gibt es einen intrazellulären Recyclingmechanismus, der zusätzlich vor einem L-Arginin-Mangel schützt. Deshalb entsteht unter physiologischen Bedingungen kein L-Arginin-Mangel [32].

Allerdings kann es bei Adipositas zu einer erhöhten Arginase-Expression kommen. Die Arginasen reduzieren L-Arginin zu Ornithin und Harnstoff [34]. Dadurch kann es zu einem Mangel an L-Arginin kommen. Xia et al. konnten zeigen, dass bei fettleibigen Mäusen tatsächlich ein Mangel an L-Arginin im PVAT festzustellen war. Durch Zugabe von L-Arginin und einem Arginase-Hemmer konnte die L-Arginin-Mangel-bedingte Gefäßdysfunktion rückgängig gemacht werden [9, 22].

Diese Mechanismen stellen eine wichtige Pathophysiologie der vaskulären Dysfunktion dar.

2.2.3 Normale Funktion des PVAT

Fast alle Blutgefäße sind mit PVAT umgeben [35]. Ursprünglich wurde das PVAT nur als stützendes Gewebe angesehen, doch mit der Zeit wurde das PVAT als endo- und parakrin aktives Organ betrachtet [14, 36-38]. Dies ist ein sehr wichtiger Aspekt vor dem Hintergrund, dass das PVAT 3% des gesamten Körperfetts ausmacht [14]. Es kann seiner parakrinen Funktion auf die Gefäßregulation besonders gut nachkommen, da kein trennendes Gewebe zwischen PVAT und Adventitia liegt [39]. Aufgrund vieler früherer Berichte scheint es derzeit unzweifelhaft zu sein, dass es einen Beweis für eine enge Beziehung zwischen Fettzellen und Blutgefäßentwicklung gibt [40]. Die Übersichtsarbeit von Bays et al. veranschaulicht, dass Blutgefäßzellen und Adipozyten von gemeinsamen mesenchymalen Stammzellen abstammen [41]. Die parakrine Funktion wurde erstmalig 1991 von Soltis et al. beschrieben [42]. Mittlerweile weiß man, dass das PVAT den Gefäßtonus durch diverse Mechanismen endo- und parakrin reguliert [9]. Mehr als 50 bioaktive Moleküle wie NO, Leptin, diverse Interleukine oder Tumornekrosefaktor-alpha (TNF alpha) wurden nachgewiesen [22, 43-45]. Die Biomoleküle, die den Gefäßtonus beeinflussen nennt man adipocyte derived relaxing factors (ADRF) [9, 45]. Wahrscheinlich ist auch, dass mehrere dieser ADRF unterschiedlichen Einfluss auf den Gefäßtonus nehmen [9].

Das PVAT unterliegt, wie alle Fettgewebe, der Wachstumsregulation durch die Serin/Threonin-Kinase Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) [46]. mTOR besteht aus zwei Multiproteinkomplexen. Der zweite Komplex ist durch sein essentielles Regulatorprotein Rictor gekennzeichnet, das Signale von Wachstumsfaktoren zum Zellüberleben oder Zytoskelettorganisation integriert [47]. Rictor reguliert auch die Aktivität der Akt-Kinase. Es phosphoryliert Akt an Ser⁴⁷³, was die Aktivität von Akt steigert und so zu einer vermehrten Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁷ führt [32, 48]. So reguliert Rictor auch die NO Produktion. Rictor hat außerdem einen Einfluss auf die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Interleukin 6 (IL-6), Macrophage Inflammatory Protein 1 (MIP1) und TNF-alpha [49], worauf in Kapitel 2.2.4 noch näher eingegangen wird.

Die Akt-Kinase kann nicht nur an Ser⁴⁷³ durch mTOR phosphoryliert werden, sondern auch durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 (PDK1) am Threonin³⁰⁸ (Thr³⁰⁸) [50]. Beide Phosphorylierungsstellen an Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ zusammen werden als Maß für die Phosphorylierung der Akt im Vergleich zur Basalaktivität genommen [50].

Ein weiterer Regulationspunkt für das PVAT ist die Nampt [21]. Sie ist das ratenlimitierende Enzym der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺)-Biosynthese. Es hat sich gezeigt, dass die Nampt-abhängige NAD⁺ - Biosynthese dynamisch auf Umwelt- und Ernährungsfaktoren reagiert [51, 52]. Interessant ist es, dass Diät induziertes Übergewicht (DIO) zu einer verminderten Nampt-Expression führen kann [21]. Der daraus resultierte Mangel an NAD⁺ führt zur Hemmung der NAD⁺-abhängigen Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1), und dadurch zur Hemmung der eNOS-Aktivität aufgrund einer verstärkten Acetylierung [53].

2.2.4 *Dysfunktion des PVAT im Metabolischen Syndrom*

Ketonen et al. beschreiben 2010, dass Nagetiere, die am Metabolischen Syndrom leiden, die antikontraktile Wirkung des PVAT verlieren. In ihrem Experiment zeigen sie sogar, dass sich die Gefäßfunktion durch das PVAT verschlechtert [37]. In anderen Studien wurde gezeigt, dass sich die Gefäßfunktion nur verschlechtert, wenn das PVAT an den Gefäßen belassen wird [9].

In menschlichen kleinen Arterien geht der antikontraktile Effekt von PVAT bei adipösen Patienten mit metabolischem Syndrom vollständig verloren [54]. Greenstein et al. haben in humanen Glutealarterien nachgewiesen, dass bei gesunden Individuen die PVAT einen Faktor freisetzt, der die NO-Konzentration im PVAT erhöht. Bei Patienten mit Metabolischen Syndrom konnte diese vasorelaxierende Wirkung nicht beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine

vergrößerte Oberfläche der Adipozyten im Vergleich zu denen gesunder Individuen [54]. Passend dazu wurde eine verminderte NO-Synthese bei adipösen Tieren [55] und auch beim Menschen [56] gefunden. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass dieser Effekt sich durch einen Gewichtsverlust nach bariatrischer Operation rückgängig machen lässt [5]. Einige Studien zeigen, dass eine Entkopplung der eNOS wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, nur im PVAT stattfindet, nicht aber im Endothel der adipösen Mäuse. Ebenso finden sich eine Verminderung von L-Arginin, eine vermehrte Arginase-Aktivität und ein vermindertes Phosphorylierungsverhältnis von Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ in Akt [9, 22, 45].

Xia und Li schlagen in ihrem Review-Artikel von 2017 eine Adipositas-Trias (obesity triade) als pathophysiologisches Modell vor. Sie besteht aus Hypoxie, Inflammation und oxidativem Stress im PVAT [9]. Die Hypoxie resultiert aus einem Mangel an kapillaren Blutgefäßen in den bei adipösen Patienten vergrößerten Adipozyten. Aus der Hypoxie resultiert eine Entzündungsreaktion im Fettgewebe mit einem Anstieg der Zytokine wie TNF-alpha und IL-6 [54]. Diese Zytokine verursachen dann eine Einwanderung von Makrophagen [54], welche die Entzündungsreaktion weiter antreiben und die Aktivität der NADPH-Oxidasen im PVAT erhöhen [9, 57]. NADPH-Oxidasen produzieren Superoxidanionen. In Kombination mit einer Reduktion an Superoxiddismutasen (SOD) erhöht sich auch der oxidative Stress in PVAT [9, 58]. So entsteht im PVAT von adipösen Individuen ein Teufelskreis, bei dem vermehrter oxidativer Stress zu mehr Inflammation führt und die wiederum Oxidativen Stress hervorruft [22]. Adipositas führt nicht nur zu einer Dysfunktion des PVAT sondern sorgt auch für eine Entkopplung der eNOS [9].

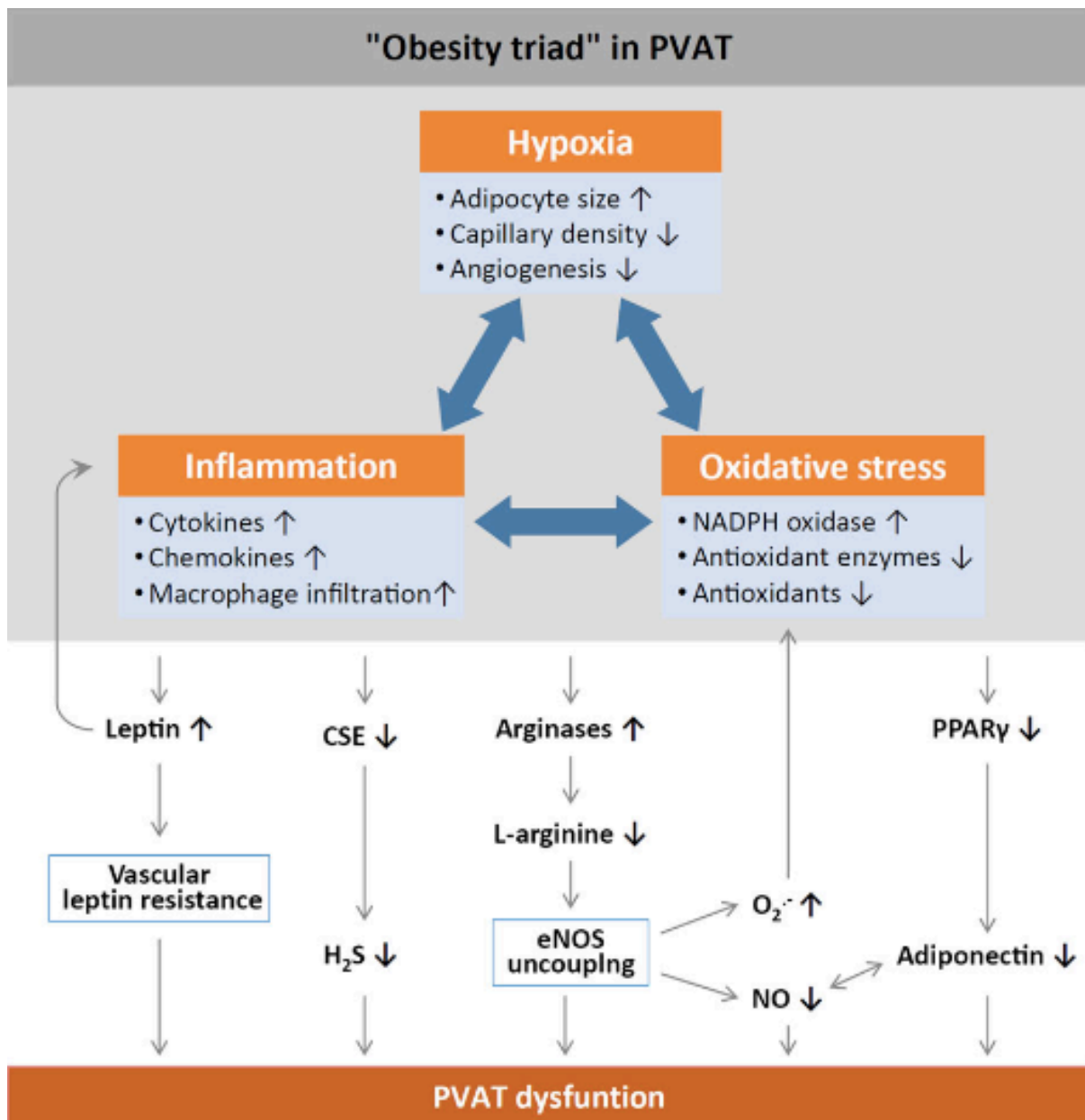


Abbildung 2 Das Adipositas-Triade-Modell. Übernommen aus [9].

2.3 Blutwerte beim Metabolischen Syndrom

2.3.1 Serumlipide im Metabolischen Syndrom

Übergewicht und Fettleibigkeit sind wichtige Ursachen für Dyslipidämie [59]. Dyslipidämie wiederum ist ein Hauptrisikofaktor zur Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen und Arteriosklerose [60]. In Folge der Arteriosklerose kommt es zu einer Entzündung der Gefäßwände [60]. Deshalb stehen Cholesterin und seine Lipoproteine in vielen Definitionen des Metabolischen Syndroms im Mittelpunkt [17]. Adipositas geht häufig mit niedrigen High-density-Lipoprotein-Spiegeln (HDL) und einem Anstieg der Triglycerid reichen Lipoproteine einher [61], was als atherogene Dyslipidämie bezeichnet wird.

Low-density-Lipoprotein (LDL) besteht hauptsächlich aus Apolipoprotein B100, Cholesterin und Triglyceriden (TG) [62]. Die Aufgabe des LDL ist es endogenes Cholesterin und biologisch aktive Phospholipide von der Leber in die restlichen Gewebe zu transportieren [63]. Selbst bei niedrigen LDL-Plasmaspiegeln sind die LDL-Rezeptoren gesättigt. So kommt es bei einer Erhöhung der LDL-Plasmaspiegel zu einer rezeptorunabhängigen Aufnahme von LDL im Gewebe. Dieser Mechanismus ist ein wichtiger Schritt in der Entstehung von Arteriosklerose [63].

LDL kann im Endothel, wenn es dort bei erhöhten Plasmaspiegeln abgelagert wird, über verschiedene Mechanismen das durch eNOS produzierte NO vermindern [64]. Zusätzlich kann es mit proinflammatorischen Effekten weiter die Entstehung von Arteriosklerose begünstigen und vorantreiben [64].

Vor allem oxidiertes LDL übt den atherogenen Effekt aus [65].

Neben erhöhten LDL-Spiegeln im Blutplasma, ist ein erniedrigter HDL-Spiegel typisch für eine durch Adipositas induzierte Dyslipidämie [66]. Mittlerweile ist anzunehmen, dass weniger der quantitative Effekt von HDL einen positiven Einfluss auf die Genese von Arteriosklerose hat, als vielmehr die Qualität von HDL [66]. Prinzipiell ist die Aufgabe von HDL das Cholesterin von peripheren Zellen zurück zur Leber zu transportieren. Die Leber kann dann das Cholesterin metabolisieren und über die Galle ausscheiden [67]. Ein weiterer positiver Effekt der HDL ist die Interaktion mit Endothelzellen [65]. Die vorteilhaften Eigenschaften von HDL auf das Endothel ist zum einen der gefäßerweiternde Effekt. Dieser wird hauptsächlich durch Stimulierung der Freisetzung von NO aus Endothelzellen vermittelt [68, 69]. Zum anderen spielt aber auch die Produktion von Prostazyklin eine Rolle [70].

HDL reduziert außerdem die Aktivität der NADPH-Oxidase im Endothel, was die zelluläre Produktion von Superoxid reduziert [71]. Zusätzlich kann HDL die LDL durch seine

antioxidative Aktivität vor Oxidation durch freie Radikale schützen, und so die Atherogenität von LDL senken [72, 73]. HDL hat ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften. Durch die Modulation des nukleären Faktors κ B und des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors gamma (PPAR-gamma) hemmt HDL außerdem die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [74]. Über PPAR-gamma wird zudem der Spiegel von Adiponectin gesteuert, der ebenfalls die NO-Produktion reguliert [9] (Abbildung 2).

Die Paraoxonase 1 (PON1) ist ein exklusiv mit HDL assoziiertes Enzym, das vor allem antioxidative und antiinflammatorische Effekte vermittelt [75].

Charakteristisch für die Dyslipidämie ist eine verminderte Clearance von triglyceridreichen Lipoproteinen, die durch einen relativen Mangel an Insulin-sensitiver Lipoprotein-Lipase verursacht wird [59, 76, 77]. Die Lipoprotein-Lipase hydrolysiert Triglyceride von Chylomikronen und Very-low-density-Lipoproteinen (VLDL), was zu einer Schrumpfung der Partikel und einem Transfer von Oberflächenphospholipiden und Apolipoproteinen auf HDL führt. Dadurch wird die HDL-Größe erhöht. Es wurde gezeigt, dass bei Adipositas die Lipoprotein-Lipase-Aktivität auf Glukosestimulation reduziert wird [78], was einen möglichen Faktor darstellt, der zur Abnahme des HDL bei Adipositas beiträgt. Die niedriggradige Entzündung des Fettgewebes bei Adipositas kann zu einer Hochregulation der endothelialen Lipase führen, die wiederum einen erniedrigten HDL-Spiegel zur Folge haben kann [79].

Es ist bekannt das HDL sogar entzündliche und atherogene Eigenschaften bei kardiovaskulären Erkrankungen haben kann [80]. Sorrentino et al. zeigen, dass Adipositas-assoziierte Komplikationen, wie z. B. Entzündungen oder Diabetes, HDL nachweislich dysfunktional machen [81].

HDL, welches aus Patienten mit Typ-2-Diabetes isoliert wurde, reduzierte den endothelialen Oxidativen Stress nicht. Auch die endothelabhängige Vasodilatation verbesserte solches HDL nicht, im Gegensatz zu HDL, das aus gesunden Probanden isoliert wurde [81].

2.3.2 *Leberenzyme im Metabolischen Syndrom*

Die zentrale Aufgabe der Transaminasen Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) ist der Umbau von Aminosäuren durch Desaminierung. Obwohl die Transaminasen in jeder Zelle vorkommen, gibt es eine starke Organselektivität hin zur Leber. Da die Transaminasen zellgebunden vorliegen, erlaubt ihre Aktivität im Blut eine Aussage über die Zellschädigung [82].

Die nicht-alkoholische-Fettleber-Erkrankung (NAFLD) ist definiert durch einen Fettanteil der Leber von 5-10% [83]. Schätzungsweise sind 10-24% der allgemeinen Bevölkerung daran

erkrankt [84]. NAFLD ist eine Erkrankung mit multifaktoriellen Ursachen, von denen Adipositas die am häufigsten assoziierte Ursache ist [85]. Es besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Gesamt-Cholesterin und vermindertem Rücktransport von Cholesterin zur Leber [86]. Die Pathogenese der NAFLD und der Einfluss auf das Cholesterin und damit auf die vaskuläre Dysregulation ist bisher nicht gut verstanden und ist Thema weiterer Forschungsbestrebungen [86, 87].

Die alkalische Phosphatase (ALP) kommt in vielen Geweben vor, unter anderem in Leber, Darm oder Knochen. In der Leber ist sie auf den biliären Epithelzellen zu finden. Sie ist dort am Transport von Galle beteiligt [88]. Beim Menschen kann eine erhöhte intestinale ALP-Aktivität nach dem Essen zu einem 5-fachen Anstieg der ALP-Aktivität im Serum führen, insbesondere bei Menschen, die eine fettreiche Ernährung zu sich nehmen [89]. Lebererkrankungen zeigen neben erhöhten GPT und GOT Spiegeln häufig auch erhöhte ALP-Spiegel im Serum [90].

2.4 Fasten und Kalorienrestriktion

Eine tägliche Fastenperiode von 8-10 Stunden über Nacht ist für die meisten Menschen normal [91]. Abgesehen davon praktizieren viele gläubige Menschen unabhängig von dem Gedanken des Gewichtsverlustes vorgeschriebene Fastenphasen, zum Beispiel im Christentum die Fastenzeit vor Ostern oder im Islam den Ramadan. Eine genaue Definition des Begriffs „Fasten“, ab wann es als solches gilt oder wie lange es anhalten muss, konnte in der Literaturrecherche nicht gefunden werden.

Seit die Zahlen an übergewichtigen Menschen nach oben klettern, wachsen auch die Zahlen an verschiedenen Diät-Strategien [92]. Für viele ist Fasten eine Möglichkeit zur Therapie der Adipositas [93, 94]. Diverse Fastenkonzepte sind bekannt, doch zu den populärsten gehört das Intervallfasten. Die 5:2-Diät nach Mosley ist eine der bekanntesten, bei der an zwei Tagen in der Woche keine Kalorien aufgenommen werden [95]. Das Konzept beruht hauptsächlich auf dem Buch der Ernährungswissenschaftlerin Michelle Harvie [96]. Eine andere bekannte Art des Fastens ist es täglich über Nacht 16 Stunden keine Kalorien zu sich zu nehmen [97]. Es konnte gezeigt werden, dass Intervallfasten das Risiko für chronische Krankheiten wie Diabetes Mellitus Typ 2 und Herz-Kreislaufkrankungen senken kann [98].

Erwähnt werden muss auch, dass die Studienlage was das Intervallfasten angeht, nicht eindeutig ist. So haben Harder-Lauridsen et al. gezeigt, dass Intervallfasten sich nicht oder nur gering von anderen Diätformen unterscheidet [99].

2.4.1 Kalorienrestriktion und Gefäßfunktion

Wenn die Fettmasse bei stark adipösen Probanden reduziert wird, konnte nicht nur eine Reduktion von Gewicht, Blutdruck, Entzündungen und Stoffwechseleränderungen erreicht werden, sondern auch eine Verbesserung der antikontraktilen Funktion ihres perivaskulären Fettgewebes [5]. Insbesondere scheint eine Kalorienrestriktion durch eine antioxidative Wirkung und dank einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit einen schützenden Effekt auf das Endothel auszuüben [100]. Eine Verbesserung der Endothel-abhängigen Dilatation konnte auf eine gesteigerte Expression von eNOS zurückgeführt werden [101]. Ebenfalls konnte eine Reduktion der NADPH-Oxidase und ein Anstieg der SOD nachgewiesen werden [102]. Eine durch Kalorienrestriktion induzierte anhaltende Gewichtsabnahme bei fettleibigen Ratten führt zu einer Verbesserung der PVAT-Funktion, die mit einer Normalisierung der durch Fettleibigkeit induzierten Hypertonie, der Wiederherstellung der Adipozytengröße, der PVAT-eNOS-Funktion, der PVAT-TNF-alpha-Expression und der Normalisierung der Plasma-Adipokinspiegel, einschließlich Leptin und Insulin, verbunden ist [103].

Cerqueira et al. konnten zeigen, dass Mäuse, die einer Kalorienrestriktion unterzogen wurden, deutlich mehr phosphoryliertes eNOS vorweisen als Mäuse der Kontrollgruppe die Futter ad libitum bekamen [104].

Neuere Studien haben gezeigt, dass die NAMPT-vermittelte NAD⁺-Biosynthese im Fettgewebe dynamisch durch Ernährungs- und Umweltfaktoren reguliert wird. Zum Beispiel zeigt die Expression von NAMPT Messenger Ribonukleinsäuren (mRNA) und NAMPT-Protein im Fettgewebe ein robustes tageszeitliches Oszillationsmuster [51, 52]. Kalorienrestriktion erhöht deutlich die Expression von NAMPT-mRNA und NAMPT-Protein sowie den NAD⁺-Gehalt im Fettgewebe [105, 106]. Im Gegensatz dazu verringert genetische oder durch Diät-induzierte Fettleibigkeit den Nampt- und NAD⁺-Gehalt im Fettgewebe [107-109] und dämpft die tageszeitliche Oszillation der NAMPT-Genexpression [51].

2.4.2 Kalorienrestriktion und Serumlipide

Wang et al. zeigten in einer Studie aus dem Jahr 2011, dass eine mehrwöchige Kalorienrestriktion zwar einen Einfluss auf die Regulationsmechanismen von HDL hat, aber den HDL-Spiegel nicht signifikant senkt und den Rücktransport von Cholesterin zur Leber nicht erhöht [110]. Maroofi und Nasrollahzadeh zeigten, dass intermittierende und nicht-intermittierende Kalorienrestriktion einen positiven Einfluss auf das Körpergewicht und Triglyceridspiegel haben, aber auch hier keinen Einfluss auf die HDL-Werte hatten [111].

Liang et al. konnten in einer Studie zeigen, dass eine Kalorienrestriktion zusammen mit leichter körperlicher Aktivität bei Patienten mit Metabolischem Syndrom das Gewicht reduziert, aber auch die PON1 Aktivität zurück gegangen ist [112]. Kotani et al. konnte den Rückgang von PON1 ebenfalls zeigen [113]. Täglich alternierendes Fasten mit einem Tag fasten und einem Tag mit normaler Ernährung, konnte eine Gewichtsreduktion, und eine Senkung der Triglyceride und der LDL-Spiegel zeigen. Aber die HDL-Spiegel blieben unverändert [114].

Eine einjährige mediterrane Diät, unter anderem mit erhöhtem Anteil an Obst, Gemüse, Nüssen und Olivenöl, hat die PON1-Aktivität, HDL und den Cholesterin-Rücktransport zur Leber erhöht [115].

Klempel et al. konnten in ihrer Untersuchung zeigen, dass sich durch einen Gewichtsverlust Gesamt-Cholesterin, Triglyceride und LDL verbessern [116].

2.4.3 Kalorienrestriktion und Leberenzyme

1988 hat eine Studie festgestellt, dass Hunger bei normalgewichtigen Probanden die Bildung von Transaminasen induziert [117]. Kostogryz et al. konnten 2018 keinen Unterschied in den Leberenzymen GOT und GPT bei einer Kalorienrestriktion feststellen [118]. Eine andere Studie von 2020 konnte einen Rückgang der GPT bei NAFLD nach einer 8-wöchigen Diät feststellen. Allerdings konnte kein Einfluss auf die GOT festgestellt werden [111].

Eine Studie von 2003 konnte zeigen, dass eine langfristige Kalorienrestriktion bei alten Mäusen keinen Effekt auf GOT und GPT hat. Bei den alten Mäusen waren die Transaminasen im Vergleich zu den jungen signifikant erhöht. Sie konnten aber auch zeigen, dass bei jungen Mäusen die Kalorienrestriktion im Vergleich zu einer Standarddiät die Transaminasen signifikant erhöht hat [119].

2.5 Übergewicht durch hoch-fetthaltige Diät im Mausmodell

Mausmodelle sind eine gute Methode zur Erforschung des Metabolischen Syndroms. C57BL/6J-Mäuse sind für die meisten Labore kostengünstig und leicht erhältlich [120]. Wie der Mensch sind sie omnivor und daher gut geeignet, um den Nährstoffmetabolismus zu untersuchen [121]. In einer Studie, die neun Inzuchtmausstämme zusammenfasste, wurde gezeigt, dass C57BL/6J-Mäuse zusammen mit anderen Mausstämmen nach siebenwöchiger

Aufnahme von hochkalorischem Futter eine diätetische Adipositas entwickeln [122]. Die C57BL/6J-Mäuse sind bekannt dafür, durch hochkalorische Diät zuverlässig an Gewicht zuzunehmen und dabei auch Symptome des Metabolischen Syndroms zu entwickeln [120, 123]. Strissel et al. haben gezeigt, dass C57BL/6J-Mäuse schnell an Gewicht zunehmen und eine Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten auftritt. Auch eine Entzündung im Fettgewebe ist aufgetreten [124].

Es sind viele verschiedene Protokolle für eine High-Fat-Diet (HFD) -induzierte Adipositas zu finden, der Hauptunterschied liegt in der Länge der Diät [125]. Um eine Nähe zur eigentlichen westlichen Ernährung zu erzeugen, ist es wichtig, dass das Futter einen erhöhten Anteil an Fetten und Kohlenhydraten hat [125]. Vor allem langkettige ungesättigte Fettsäuren verursachen Fettleibigkeit [126].

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich ein akutes Fasten auf die Gefäßfunktion auswirkt, mit einem Schwerpunkt auf der PVAT-Funktion.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller	Verwendung
Millipore Wasser	H ₂ O	Synergy Ultrapure Typ1	Myographie, SDS-Page, Western Blot
Natriumchlorid	NaCl	3957, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Myographie
Kaliumchlorid	KCl	6781, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Myographie
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ 2•H ₂ O	2382, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Myographie
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	6329, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Myographie
Glukose Monohydrat	Glucose•H ₂ O	6780.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Myographie
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO ₄ 7•H ₂ O	5886, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Myographie
Dinatriummethylen- diamintetraessigsäure Dihydrat	NA ₂ EDTA•2H ₂ O	A3553, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Myographie
Kaliumdihydrogen- phosphat	KH ₂ PO ₄	3904, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Myographie
Acetylcholin	ACh	1661, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Myographie

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller	Verwendung
N ^ε -nitro-L-arginine-methyl-ester	L-Name	2149, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Myographie
L-(-)-Noradrenalin(+)-bitatrat-monohydrat	Noradrenalin	A9512, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Myographie
Ethanol, vergällt 99,8%	Ethanol	0911, Roth, Karlsruhe, Deutschland	Reinigung
Forene [®] 100% (V/V)	Forene	B506 Abbvie, Ludwigshafen, Deutschland	Versuchstier-anästhesie
Carbogen-Gas	Carbogen	Linde Gas & More, Ginsheim-Gustavsburg, Deutschland	Myographie
Natriumchloridlösung 0,9%	NaCl-Lösung	Braun, Melsungen, Deutschland	Serumanalysen
Tris	Tris	4855, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	SDS-Page, Western Blot
Natriumdodecylsulfat	SDS	2326, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	SDS Page
TEMED	TEMED	A1148, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	SDS-Page
Ammonium-Persulfat	APS	A2941, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	SDS-Page
Acrylamide 4K Solution ³⁷ 5:1	Acrylamid	A1672, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	SDS-Page
Glycerol	Glycerol	A1123, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	SDS-Page
Beta-Mercaptoethanol	Mercaptoethanol	A1108, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	SDS-Page

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller	Verwendung
Bromphenolblau	Bromphenolblau	A5122, Roth, Karlsruhe, Deutschland	SDS-Page
Glycin	Glycerol	A1067, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Western Blot
Methanol	Methanol	32213, Honeywell, International Inc. Morristown, USA	Western Blot
Ponceau S	Ponceau S	5938, Roth, Karlsruhe, Deutschland	Western Blot
Essigsäure	Essigsäure	8.18755, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Western Blot
Salzsäure	HCl	1.09911, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Western Blot
Tween 20	Tween 20	9127, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Western Blot
PageRuler™	Referenz-Protein- Leiter	Thermo Scientific, Waltham, USA	SDS-Page
Kodak® GBX- Entwicklerlösung	Entwicklerlösung	5158621, Kodak, Rochester, USA	Western Blot
Kodak® GBX- Fixierlösung	Fixierlösung	5158639, Kodak, Rochester, USA	Western Blot
Triton X	Triton X	A1388, AppliChem, Darmstadt, Deutschland	SDS-Page
Proteinase-Phosphatase- Inhibitor	Proteinase- Phosphatase- Inhibitor	78442, Thermo Scientific, Waltham, USA	SDS-Page
Kupfersulfat	CuSO ₄	B9643, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	BCA - Assay
BCA-Lösung	BCA-Lösung	C2284, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	BCA - Assay

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer und angesetzte Lösungen	Zusammensetzung	Volumen / Masse	Verwendung
Krebspuffer (1 Liter)	118,0mM NaCl	13,762 g	Myographie
	4,8mM KCl	0,7158 g	
	2,5mM CaCl ₂ 2•H ₂ O	0,7351 g	
	25mM NaHCO ₃	4,2004 g	
	11,1mM Glucose•H ₂ O	2,1800 g	
	1,2mM MgSO ₄ 7•H ₂ O	0,5916 g	
	Millipore Wasser	1000 ml	
	0,026mM NA ₂ EDTA•2H ₂ O	0,0112 g	
	1,2mM KH ₂ PO ₄	0,3266 g	
Trenngel	1,5M Tris-HCl pH 8,8	5000 µl	SDS-Page
	Millipore Wasser	6600 µl	
	10% SDS	200 µl	
	TEMED	8 µl	
	APS	200 µl	
	Acrylamid 5:1	8000 µl	
Sammelgel	1,0M Tris-HCl pH 6,8	1000 µl	SDS-Page
	Millipore Wasser	5500 µl	
	10% SDS	80 µl	
	TEMED	8 µl	
	APS	20 µl	
	Acrylamid 5:1	1300 µl	
Laemmli Puffer	0,125M Tris-HCl pH 6,8		SDS-Page
	2% SDS		
	20% Glycerol		
	10% 2-Mercaptoethanol		
	0,03% Bromphenolblau		
Blotting Puffer (1 Liter)	25mM Tris-HCl pH 8,8	3,03 g	Western Blot
	192mM Glycin	14,4 g	
	0,1% SDS	1,0 g	

Puffer und angesetzte Lösungen	Zusammensetzung	Volumen / Masse	Verwendung
	20% Methanol	200 ml	
	Millipore Wasser	800 ml	
Ponceau S (100 ml)	Ponceau S	0,5 g	Western Blot
	Essigsäure	1 ml	
	Millipore Wasser	99 ml	
TBS (1 Liter)	Tris Base	6,1 g	Western Blot
	NaCl	9,0 g	
	HCl bis pH 7,6		
TBS-T	50mM/l Tris		Western Blot
	150mM/l NaCl		
	0,1% Tween 20		
	HCl bis pH 7,6		
Lyse Puffer (1 ml)	TBS-Puffer	200 µl	SDS-Page
	10% Triton X	100 µl	
	Proteinase-Phosphatase-Inhibitor	10 µl	
	Millipore Wasser	690 µl	

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen gegen Akt-pan	4691, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:1000
Kaninchen gegen p-eNOS Ser ¹¹⁷⁷	9571, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:1000
Maus gegen eNOS	610297, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	1:2000
Kaninchen gegen p-Akt Ser ⁴⁷³	4060, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:2000

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Maus gegen β -Tubulin	T8328, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1:5000
Kaninchen gegen p-eNOS Thr ⁴⁹⁵	9574, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:1000
Kaninchen gegen p-Akt Thr ³⁰⁸	2965, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:1000

3.1.4 Materialien und Geräte

Tabelle 4: Materialien und Geräte

Name	Hersteller	Verwendung
Eppendorfgefäß	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	
Kanülen Stericen [®] 23G x 1/2	Braun, Melsungen, Deutschland	
Spritzen Injekt [®] -F 1ml	Braun, Melsungen, Deutschland	
Pipetten 10 μ l, 200 μ l, 1ml, 5ml, 10ml, 20ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	
Mikroschere	15012-12, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland	Myographie
Mikropinzette	11254-20, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland	Myographie
Binokular Mikroskop Leica DM IL LED	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	Myographie
Waage Explorer [®] Pro	Ohaus, Greifensee, Deutschland	
Waage Adventure [®] Pro	Ohaus, Greifensee, Deutschland	
Wasserbad	VWB6, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	Myographie
Wire Myograph System	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark	Myographie

Name	Hersteller	Verwendung
Zentrifuge Serum	Biofuge, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland	Serumanalysen
Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	SDS Page
Reflotron® Plus	Roche, Mannheim, Deutschland	Serumanalysen
Teststreifen Reflotron® Plus Cholesterin		
Teststreifen Reflotron® Plus Triglyceride		
Teststreifen Reflotron® Plus HDL		
Teststreifen Reflotron® Plus GOT		
Teststreifen Reflotron® Plus GPT		
Teststreifen Reflotron® Plus alkalische Phosphatase		
Abstandsplatte	165-3312, Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuberg, Deutschland	SDS-Page
Kunststoffscheibe	165-3308, Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuberg, Deutschland	SDS-Page
Rahmen	165-3304, Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuberg, Deutschland	SDS-Page
Gießständer	165-3303, Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuberg, Deutschland	SDS-Page
Spannungsggerät	164-5050, Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuberg, Deutschland	SDS-Page
Blotting-Membran	10600006, GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich	Western Blot
Blotting-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Neuberg, Deutschland	Western Blot

Name	Hersteller	Verwendung
Western Lightning® Plus ECL enhanced chemiluminescence substrate	NEL105001EA, Perkin Elmer Inc., Waltham, USA	Western Blot
Amersham Hyperfilm ECL	8906837, GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich	Western Blot
Rinderserumalbumin (BSA)	K41-001, PAA Laboratories, Colbe, Deutschland	BCA - Assay

3.1.5 Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Name	Hersteller	Verwendung
Lab Chart	AD Instruments GmbH, Spechbach, Deutschland	Myographie
Lab Chart Reader	AD Instruments GmbH, Spechbach, Deutschland	Myographie
Graph Pad Prism 7 für Windows	Graph Pad Software, LA Jolla, USA	Statistische Auswertung, Erstellen der Graphen
MagellanTM – Datenanalyse Software	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz	BCA - Assay
ImageJ in Browser	National Institutes of Health, USA	Auswertung Western Blot
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Auswertung
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Schreibsoftware
Microsoft Power Point	Microsoft, Corporation, Redmond, USA	Erstellen von Abbildungen

3.1.6 Futter

Tabelle 6: Futter

Name	Abkürzung	Hersteller	Zusammensetzung	Energiegehalt	
ssniff® M- Z Extrudat	NCD	V1126, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland	Kohlenhydrat Fett Protein	53% 11% 36%	13,9kJ/g
ssniff® DIO – 45% fat	HFD	E15744-34, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland	Kohlenhydrat Fett Protein	35% 45% 20%	19,3kJ/g

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

Um die Fragestellung zu beantworten wurden 120 C57BL/6J-Mäuse (B6-Mäuse) der Firma Janvier Labs, Genest-Saint-Isle, Frankreich untersucht. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten. Jeder Käfig war mit Sägespänen als Einstreu, einer Plastikröhre und einem Zellstofftuch ausgestattet. Im Tierstall herrschte ein Rhythmus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit. Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden konstant gehalten. Einmal wöchentlich wurden die Mäuse in frische Käfige mit derselben Ausstattung umgesetzt.

Alle Tierversuche waren durch die aufsichtsführende Behörde (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (23 177-07/G 17-1-020)) genehmigt. Des Weiteren wurden alle Versuche und auch die Euthanasie der Versuchstiere im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.2.2 Diät

Die Mäuse wurden im Alter von sechs Wochen in Gruppen von vier Mäusen pro Käfig geliefert, und zunächst für die Dauer von drei Tagen an den neuen Tierstall gewöhnt. Danach wurden sie in zwei Gruppen randomisiert. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden die Tiere anschließend einzeln in Käfige gesetzt und bekamen in der Kontrollgruppe Normal Control Diet (NCD) ein Standardfutter der Marke ssniff® (s. Tabelle 6) angeboten. Die zweite Gruppe (HFD) bekam ein Fettfutter, ebenfalls der Marke ssniff® (s. Tabelle 6), angeboten. Beide Gruppen bekamen das Wasser wie auch das Futter ad libitum angeboten.

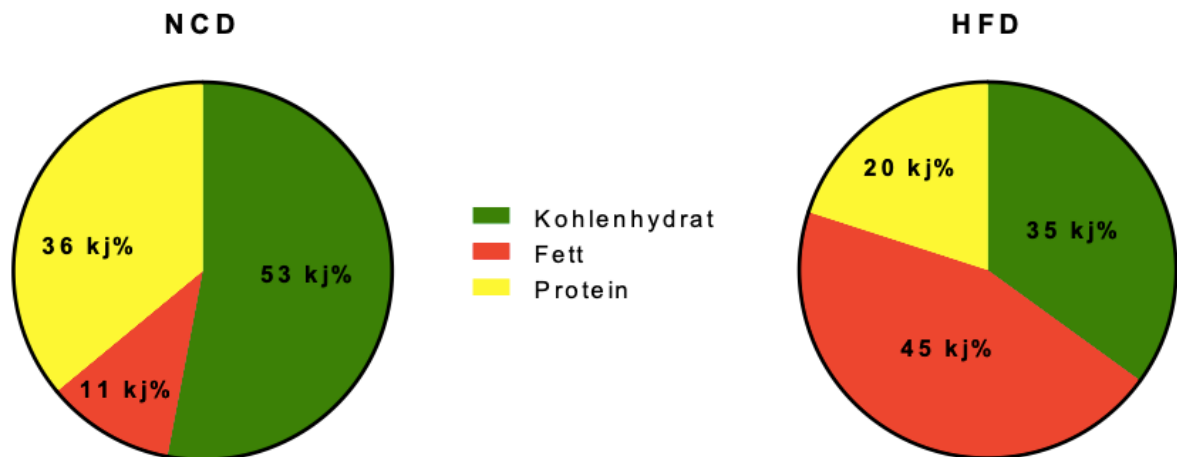


Abbildung 3 Futterzusammensetzung.

Mäuse und Futter wurden zweimal wöchentlich mit einer Waage gewogen. Auch das Wasser wurde zweimal wöchentlich mit einem Messzylinder gemessen.

Aufgrund der Gitterabstände des Futterkorbes und der Größe der Futterpellets können Teile des Futters in den Käfig gefallen sein, die dann beim Wiegen des Futters nicht berücksichtigt wurden. Die verwendeten Wasserflaschen waren vor allem während des Transports und des Handlings der Käfige nicht hundertprozentig dicht. Deshalb ist eventuell eine geringe Menge Wasser verloren gegangen, das nicht von den Mäusen aufgenommen wurde.

Aus diesen Gründen wird von einem Futter- und Wasserverbrauch gesprochen und nicht von der Futter- und Wasseraufnahme.

Die Mäuse wurden insgesamt für 18 Wochen mit NCD bzw. HFD gefüttert. 16 Stunden vor der Euthanasie wurden die zwei Gruppen nochmals in jeweils zwei Untergruppen randomisiert, von diesen bekam jeweils eine Untergruppe ihr Futter ad libitum angeboten und der jeweils anderen Untergruppe wurde das Futter abgenommen. Um das Problem des in den Käfig gefallenen Futters zu umgehen, wurden zu dem Zeitpunkt alle Mäuse in einen frischen Käfig gesetzt. Wasser bekamen die vier Gruppen weiterhin zur freien Verfügung.

Tabelle 7: Randomisierung

Gruppe	Nüchtern	16 Stunden nüchtern
NCD	Ohne Nüchtern	-
	Mit Nüchtern	+
HFD	Ohne Nüchtern	-
	Mit Nüchtern	+

3.2.3 Gewebeentnahme

Nach den 16 Stunden wurden je Versuch 4 Mäuse (eine pro Gruppe) mit Isofluran anästhesiert und anschließend gewogen. Nachdem Reflexverlust der Mäuse wurden Abdomen und Thorax mit einer Schere eröffnet. Aus dem Herz wurde mit einer Spritze Blut entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Entfernung des Herzens wurde entlang des Diaphragmas und der Wirbelsäule die thorakale Aorta inklusive PVAT herauspräpariert und in eisgekühlten Krebspuffer überführt, um direkt für das Organbad-Experiment vorbereitet zu werden. Leber und epididymales Fettgewebe wurden ebenfalls entnommen, gewogen und in Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet.

Das entnommene Blut wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und dann bei 12000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und als Serum bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Von der thorakalen Aorta wurden mit feinchirurgischer Schere und Pinzette zwei ca. 2 mm breite Ringe unter dem Mikroskop abgeschnitten. Ein Ring wurde mit PVAT belassen, bei dem anderen wurde unter dem Mikroskop bei 0,65 – 4,5-facher Vergrößerung das PVAT abpräpariert. Dabei wurde besonders auf die Schonung der Adventitia geachtet. Beide Ringe wurden für das Organbad verwendet und unter dem Mikroskop in den Myographen eingespannt. Die restliche Aorta wurde ebenfalls vom PVAT befreit, um genau wie das gewonnene PVAT in separaten Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet zu werden.



Abbildung 4 Aortenring ohne PVAT.



Abbildung 5 Aortenring mit PVAT.

3.2.4 Myographie im Organbad

Der komplette Versuch wurde mit dem Wire Myograph System und der dazu passenden Software Lab Chart (Tabelle 4 und 5) kontinuierlich überwacht. Die Aortenringe wurden auf zwei Drähte aufgefädelt, die sich in einem Becken befanden, welches mit Krebspuffer befüllt war. Der Puffer wurde konstant mit Carbogen begast, einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff (O_2) und 5% Kohlenstoffdioxid (CO_2). Der Puffer in jedem Becken wurde auf $37^\circ C$ geheizt und konnte jederzeit bei Bedarf abgesaugt werden.

Das System misst die Kraft in Newton, die die Aortenringe auf die zwei Drähte ausüben. Einen der beiden Drähte kann man über eine Stellschraube näher an den zweiten Draht heranführen oder auch entfernen. Die resultierende Kraft wird von dem Myograph gemessen und in Lab Chart als Funktion der Zeit aufgezeichnet.

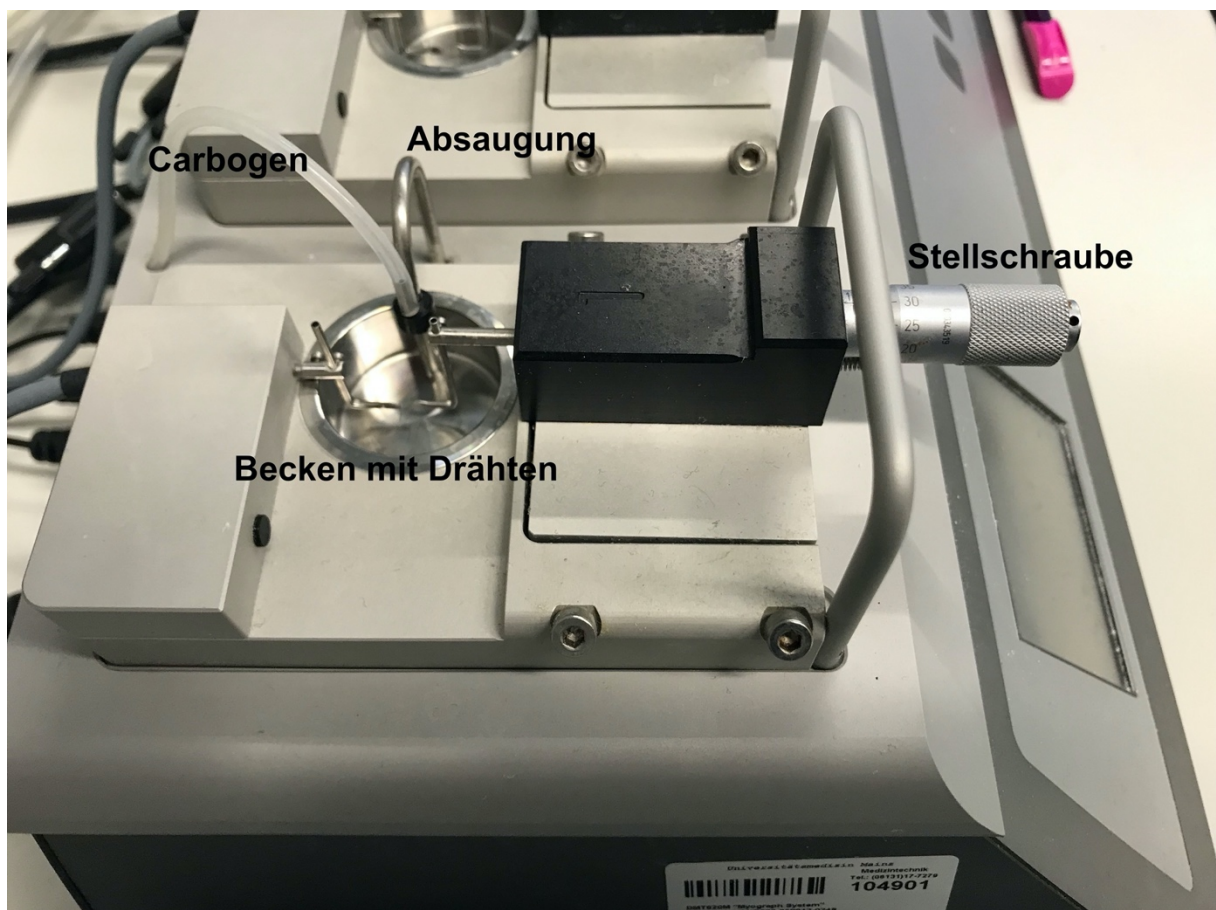


Abbildung 6 Aufbau Myograph.

Von jeder Maus wurden zwei Aortenringe gemessen, einer mit PVAT und einer ohne. Pro Versuch wurden 4 Mausearten gemessen, also acht Becken mit je einem Aortenring bestückt. Die Aortenringe wurden spannungsfrei auf die Drähte aufgefädelt und am Myographen wurde die Kraft als Null definiert.

Damit die Aorten alle dieselbe Vorspannung erhielten wurde alle fünf Minuten über die Stellschraube die Spannung um 0,5 N erhöht bis eine Kraft von 5,5 N erreicht war. Im Anschluss wurde der Puffer gewechselt und die Aorten wurden eine Stunde zur Gewöhnung ruhen gelassen. Nach der Stunde wurde die Kraft wieder als null definiert. In jedes Becken wurden 600 µl 2M Kaliumchlorid (KCl) pipettiert, die Spannung nach fünf Minuten gemessen und anschließend jedes Becken dreimal mit Krebspuffer gespült. Die Spannung bei der dritten Gabe von KCl wurde als jeweilige Maximalspannung des Aortenrings definiert. Nach der dritten KCl-Gabe wurden die Aortenringe wieder 20 Minuten ruhen gelassen und erneut die Kraft gleich Null gesetzt.

Für die erste Dosis-Wirkungskurve wurden die Aortenringe mit Noradrenalin (NA) in halblogarithmischen Schritten von 10^{-9} bis maximal 3×10^{-6} mol/l auf 80% der Maximalspannung von der dritten KCl-Gabe gebracht, um im Anschluss mit Acetylcholin, wieder in halblogarithmischen Schritten von 10^{-9} bis 3×10^{-6} mol/l, relaxiert zu werden.

Nach der 1. Dosis Wirkungskurve wurden die Becken erneut dreimal mit Krebspuffer gespült und für 20 Minuten in Ruhe gelassen. Danach wurde für die 2. Dosiswirkungskurve die Kraft wieder gleich Null gesetzt.

Die zweite Dosis-Wirkungs-Kurve wurde mit dem eNOS Inhibitor L-Name angefertigt. Von diesem wurden mit einer Endkonzentration von 500 mM zu jedem Aortenring hinzugegeben und 20 Minuten wirken lassen. Danach wurde die zweite Dosis-Wirkungskurve analog zur ersten Dosis-Wirkungs-Kurve durchgeführt.

Zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde die Relaxation in Prozent gegen die zugegebene Konzentration von Acetylcholin in Mol pro Liter aufgetragen.

3.2.5 Serumanalyse

Das bei der Sektion der Mäuse gewonnene Serum wurde aufgetaut und bei Raumtemperatur mit Teststreifen und Reflotron Plus der Firma Roche (Tabelle 5) gemessen. Dazu wurden

jeweils 32 µl Serum auf die jeweiligen Teststreifen aufgetragen. Wenn der Messwert außerhalb des Messbereichs lag, wurde das Serum mit NaCl 0,9% verdünnt. Alle 100 Messungen musste das Gerät gereinigt werden, dazu wurden entsprechende Reinigungstreifen benutzt, die gleichzeitig Referenzwerte bestimmt haben.

LDL wurde mittels der Friedewald-Formel berechnet:

$$\text{LDL} = \text{Gesamt-Cholesterin} - \text{HDL} - (\text{Triglyceride} / 5)$$

Tabelle 8: Verdünnung Serumanalysen

Serumlipide / Serumenzyme	Verdünnung
Gesamt-Cholesterin	Unverdünnt
Triglyceride	Unverdünnt
HDL	1:2
GPT	1:4
GOT	1:4
ALP	Unverdünnt

3.2.6 Protein-Isolation

Das schockgefrostete PVAT wurde mit Mörser und Stößel unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerstoßen und in ein Eppendorfgesäß mit 150 µl Lysepuffer (Tabelle 2) überführt. Unter ständigem Schütteln wurde die Probe 5 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss für 10 Minuten bei 12000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt und bei -80°C gelagert.

Die Aufarbeitung des PVAT wurde von Gisela Reifenberg durchgeführt.

3.2.7 BCA-Assay

Mit dem BCA-Assay wurde die absolute Proteinkonzentration einer Probe bestimmt. Dazu wurden 5 µl der Probe mit 45 µl Millipore Wasser vermischt und 196 µl BCA Lösung mit 4 µl Kupfersulfat dazugegeben.

Um eine Standardkurve anzufertigen, wurde eine Verdünnungsreihe wie in Tabelle 9 angelegt.

Tabelle 9 Standardkurve BCA-Assay

BSA (1mg/ml) in µl	0	1	2	5	10	20	30	40	50
Millipore Wasser in µl	50	49	48	45	40	30	20	10	0

Eine 96-Wellplatte wurde für 30 Minuten bei 37°C mit den Proben inkubiert. Anschließend wurde bei den einzelnen Proben die Absorption bei 560 nm Wellenlänge mit einem Spektrophotometer gemessen und mit der MagellanTM – Datenanalysesoftware analysiert.

Der BCA-Assay wurde von Gisela Reifenberg durchgeführt.

3.2.8 SDS-Page

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurden die Proteine nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt. Wie in Tabelle 2 beschrieben wurden Trenn- und Sammelgel sowie der Laemmlipuffer angesetzt. Das Trenngel wurde zwischen eine 1,5 mm Abstandsplatte und eine kürzere Kunststoffscheibe gegossen, die mit einem Rahmen und einem Fixierständer eine entsprechende Kammer formen. Damit eine gleichmäßige Oberfläche geschaffen werden konnte, wurden 2 µl Millipore Wasser auf das Trenngel pipettiert. Nach 25 Minuten war das Gel fertig polymerisiert.

Nach der Polymerisation wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel (Tabelle 2) auf das Trenngel geschichtet. Um entsprechende Kammern für die Proben zu schaffen, wurde ein Kamm in das Gel gelegt, bevor auch das Stapelgel polymerisierte.

Die PVAT-Proben wurden auf identische Proteinkonzentrationen verdünnt und jeweils 8 µl mit dem Laemmlipuffer vermischt und auf 95°C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen

aufzubrechen. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Probenansätze zusammen mit der Referenz Protein Leiter (PageRuler, Tabelle 1) in die jeweilige Gelkammer gefüllt.

Die ersten 10 Minuten wurde eine Spannung von 80 mV angelegt, die danach auf 130 mV erhöht wurde. Die Spannung blieb angelegt, bis die Lauffront das Ende der Glasscheibe erreicht hatte.

Die SDS-PAGE wurde von Gisela Reifenberg durchgeführt.

3.2.9 *Western Blot*

Um die Banden aus dem Gel auf eine Membran zu übertragen, wurde ein Stapel aus einem Kunststoffgitter, zwei Schwämmen und drei Lagen Blottingpapier in Blottingpuffer gebaut. Auf diesen Stapel wurde das Gel aus der Laufkammer und darauf die Membran gelegt. Dabei lag ein besonderer Fokus darauf, dass keine Luft zwischen die einzelnen Schichten gelangt war. Um etwaige Luftblasen zu entfernen, wurde mit einem Glasstab über die Membran gerollt. Darauf wurde anschließend wieder ein Stapel aus Blottingpapier, 2 Schwämmen und einem Kunststoffgitter platziert.

Der ganze Stapel wurde in die Blottingkammer gelegt, wobei das Gel der Kathode und die Membran der Anode zugewandt war. Bei 4°C und einer angelegten Spannung von 35-45 mV bei 90 mA Stromstärke lief der Transfer der Banden auf die Membran über Nacht.

Am nächsten Tag wurden Gitter, Schwämme, Papier und Gel entfernt und nur die Membran wurde weiterbehandelt.

Um das Übertragen der Banden zu kontrollieren, wurde die Membran mit Ponceau S (Tabelle 2) angefärbt. Das Ponceau S wurde grob mit Millipore Wasser abgewaschen und anschließend mit TBS Puffer (Tabelle 2) für 2 Minuten entfernt.

Um das unspezifische Binden von Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran durch Schütteln in 5%igem Milch/TBS-T Puffer (Tabelle 2) blockiert. Nach einer Stunde wurde dreimal mit TBS-T Puffer gespült und die jeweiligen Antikörper (Tabelle 6) dazugegeben. Die Antikörper wirkten über Nacht bei 4°C auf die Membran ein.

Am nächsten Morgen wurden die Antikörper entfernt und innerhalb von 30 Minuten wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Jetzt wurde die Sekundärantikörperlösung auf die Membran pipettiert. Die Sekundärantikörper (gekoppelt mit Horseradish Peroxidase) waren 1:5000 in 5%iger Milch/TBS-T Puffer verdünnt und wurden eine Stunde lang inkubiert. Es folgte erneut ein dreimaliges Waschen mit TBS-T für 30 Minuten und anschließend nochmal 10 Minuten mit TBS-Puffer.

Nach dem Trocknen der Membran wurde diese auf eine Glasscheibe gelegt und mit 4 ml der 1:1-Mischung der beiden Komponenten des Western Lightning Plus ECL enhanced chemiluminescence substrate (Tabelle 1) für einige Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und mit einer Folie abgedeckt.

In einem dunklen Entwicklungsraum wurde ein Amersham Hyperfilm ECL (Tabelle 4) so lange mit der Membran belichtet, bis klare Banden zu sehen waren, die sich nicht überlappten.

Der Film wurde in Kodak GBX Entwicklerlösung (Tabelle 1), anschließend kurz in Wasser und letztlich in Kodak Fixierlösung (Tabelle 1) gebadet, bis der nicht belichtete Teil des Films transparent erschien.

Nachdem der Film erneut gewaschen wurde, konnte der Film an der Luft trocknen.

Die Filme wurden mit 600dpi gescannt und mit Image J für Browser (Tabelle 5) ausgewertet.

Der Western Blot wurde von Gisela Reifenberg durchgeführt.

3.2.10 Statistik

Alle Statistiken wurden mit Graphpad Prism 7 für Windows (Tabelle 5) angefertigt. Alle Daten sind mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der Student's t-Test angewendet. Um Kurven miteinander zu vergleichen, wurde erst die Fläche unter den Kurven bestimmt und diese dann mittels Student's t-Test miteinander verglichen. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ angenommen.

Das jeweilige Signifikanzniveau oberhalb der Häkchen vergleicht immer mit der Gruppe am Häkchen ganz links, beziehungsweise mit dem Häkchen ganz oben.

4 Ergebnisse

4.1 Mäuse

4.1.1 Gewicht

Ab dem Alter von 6 Wochen wurden die Mäuse für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Die Entwicklung des Körpergewichts ist in Abbildung 7 dargestellt. Nach 4 Wochen Diät zeigte sich ein Gewichtsunterschied von 2,17 g in den zwei Gruppen. Nach 18 Wochen ergab sich ein signifikanter Gewichtsunterschied von 7,67 g (Abbildung 7).

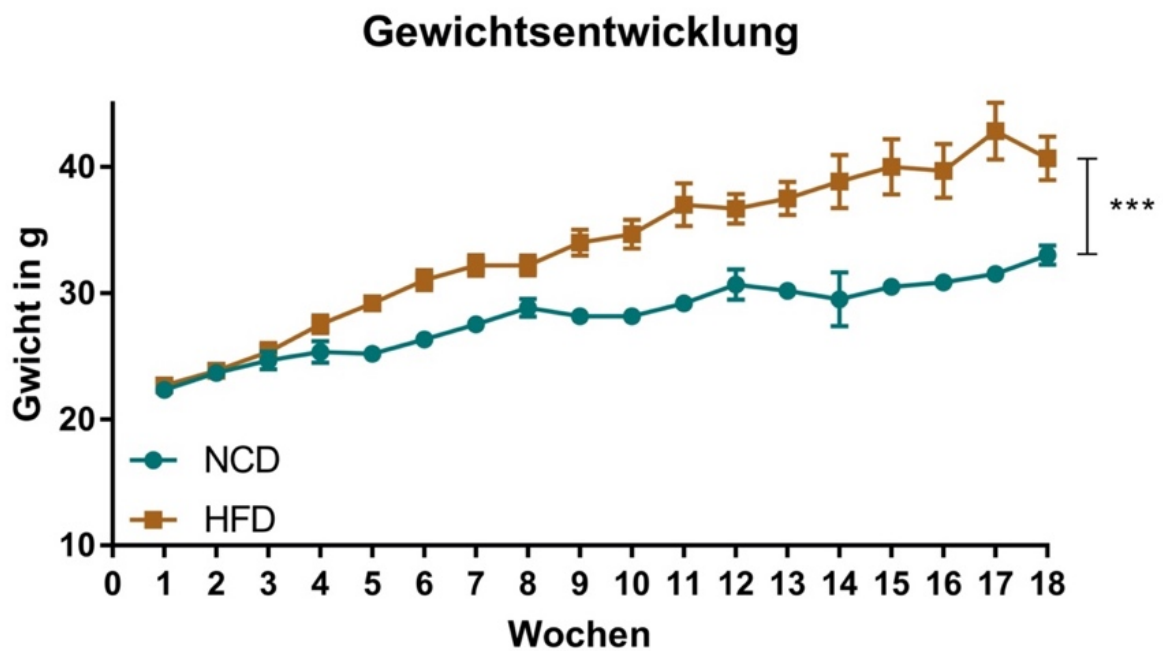


Abbildung 7 Gewichtsentwicklung.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. n = 12; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Nach der 18-wöchigen Fütterung wurden die Mäuse für 16 Stunden entweder mit oder ohne Futter gelassen. Anschließend wurden die Mäuse gewogen. Im Mittel wogen die NCD Mäuse 29,83 g \pm 0,59 g, die HFD Mäuse 40,25 g \pm 1,50 g, NCD nüchtern Mäuse 27,98 g \pm 0,93 g, und HFD nüchtern Mäuse 38,30 g \pm 2,30 g. Die HFD-Mäuse waren 10,42 g schwerer als die NCD-Mäuse. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen NFD und HFD. Die 16-stündige Nüchternheit hat keinen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht (Abbildung 8).

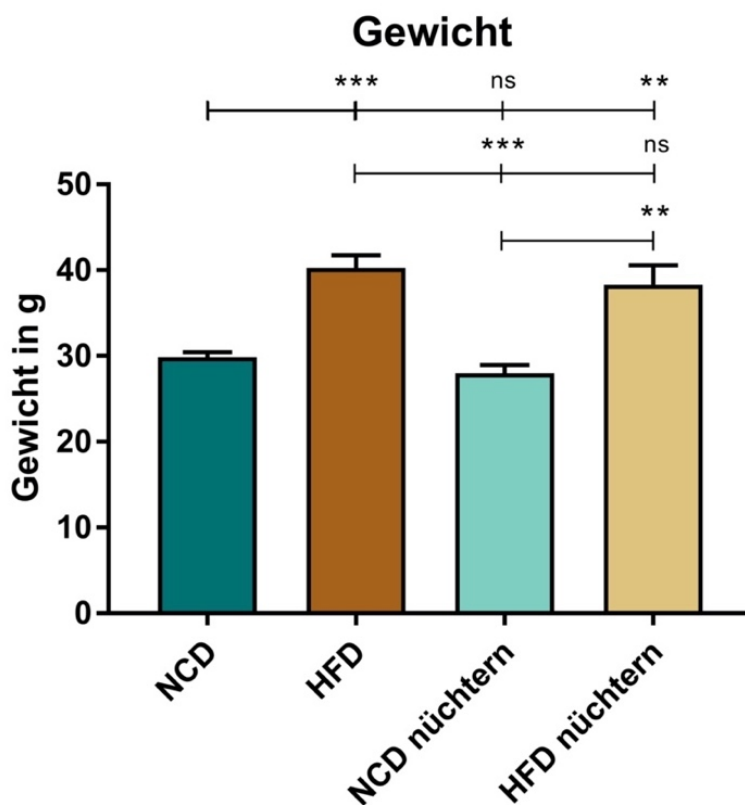


Abbildung 8 Gewicht vor der Euthanasie.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen.

n = 6; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Die NCD-Mäuse verbrauchten im Mittel $12,94 \text{ g} \pm 0,17 \text{ g}$ Futter, HFD-Mäuse $10,99 \text{ g} \pm 0,11 \text{ g}$. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit NCD gefütterte Mäuse im Mittel $1,95 \text{ g}$ mehr Futter pro Woche verbrauchten als die mit HFD gefütterten Mäuse (Abbildung 9).

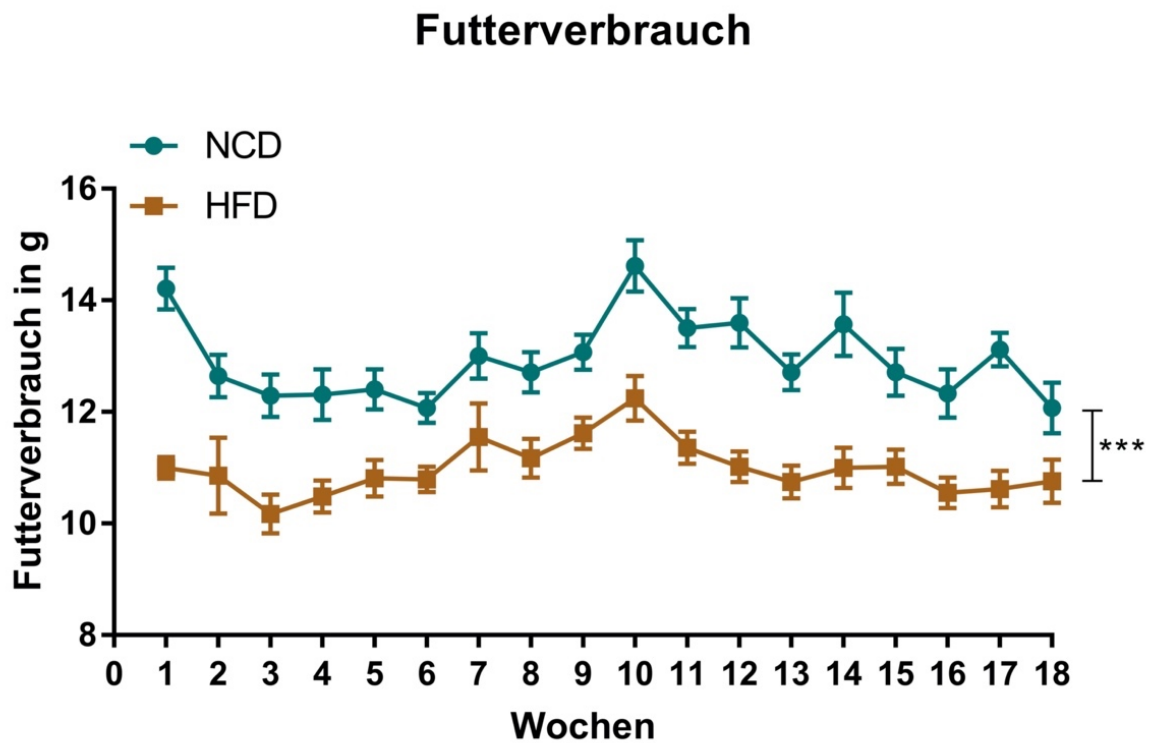


Abbildung 9 Futtermverbrauch.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. $n = 12$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Bei Betrachtung der Kalorienzufuhr fällt auf, dass mit HFD gefütterte Mäuse trotz des in Abbildung 10 gezeigten geringeren Futterverbrauchs, 18,8 kJ mehr Energie pro Maus pro Woche zu sich nahmen als die Mäuse der NCD-Gruppe (Abbildung 6).

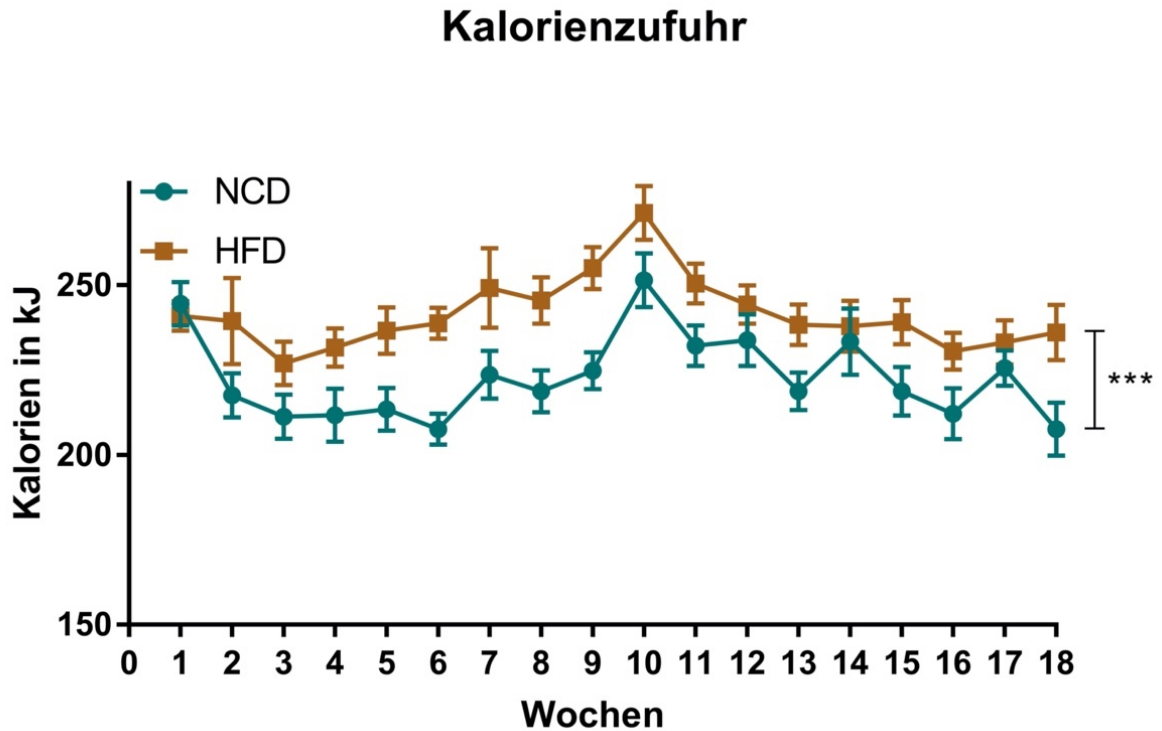


Abbildung 10 Kalorienzufuhr.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter.

n = 12; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert von Kalorienzufuhr pro Maus pro Woche mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.1.2 Wasserverbrauch

In der Fütterungszeit von 18 Wochen verbrauchten die NCD-Mäuse mehr Wasser als die HFD-Mäuse (Abbildung 11). Im Durchschnitt verbrauchte eine NCD-Maus $32,51 \text{ ml} \pm 0,38 \text{ ml}$ Trinkwasser in einer Woche, und eine HFD-Maus $24,67 \text{ ml} \pm 0,25 \text{ ml}$. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied in dem Wasserverbrauch der zwei Gruppen. Die HFD-Mäuse verbrauchten durchschnittlich jede Woche $7,84 \text{ ml}$ Wasser weniger als die NCD-Gruppe (Abbildung 12).

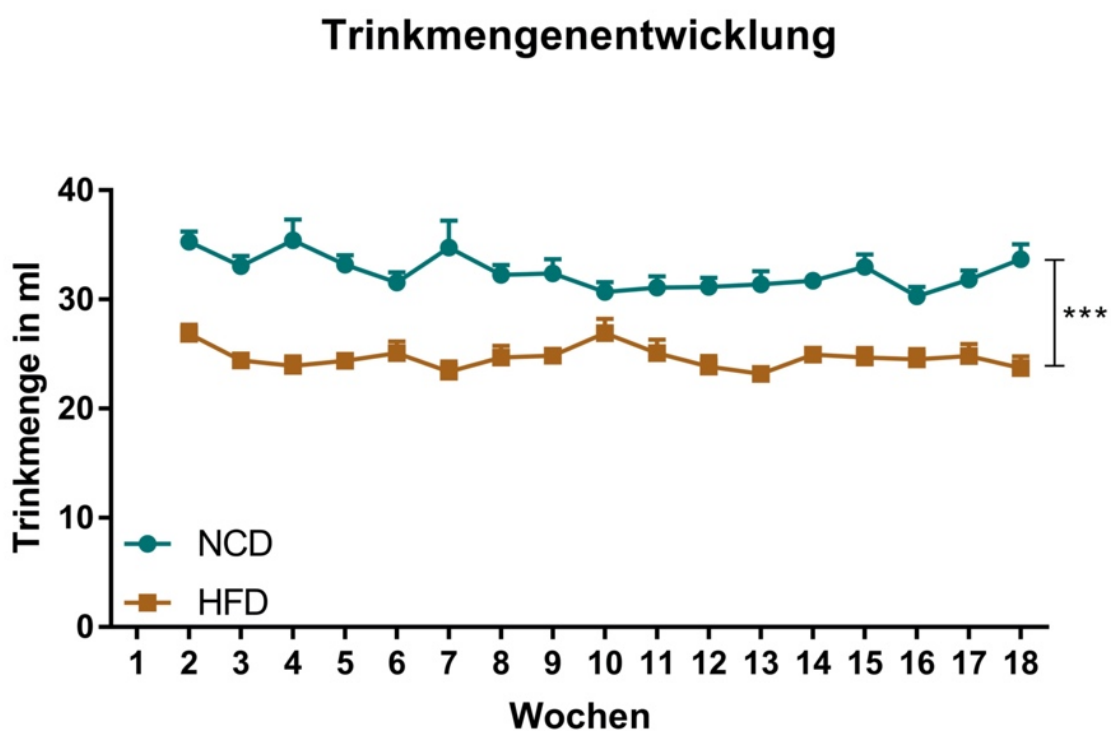


Abbildung 11 Trinkmengenentwicklung.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. Dargestellt wird der durchschnittliche Wasserverbrauch pro Maus pro Woche über die gesamte Diätdauer von 18 Wochen. $n = 12$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

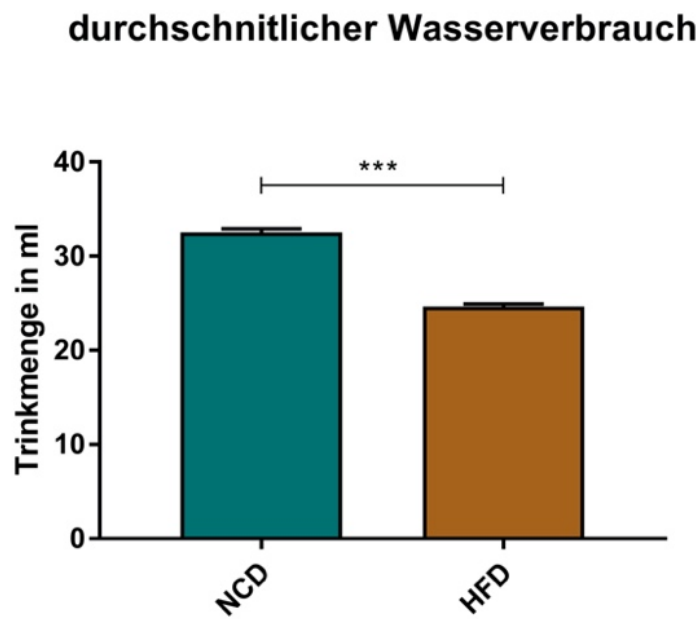


Abbildung 12 durchschnittlicher Wasserverbrauch.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. Dargestellt wird der durchschnittliche Wasserverbrauch pro Maus pro Woche.
n = 12; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.1.3 Gewicht Lebermittellappen

Abbildung 13 zeigt das Gewicht der Lebermittellappen, nachdem die Versuchstiere euthanasiert wurden.

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den NCD- und HFD-Gruppen. Auch zwischen NCD und NCD-nüchtern gibt es einen signifikanten Unterschied, aber zwischen NCD-nüchtern und HFD-nüchtern zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

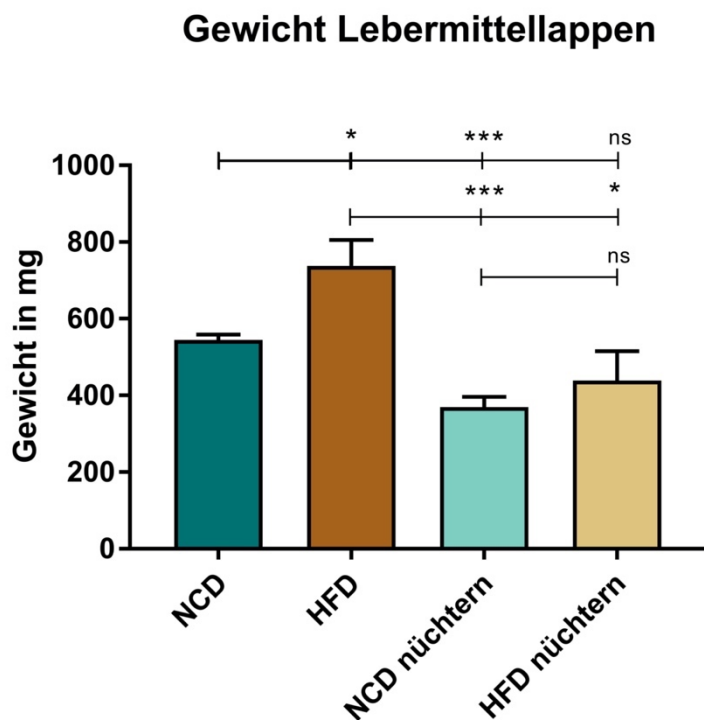


Abbildung 13 Gewicht Lebermittellappen.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen.

n = 6; * = p < 0,05; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.2 Organbad

4.2.1 *Aorta mit PVAT*

Nach der Fütterungszeit von 18 Wochen (mit NCD bzw. HFD) wurde die Hälfte der Mäuse für 16 Stunden lang das Futter entzogen. Die Aorten wurden zur Untersuchung der Gefäßfunktion im Myograph entnommen. Die Ergebnisse der Aortenringe mit PVAT sind in Abbildung 14 gezeigt.

Bei den Tieren ohne Nüchtern zeigen die Aortenringe der NCD-Mäuse eine konzentrationsabhängige Relaxation auf Acetylcholin (Abbildung 14A). Im Vergleich dazu war die Acetylcholin-induzierte Relaxation der HFD-Mäuse deutlich vermindert (Abbildung 14A), was auf eine Gefäßdysfunktion hindeutet. Interessanterweise wurde die Relaxationsfähigkeit der Aortenringe durch das Nüchtern der HFD-Tiere so stark verbessert, dass sie das Niveau der NCD-Mäuse erreichte (Abbildung 14B & C). In Anwesenheit von dem NOS-Inhibitor L-Name induzierte Acetylcholin keine Vasodilatation (Abbildung 14D).

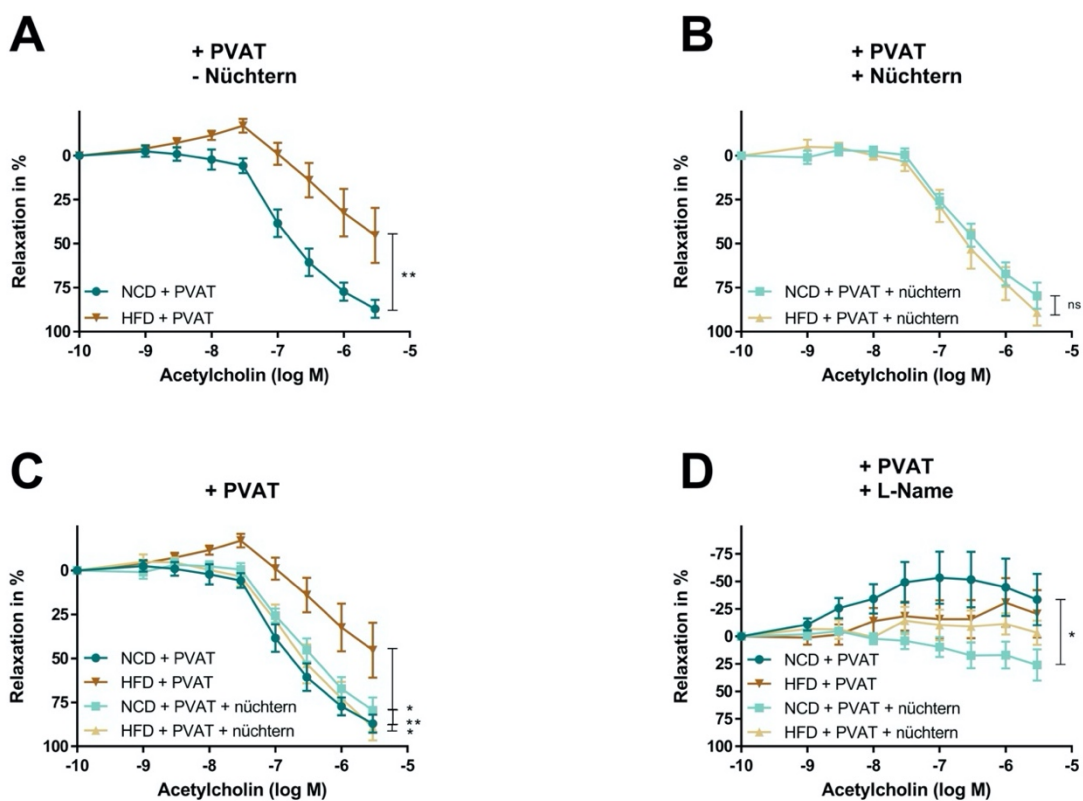


Abbildung 14 Gefäßfunktion der Aortenringe mit PVAT.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen. A: Dargestellt wird die Relaxationsfähigkeit der Aorta mit PVAT und ohne Nüchternheit; B: Dargestellt wird die Relaxationsfähigkeit der Aorta mit PVAT und mit Nüchternheit; C: Alle 4 Gruppen mit PVAT mit und ohne Nüchternheit; D: Alle 4 Gruppen mit PVAT mit und ohne Nüchternheit und mit L-NAME; n = 6; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.2.2 Aorta ohne PVAT

Nach der Fütterungszeit von 18 Wochen (mit NCD bzw. HFD) wurde einer Hälfte der Mäuse für 16 Stunden lang das Futter entzogen. Die Aorten wurde zur Untersuchung der Gefäßfunktion im Myograph entnommen. Einer Hälfte jeder Gruppe der Aortenringe wurde das PVAT unter dem Mikroskop entfernt. Die Ergebnisse der Aortenringe ohne PVAT sind in Abbildung 15 gezeigt. Abbildung 15A, 15B, 15C zeigen bei den Aorten ohne PVAT keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. In Abbildung 15D ist erkennbar, dass die Aorten trotz Anwesenheit von L-Name deutlich unter Zugabe von Acetylcholin relaxieren.

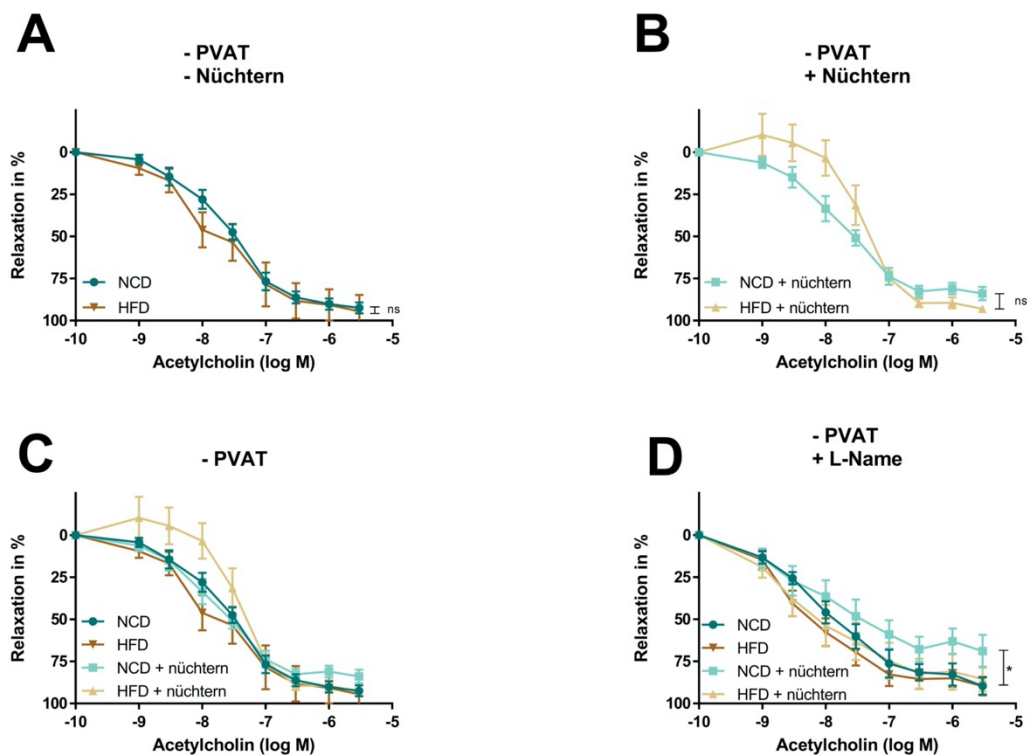


Abbildung 15 Gefäßfunktion der Aortenringe ohne PVAT.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen. A: Dargestellt wird die Relaxationsfähigkeit der Aorta ohne PVAT und ohne Nüchternheit; B: Dargestellt wird die Relaxationsfähigkeit der Aorta ohne PVAT und mit Nüchternheit; C: Alle 4 Gruppen ohne PVAT mit und ohne Nüchternheit; D: Alle 4 Gruppen ohne PVAT mit und ohne Nüchternheit und mit L-NAME; n = 6; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.3 Western Blot

4.3.1 Phosphorylierung von eNOS im PVAT

Aus den Mausearten wurden PVAT-Proben präpariert und für die Western-Blot-Analyse Proteine isoliert. Die Ergebnisse der eNOS-Phosphorylierung sind in Abbildung 16 dargestellt. Die HFD-Fütterung für 18 Wochen führte zu einer Verminderung der eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ im PVAT (Abbildung 16A). Auf die eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ zeigte das Fasten für 16 Stunden keine Auswirkung (Abbildung 16A). Die HFD-Fütterung verminderte auch die eNOS-Phosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ im PVAT (Abbildung 16B), die nach dem Fasten vermindert blieb (Abbildung 16B). Ähnliche Ergebnisse ergeben sich, unabhängig davon, ob die eNOS-Phosphorylierung auf Tubulin (Abbildungen 16A & B) oder auf die gesamte eNOS (Abbildungen 16C-F) normiert wird.

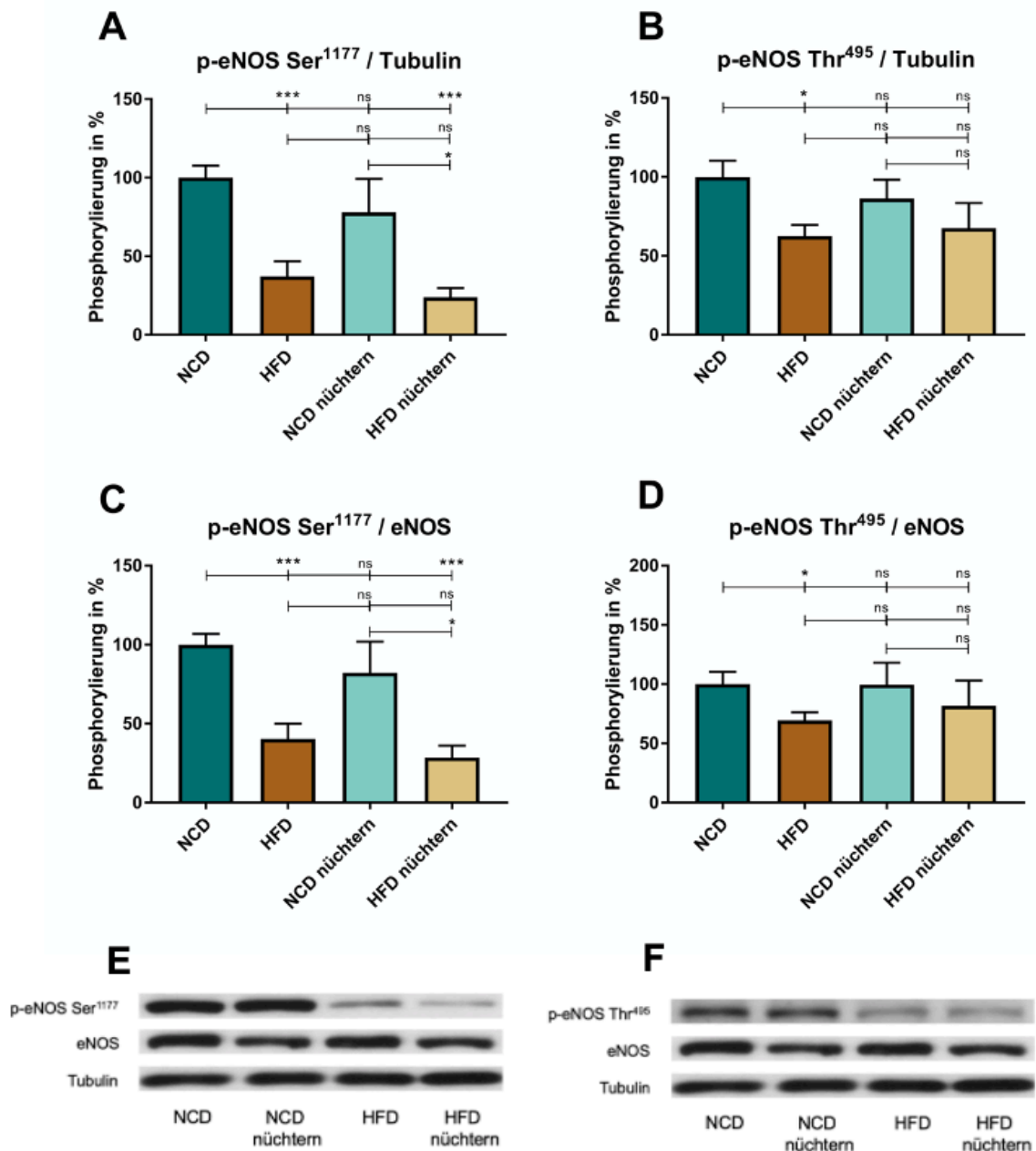


Abbildung 16 Phosphorylierung der eNOS im PVAT der thorakalen Aorta.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen. A: Dargestellt wird die Phosphorylierung von eNOS an Ser¹¹⁷⁷ normiert auf Tubulin; B: Dargestellt wird die Phosphorylierung von eNOS an Thr⁴⁹⁵ normiert auf Tubulin; C: Dargestellt wird die Phosphorylierung von eNOS an Ser¹¹⁷⁷ normiert auf eNOS; D: Dargestellt wird die Phosphorylierung von eNOS an Thr⁴⁹⁵ normiert auf eNOS; E: Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots für die Abbildungen A und C; F: Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots für die Abbildungen B und D; n = 6; * = p < 0,05; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.3.2 *Phosphorylierung von Akt*

Die Analyse der Akt-Phosphorylierung im PVAT der thorakalen Aorta bringt keine eindeutigen Ergebnisse. Es war nur eine tendenzielle Reduktion der Akt-Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ (Abbildung 17A) und Thr³⁰⁸ (Abbildung 17B) durch HFD-Fütterung zu erkennen. Unabhängig davon ob auf Akt-pan oder Tubulin normalisiert wurde, war kein Unterschied zwischen den Gruppen statistisch signifikant (Abbildung 17).

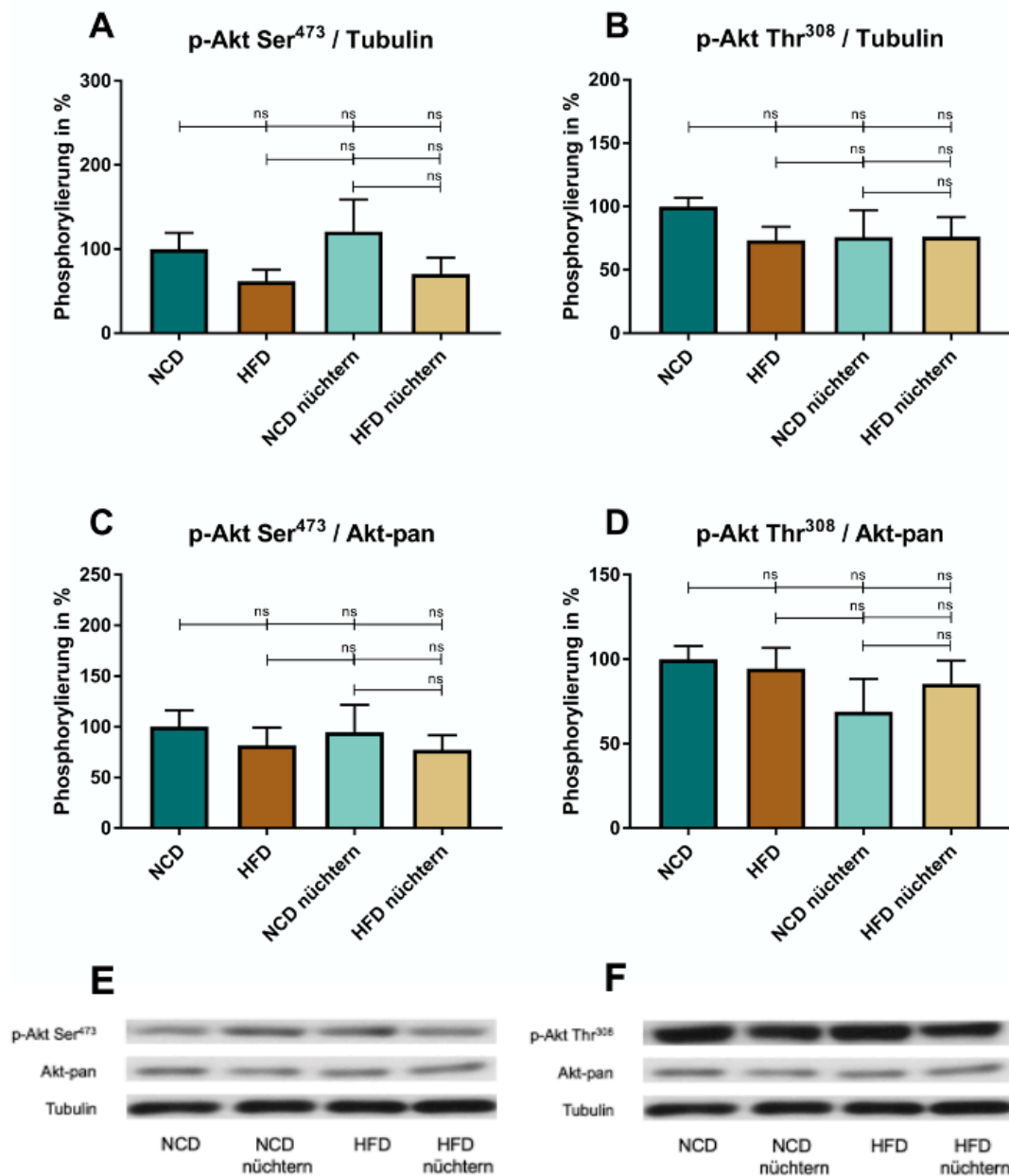


Abbildung 17 Phosphorylierung der Akt-Kinase im PVAT der thorakalen Aorta.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen. A: Dargestellt wird die Phosphorylierung von Akt an Ser⁴⁷³ normiert auf Tubulin; B: Dargestellt wird die Phosphorylierung von Akt an Thr³⁰⁸ normiert auf Tubulin; C: Dargestellt wird die Phosphorylierung von Akt an Ser⁴⁷³ normiert auf Akt-pan; D: Dargestellt wird die Phosphorylierung von Akt an Thr³⁰⁸ normiert auf Akt-pan; E: Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots für die Abbildungen A und C; F: Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots für die Abbildungen B und D; n = 6; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.3.3 Expression von Rictor und Nampt

In Abbildung 18A zeigt sich, dass die Expression von Rictor in allen drei Gruppen im Vergleich zu NCD signifikant abnimmt.

In Abbildung 18B sieht man, dass Nampt bei NCD-nüchtern erhöht ist im Vergleich zur NCD-Kontrolle. Bei HFD und HFD-nüchtern ist der Effekt nicht nachweisbar. Im Vergleich zu der NCD-Gruppe führt die HFD-Fütterung zur Reduktion der Nampt-Expression, die auch nach dem 16-stündigen Fasten vermindert bleibt.

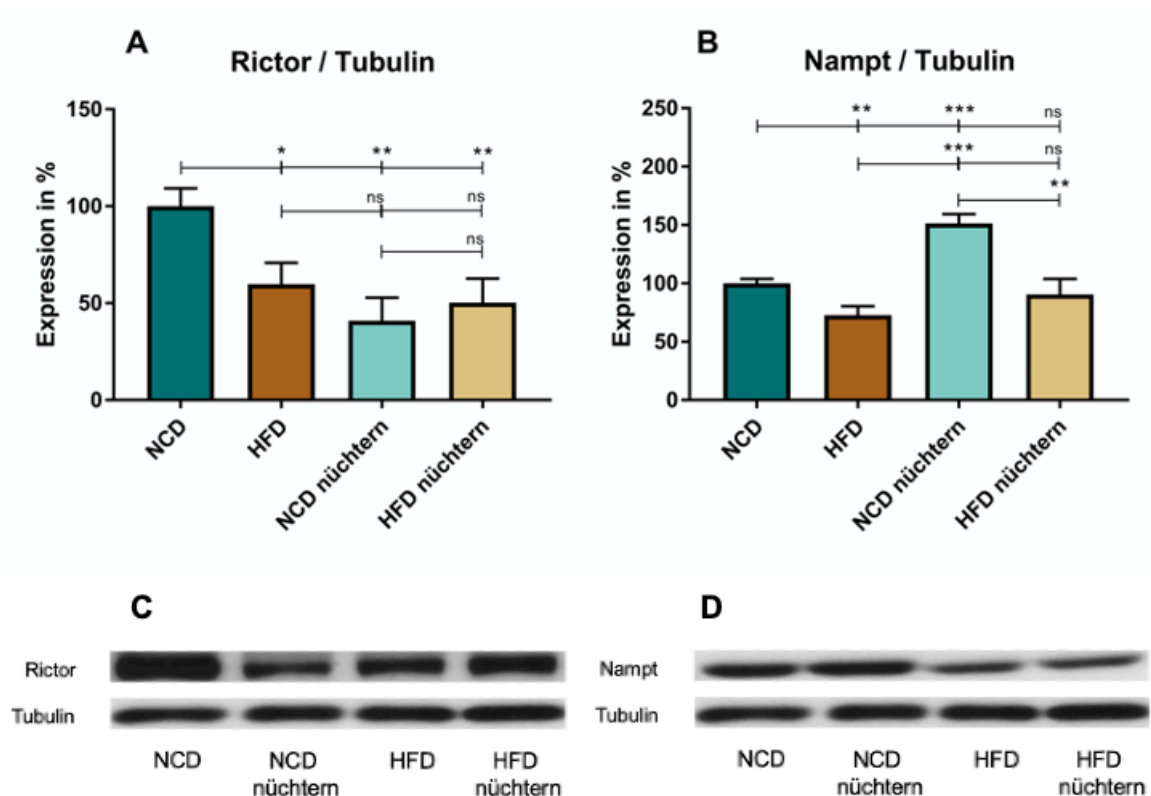


Abbildung 18 Rictor- und Nampt-Expression im PVAT der thorakalen Aorta.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen. A: Dargestellt wird die Expression von Rictor normalisiert auf Tubulin; B: Dargestellt wird die Expression von Nampt normiert auf Tubulin; C: Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots für die Abbildungen A; D: Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots für die Abbildungen B; n = 6; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.4 Serumlipide

Die HFD-Fütterung für 18 Wochen resultierte in einer Erhöhung des Gesamtcholesterins (Abbildung 19A). Das 16-stündige Fasten führte zu einer leichten Reduktion des Gesamtcholesterins in den NCD-, aber nicht in den HFD-Mäusen (Abbildung 19A).

Die Triglyceride in den HFD- waren überraschenderweise niedriger als in den NCD-Mäusen (Abbildung 19B). Das 16-stündige Fasten führte zu einer Reduktion der Triglyceride in den NCD-, aber nicht in den HFD-Mäusen (Abbildung 19B).

Die HFD-Fütterung für 18 Wochen führte zur Erhöhung von HDL und LDL (Abbildung 19C & D). In den NCD-Mäusen bewirkte das 16-stündige Fasten eine Verminderung von LDL aber nicht von HDL. In den HFD-Tieren zeigte das 16-stündige Fasten keinen Einfluss, weder auf HDL noch auf LDL (Abbildung 19C & D).

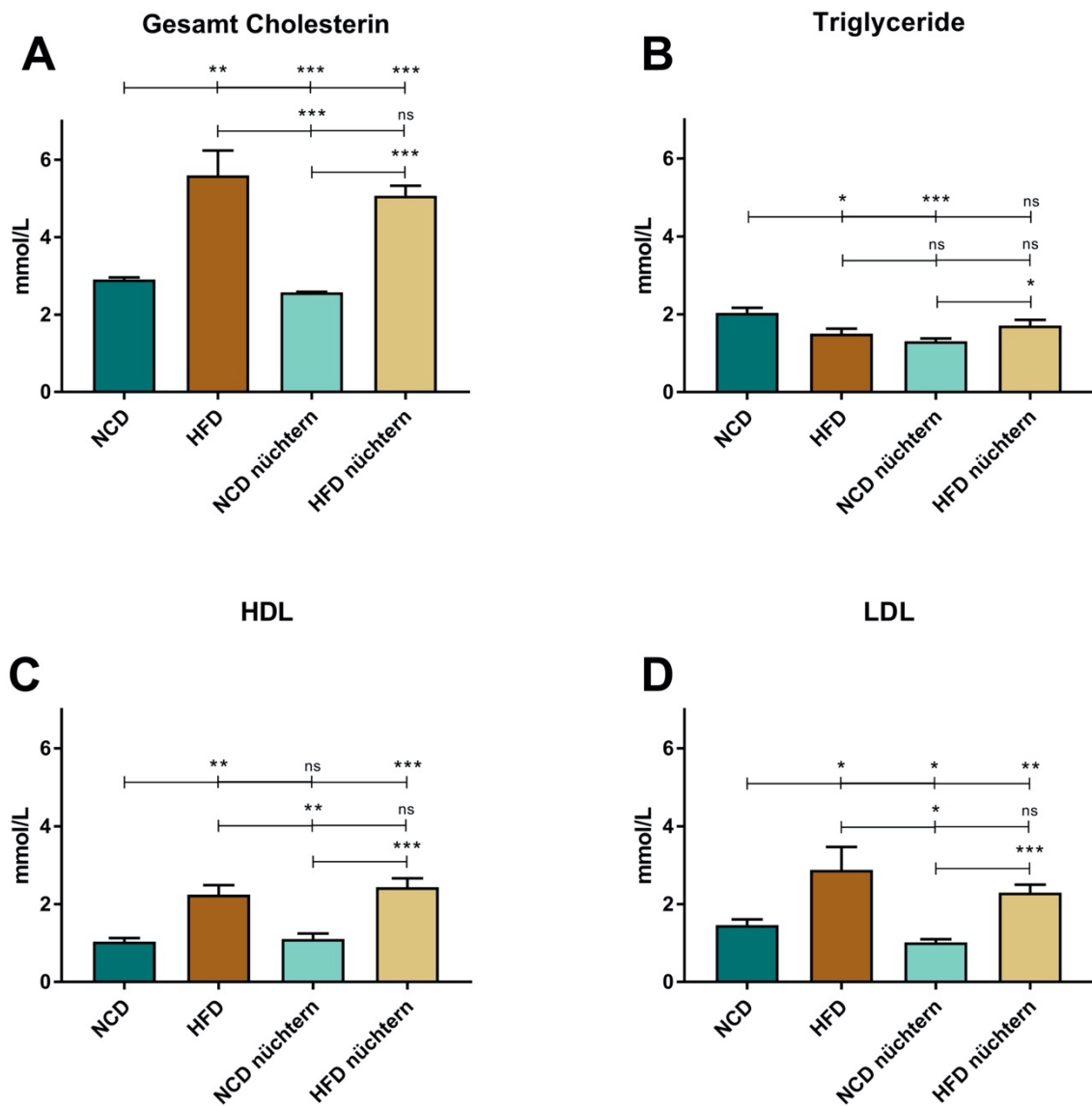


Abbildung 19 Serumlipide.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen. A: Dargestellt wird das Gesamt-Cholesterin im Serum; B: Dargestellt werden die Triglyceride im Serum; C: Dargestellt wird das HDL-Cholesterin im Serum; D: Dargestellt wird das LDL-Cholesterin im Serum; n = 6; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

4.5 Leberenzyme

Die HFD-Fütterung für 18 Wochen führte zu einer Erhöhung von GPT und GOT, aber nicht von alkalischer Phosphatase (Abbildung 20). In den NCD-Mäusen verminderte das 16-stündige Fasten die GPT, aber nicht die GOT oder die alkalische Phosphatase. In den HFD-Tieren zeigte das 16-stündige Fasten keine Wirkung auf die Leberenzyme (Abbildung 20).

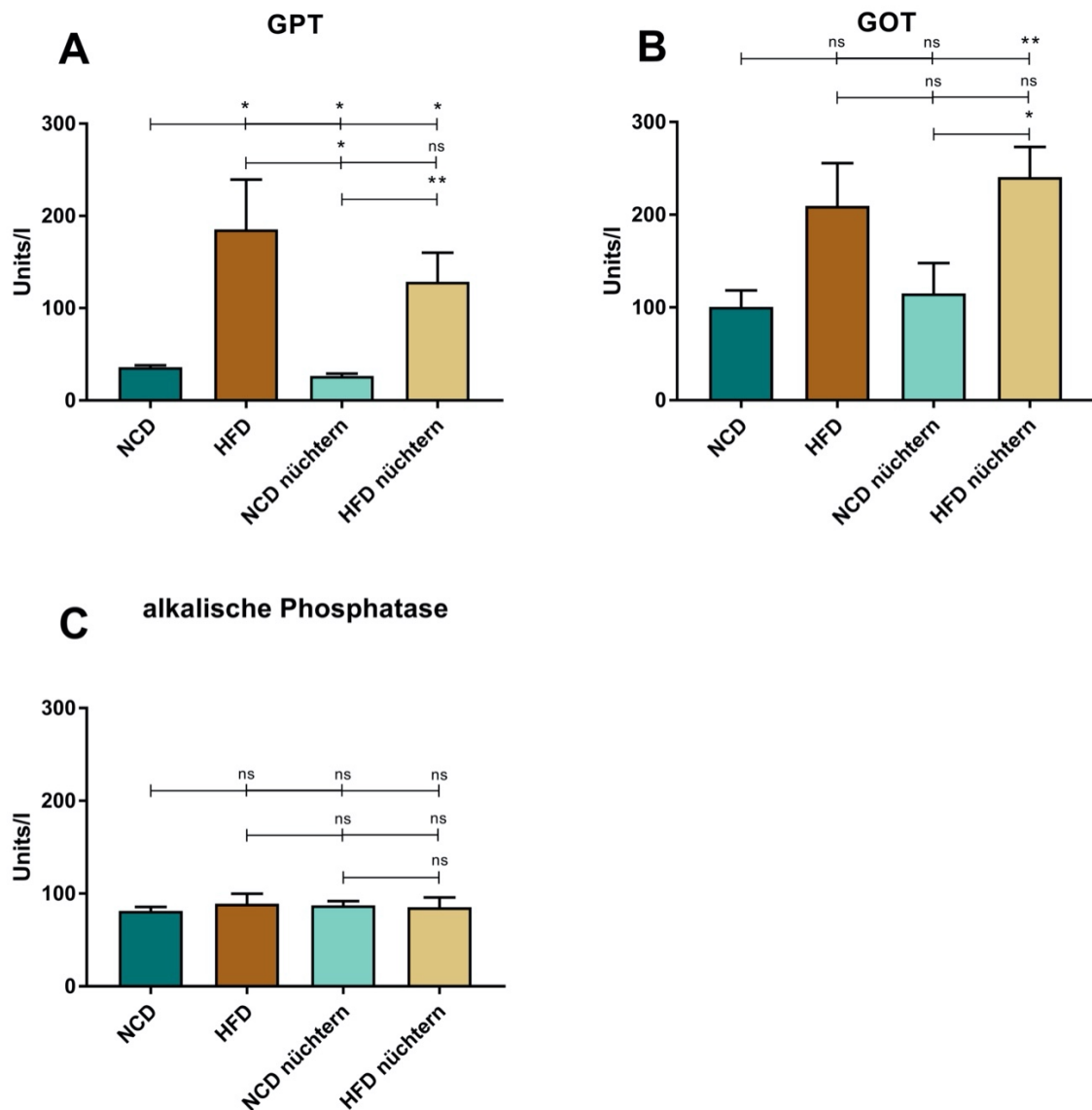


Abbildung 20 Leberenzyme.

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer Diät unterzogen. Jeweils 12 Mäuse bekamen NCD-Futter und 12 Mäuse HFD-Futter. In der Nacht vor der Euthanasie wurde jeweils 6 Mäusen der 2 Gruppen für 16 Stunden lang das Futter entzogen. A: Dargestellt wird die GPT im Serum; B: Dargestellt wird die GOT im Serum; C: Dargestellt wird die alkalische Phosphatase im Serum;

n = 6; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ns = nicht signifikant; Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

5 Diskussion

5.1 Körpergewicht und Trinkwasser

5.1.1 Gewicht

Um das metabolische Syndrom zu untersuchen, muss zunächst dieser Zustand bei den Mäusen erreicht werden. West et al. haben schon 1992 gezeigt, dass die C57BL/6J-Mäuse gut für Untersuchungen des Metabolischen Syndroms geeignet sind. Sie beschreiben eine adipöse Entwicklung ab sieben Wochen mit fettreicher Diät [122]. Ein wichtiger Faktor für die Entstehung des Übergewichts im Mausmodell ist auch die Art der Diät [122].

Die Diät in Form der HFD-Fütterung über 18 Wochen hat für eine deutliche Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit NCD gefüttert wurde, gesorgt (Abbildung 7). Die Gewichtszunahme durch die Diät ist in Übereinstimmung mit vielen anderen diet-induced-obesity – (DIO)-Experimenten [127]. Die 16-stündige Fastenperiode senkt das Gewicht der Mäuse minimal, jedoch nicht signifikant (Abbildung 8). Zu bemerken ist allerdings, dass das Fasten einen signifikanten Einfluss auf das Lebergewicht der Mäuse hat (Abbildung 13).

Das Übergewicht sowie die Gewichtszunahme der Leber wird als Marker für das Vorliegen eines Metabolischen Syndroms (vgl. Definition NCEP und WHO) angesehen [1, 17].

Die mit HFD gefütterten Mäuse verbrauchen weniger Futter als die mit NCD gefütterten Mäuse. Sampey et al. haben das auch bei HFD gefütterten Ratten beobachtet [128]. Dennoch ist durch die höhere Energiedichte der HFD eine höhere Energieaufnahme zu beobachten als in der Kontrollgruppe (Abbildungen 9 & 10). Zu beachten ist auch, dass die Gewichtszunahme pro aufgenommene Energie-Einheit bei Fett höher ist als bei Proteinen und Kohlenhydraten, da es mehr Energie kostet langkettige Fette aus Kohlenhydraten und Proteinen zu erzeugen, als diese direkt aus der Nahrung aufzunehmen und zu speichern [127].

Daher kann die HFD-Fütterung als eine valide Methode zur Erzeugung von Übergewicht und Metabolischem Syndrom im Mausmodell angesehen werden [129].

Die Mäuse beider Gruppen nehmen über die gesamte Dauer der Diät in etwa konstant die gleiche Futtermenge und damit Energiemenge zu sich (Abbildungen 9 & 10). Es wurde in manchen Studien beschrieben, dass Mäuse und Ratten ihre Nahrungsaufnahme an die Energiedichte anpassen [127]. Diese Anpassung ist hier aber über den zeitlichen Verlauf der Energie- und Nahrungsaufnahme nicht zu sehen. Eine Hyperphagie, wie sie in Studien über High-Fat-Diäten beschrieben wird [127], ist auch nicht zu beobachten.

Außerdem ist zu bedenken, dass hier nur der Futterverbrauch gemessen werden kann, da zum einen bauartbedingt Futter in den Käfig fällt und Mäuse zum anderen Futter verstecken, um es für spätere Zeiten aufzuheben [130]. Das versteckte Futter wird dann bei dem Wechsel der Käfige ungewogen entsorgt.

5.1.2 Wasserverbrauch

Interessanterweise verbrauchen NCD Mäuse im Mittel 7,84 ml mehr Wasser pro Woche als HFD Mäuse (Abbildung 12). Man könnte versuchen den Mehrverbrauch von Wasser in der NCD Gruppe durch den erhöhten Salzkonsum der NCD Mäuse zu erklären, da im NCD Futter 0,25% Salz enthalten sind und im HFD Futter nur 0,2%. Mit dem Futterverbrauch gegengerechnet verbrauchen NCD Mäuse 32,35mg und HFD Mäuse 21,98mg Salz pro Woche. Kitada et al. beschreiben aber, dass eine vermehrte Salzaufnahme zu einer vermehrten Salzausscheidung über die Niere führt, nicht aber zu einer vermehrten Wasseraufnahme. Auch beschreiben sie, dass die Regulation zur Aufnahme von Wasser durch viele Faktoren wie Hormonausschüttung und Stoffwechsel gesteuert wird [131]. Eine andere Studie zeigt sogar, dass die Wasseraufnahme bei vermehrter Salzaufnahme sinkt [132]. Bankir et al. sagen, dass die Kohlenhydrat- und Proteinanteile der aufgenommenen Nahrung Einfluss auf die Trinkmenge nehmen [133]. In Zusammenschau dieser Publikationen lässt sich ein genauer Grund für den Unterschied in meinen Gruppen nicht benennen. Dies wäre ein Ansatzpunkt für weitere Forschung.

5.2 Organbad

Adipositas ist in den Industrienationen eine Erkrankung mit epidemischen Ausmaßen [1]. Die Folgeerkrankungen stellen die Haupttodesursachen in den Industrienationen dar [1]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist die vaskuläre Dysfunktion, die unter anderem für kardiovaskulären Erkrankungen hauptsächlich verantwortlich ist [24].

Wie schon in Kapitel 2.2.1 beschrieben ist ein zentraler Mechanismus der vaskulären Dysfunktion die Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit in den Endothelzellen sowie in den Fettgeweben um die Arterien herum [24]. Die Abnahme des NO wird auf eine verminderte Produktion und eine vermehrte Inaktivierung Aufgrund des oxidativen Stress zurückgeführt [24]. Verschiedene Mechanismen liegen dem zugrunde.

Zum einen ist für die Regulation der eNOS-Aktivität und damit der NO-Produktion die Phosphorylierung von Ser¹¹⁷⁷ ausschlaggebend [30, 134, 135]. Zum anderen wird NO direkt durch Superoxid-Anionen inaktiviert [28]. Oxidativer Stress führt daher einerseits zur vermehrten NO-Inaktivierung aber andererseits auch zur Entkopplung der eNOS [27]. Die Oxidation von BH₄ durch ROS und die verminderte Bioverfügbarkeit von L-Arginin durch Induktion von Arginasen sind hauptsächlich für die Entkopplung der eNOS verantwortlich [9, 32].

Seit 1991 ist bekannt, dass nicht nur das Endothel für die vaskuläre Funktion verantwortlich ist, sondern auch das PVAT dafür Verantwortung trägt [42]. Neuere Experimente haben gezeigt, dass sich die Gefäßfunktion von adipösen Mäusen in Anwesenheit von PVAT verschlechtert [22, 37]. Beim Menschen konnte dieser Effekt bei in vitro-Gefäßen ebenfalls nachgewiesen werden [54]. 2016 haben Xia et al. gezeigt, dass die Gefäßfunktion bei Aorten von adipösen Mäusen mit PVAT verschlechtert ist, gegenüber den Aorten normalgewichtiger Mäuse. Interessanterweise ist dieser Effekt aber nicht bei PVAT-freien Aorten nachzuweisen gewesen. Man hat daraus geschlussfolgert, dass der Haupteffekt für vaskuläre Dysfunktion aus dem PVAT stammt, nicht aber aus dem Endothel [22].

Diesen Effekt konnte ich auch in meiner Studie zeigen. In der PVAT-freien Aorta sind keine Unterschiede in der Relaxation mit Acetylcholin in den Gruppen zu erkennen (Abbildung 15A). Dagegen war in den PVAT-haltigen Aorten eine klare Gefäßdysfunktion der HFD-Mäuse festzustellen (Abbildung 14A). Diese Befunde stehen in Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien [22, 37].

In Abbildung 15D, wo die Relaxation der Aorta ohne PVAT gezeigt wird, aber zusätzlich vor der Messung der Dosiswirkungskurve der eNOS-Inhibitor L-Name hinzugefügt wurde, sieht man eine Relaxation der Aorta in allen Gruppen. Zu erwarten wäre eigentlich in Einklang mit Studien von Xia et al. und Ketonen et al., dass sich die Aorten nicht mit Acetylcholin relaxieren lassen [22, 37]. Möglicherweise ist in den durchgeführten Versuchen beim Abpräparieren des PVAT von den Aorten das Gefäß beschädigt worden.

Hier sieht man eine Problematik des Organbadversuchs zur Messung der Gefäßspannung im Myographen. Es erfordert viel Übung und Fingerspitzengefühl um die 1-2mm großen Aorten unter dem Mikroskop vom PVAT befreien zu können. Hier hat sich gezeigt, dass die Übung an einigen wenigen Mäusen nicht ausreichend war. Interessant wäre es, um die Ergebnisse zwischen den Verschiedenen Laboren und Untersuchern besser vergleichen zu können, zu wissen wie groß die Übung und Erfahrung der jeweiligen Untersucher ist.

In den Versuchen mit belassenem PVAT an den Aorten sieht man in Abbildung 14D, dass sich die Aorten nach Inkubation mit L-Name nicht mit Acetylcholin relaxieren lassen. Im Gegenteil,

teilweise erhöht sich sogar die Spannung. Das lässt sich damit erklären, dass das Acetylcholin direkt an den glatten Muskelzellen der Gefäßwand bindet und so zu einer Kontraktion des Gefäßes führt. Das ist ein Hinweis dafür, dass das Gefäß intakt war und die Ergebnisse bei den Aorten mit PVAT valide sind.

Wie in der Abbildung 14A gezeigt, war die Relaxationsfähigkeit der PVAT-haltigen Aorta bei HFD-gefütterten Mäusen im Vergleich zu NCD-gefütterten Mäusen signifikant vermindert. Das Ergebnis ist mit den von Xia et al. und Ketonen et al. übereinstimmend [22, 37]. Das ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Ergebnisse mit den PVAT-haltigen Aorten zuverlässig sind. Die verminderte Relaxation der PVAT-haltigen Aorten der HFD-Mäuse in Abbildung 14A deutet auf eine Dysfunktion des PVAT hin. Wenn man jedoch Abbildung 14B anschaut, die die Aorten mit PVAT und der vorausgehenden 16-stündigen Nüchternheit darstellt, sieht man keinen Unterschied mehr in der Relaxationsfähigkeit zwischen NCD-nüchtern- und HFD-nüchtern-Gruppen. Das heißt, dass eine 16-stündige Nüchternheit in adipösen Mäusen die Relaxationsfähigkeit der Aorta mit PVAT wieder auf das Maß der normalgewichtigen Mäuse verbessern kann. Weiter kondensiert kann man sagen, dass die Nüchternheit bei adipösen Mäusen die PVAT-Funktion wiederherstellt.

5.3 Western Blot

Nachdem das Organbad-Experiment gezeigt hat, dass die 16-stündige Nüchternheit einen Effekt auf die Relaxationsfähigkeit der Aorta hat, habe ich mit einer Western-Blot-Analyse versucht, eine Erklärung für den gemessenen Effekt zu finden. Die Phosphorylierung von eNOS an Ser¹¹⁷⁷ und Thr⁴⁹⁵ wurde als ein wichtiger Regulationsmechanismus für die eNOS im Endothel und der PVAT ausfindig gemacht [30, 134, 135]. Eine verminderte Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁷ und vermehrte Phosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ gehen mit einer verminderten Aktivität der eNOS einher, beziehungsweise eine vermehrte Aktivität mit einer erhöhten Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ und verminderten Phosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ [32, 134]. Dementsprechend ist bei HFD eine verminderte Phosphorylierung der Akt zu erwarten [134]. Über eine Erhöhung der Scherkräfte in der Aorta wird der Signalweg über die mTOR-Untereinheit Rictor aktiviert [47], weshalb man auch hier eine Verminderung bei HFD erwarten kann.

Ähnlich ist es bei Nampt, der ratenlimitierenden Untereinheit der NAD-Biosynthese. Bei übergewichtigen Mäusen und dysfunktionalem PVAT erwartet man eine verminderte Nampt-Expression in den HFD-Gruppen [21].

In Abbildung 16 wird die Phosphorylierung der eNOS dargestellt. In den Abbildungen 16A und 16B jeweils auf Tubulin normalisiert und in 16C und 16D auf die gesamten eNOS.

In Abbildung 16A kann man in Übereinstimmung mit anderen Studien [22] sehen, dass die Phosphorylierung an Serin¹¹⁷⁷ in den HFD-Gruppen signifikant niedriger ist als in den NCD-Kontrollgruppen, unabhängig davon, mit welchem Protein normalisiert wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen der HFD-nüchtern-Gruppe und der HFD Gruppe ist nicht zu sehen. Allerdings kann man eine Tendenz erkennen, dass die Phosphorylierung an Serin¹¹⁷⁷ in den Nüchterngruppen eher niedriger ist.

In den Abbildungen 16B und 16D ist die Phosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ abgebildet. Auch hier ist eine Abnahme der Phosphorylierung in der HFD-Gruppe zu erkennen. Xia et al. zeigten hier 2016 keine Verminderung der Phosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ [22] im Gegensatz zur erwartbaren physiologischen Verminderung wie Förstermann sie beschreibt [32]. Eine signifikante Änderung der Phosphorylierung durch das 16-stündige Fasten ist in den Abbildungen nicht zu sehen.

Die Abbildung 17 stellt die Phosphorylierung der Akt an Serin⁴⁷³ und Threonin³⁰⁸ dar. Wie auch in den anderen Western-Blot-Analysen wurde einmal auf Akt-pan und einmal auf Tubulin normalisiert.

Bei Betrachtung aller vier Darstellungen der Phosphorylierung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen. Man sieht hier im Gegensatz zu Xia et al. nur eine Tendenz in der Abnahme der Phosphorylierung in den HFD Gruppen, aber keine signifikanten Unterschiede [22]. Auch eine Tendenz in den HFD-nüchtern-Gruppen vermehrt phosphoryliertes Threonin und Serin zu exprimieren ist nicht zu erkennen.

Ein möglicher Erklärungsversuch ist, dass Xia et al. in ihren Experimenten mindestens 20 Wochen eine HFD-Diät an ihren Versuchstieren durchgeführt haben [22], während in dieser Arbeit nur 18 Wochen Diät gehalten wurde.

Abbildung 18 zeigt die Expression der Enzyme Rictor und Nampt. Rictor wird als kritischer Regulator der Entzündung in PVAT bei adipösen Mäusen betrachtet [49]. Es zeigt sich, dass Rictor im PVAT der HFD-Mäuse erniedrigt ist. Bhattacharya hat diesen Beobachtung 2013 erstmalig publiziert [49]. Dieser Effekt wird in dieser Studie ebenfalls gezeigt. Zusätzlich sieht man, dass eine 16-stündige Fastenperiode die Expression von Rictor senkt. In HFD gefütterten Mäusen senkt die Fastenperiode die Rictor-Expression nicht signifikant. Die Herunterregulierung von Rictor, die mit einem Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen verbunden ist [49], passt sehr gut in das Bild der vaskulären Dysfunktion. Eine Erklärung für den antikontraktilen Effekt der 16-stündigen Nüchternheit in adipösen Mäusen bleibt aber aus.

NAD⁺ spielt eine essenzielle Rolle im Energiemanagement vieler Lebewesen [21]. Es wurde gezeigt, dass Nampt als geschwindigkeitslimitierendes Enzym der NAD⁺-Biosynthese in übergewichtigen und alten Patienten abnimmt [21]. Die mit HFD gefütterte Gruppe zeigt in Abbildung 18B eine signifikant niedrigere Expression von Nampt als die NCD-Kontrollgruppe. In der Nüchterngruppe der NCD-Mäuse ist die Expression von Nampt deutlich erhöht, das zeigt sich aber nicht bei der HFD-nüchtern-Gruppe. Hier ist wieder nur eine Tendenz zu erkennen aber kein signifikanter Unterschied. Auch die Expression von Nampt liefert keine Erklärung für die wiederhergestellte Relaxation durch Nüchternheit.

5.4 Serumlipide

Der Zusammenhang zwischen Übergewicht und Hypercholesterinämie ist schon lange bekannt [136]. Bekannt ist auch, dass Hypercholesterinämie zu dysfunktionalem Fettgewebe führt, und dass es das Größenwachstum der Adipozyten und Inflammation fördert [136]. Daher passen die Ergebnisse des Gesamtcholesterins, die in dieser Studie im Serum der vier Gruppen gemessen wurden sehr gut in das Bild der vaskulären Dysfunktion und des Metabolischen Syndroms. In der NCD-Gruppe fällt das Cholesterin nach der 16-stündigen Fastenperiode allerdings ab (Abbildung 19A). Das steht in Einklang mit der Literatur [136]. Allerdings ist das Gesamtcholesterin in den HFD-Mäusen durch das Fasten nicht reduziert.

Zusammen mit der Hypercholesterinämie geht bei Adipositas und Metabolischem Syndrom auch eine Erhöhung der Triglyceride einher [136]. Der TG-Spiegel wird normalerweise nüchtern bestimmt, da die Triglyceride nach Nahrungsaufnahme im Blut erhöht sind [137]. Dazu passend sind die TG-Spiegel in den NCD-nüchtern-Mäusen niedriger als in der NCD-Gruppe (Abbildung 19B). Allerdings ist das bei den HFD-Mäusen nicht der Fall. Der Grund dafür könnte die verminderte TG-Clearance bei adipösen Individuen sein [136]. Wenn man nur die TG-Werte nach der 16-stündigen Fastenperiode vergleicht, sind die TG in den HFD-nüchtern- höher als NCD-nüchtern-Tiere (Abbildung 19B).

In Abbildung 19C ist der HDL-Spiegel in den vier Gruppen dargestellt. Wie in Kapitel 2.3.1 erörtert, spielt die HDL eine wichtige Rolle als Risikofaktor und Schutzfaktor für kardio-vaskuläre-Erkrankungen im Metabolischen Syndrom [66]. Nicht nur die Reduktion von HDL im Metabolischen Syndrom ist ein Risikofaktor, sondern auch die durch Adipositas ausgelöste Dysfunktionalität [81].

In dem hier durchgeführten Experiment ist die HDL signifikant höher in den HFD-Gruppen als in den NCD-Gruppen. Auch die Nüchternheit zeigt keinen Effekt (Abbildung 19C). Die Funktionalität der HDL wurde in diesem Experiment nicht untersucht, wäre aber ein interessanter Ansatzpunkt zur weiteren Forschung.

Die Abbildung 19D zeigt, wie zu erwarten, eine signifikant erhöhte LDL-Konzentration in den HFD-Gruppen. Wenn man sich die Nüchtern-Gruppen anschaut, sieht man einen deutlich erhöhten LDL-Spiegel in der HFD-nüchtern-Gruppe. Hier passen die Parameter sehr gut in das Bild des Metabolischen Syndroms [66]. Die Nüchternheit reduziert den LDL-Spiegel zwar in den NCD-Mäusen aber nicht in den HFD-Tieren.

Im Großen und Ganzen passen die Serum-Lipide in das Bild des Metabolischen Syndroms. Auch wenn sie keine Erklärung für die beobachteten Effekte im Organbad liefern.

5.5 Leberenzyme

In Übereinstimmung mit der Literatur sieht man in Abbildung 20A eine signifikante Erhöhung der GPT in den HFD-Gruppen. Bei nüchternen Mäusen sieht man sogar einen hoch signifikanten Unterschied. In den NCD-Gruppen konnte eine signifikante Verringerung der GPT in der Nüchterngruppe gezeigt werden. Bei den HFD-Gruppen konnte die Nüchternheit keine signifikante Wirkung auslösen. Aber man kann eine Tendenz der Reduktion bei der HFD-nüchtern-Gruppe sehen.

Bei der GOT in Abbildung 20B sieht man, dass die HFD-Fütterung zu einer Erhöhung von GOT führt. Die 16-stündige Fastenperiode hat keine Auswirkung auf die GOT-Werte, weder in den NCD- noch in den HFD-Mäusen.

In der alkalischen Phosphatase sieht man keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

In Summe passen die meisten Ergebnisse in das Bild des Metabolischen Syndroms [90]. Auch lässt sich eine Schädigung der Leber im Sinne einer NAFLD vermuten [85]. In der Abbildung 13 ist das Gewicht der Lebermittellappen dargestellt. Hier sieht man eine deutliche Gewichtsdiﬀerenz der Leber zwischen den NCD- und HFD-Gruppen. Die Gewichtserhöhung bei HFD ist ganz im Sinne der NAFLD-Definition [83]. Die Ergebnisse passen sehr gut zu den anderen Ergebnissen dieser Arbeit. Die Reduktion des Lebergewichts in den Nüchtern-Gruppen im Vergleich zu den Nicht-nüchtern-Gruppen steht kongruent zu den Beobachtungen im Organbad, dass Nüchternheit bei HFD-Mäusen die Gefäßfunktion wiederherstellen kann. Einen kausalen Zusammenhang zwischen Lebergewicht und Relaxationsfähigkeit der Aorta

konnte nicht nachgewiesen werden. Dieser stellt aber einen weiteren Punkt für weitere Forschung dar.

Auch die Tatsache, dass der Zusammenhang von Leberschäden wie NAFLD und Fasten noch nicht gut untersucht ist [86, 87], macht die Einordnung der Ergebnisse in den Zusammenhang dieser Arbeit nicht ganz einfach und fordert weitere Untersuchungen.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich sagen, dass 16-stündiges Fasten eine signifikante Verbesserung der PVAT-Funktion mit sich bringt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Erkenntnisse, dass ein gesundes und intaktes PVAT maßgeblich zur Gefäßfunktion beiträgt und Adipositas ein maßgebender Faktor für die Dysfunktionalität im PVAT ist. Auch konnte gezeigt werden, dass die Fastenperiode von 16 Stunden die PVAT-Funktion auf das Maß eines gesunden PVAT verbessern kann.

Leider wurde nicht herausgefunden, aus welchen Gründen die Fastenperiode die PVAT-Funktion auf diese Art und Weise verbessert. Die eNOS Regulationsmechanismen über Phosphorylierung der Akt und an eNOS selbst konnten den Effekt nicht erklären. Auch Serumanalysen für Leberenzyme und Lipoproteine konnten nur bestätigen, dass die durchgeführte Diät und die Fastenphasen funktioniert haben, aber keinen Grund für die verbesserte Relaxation liefern.

Es werden aber Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen geliefert. So könnte man versuchen herauszufinden, ob andere Messenger im PVAT bei einer Fastenperiode die Relaxationsfähigkeit verbessern. Weitere Ansätze wären der Einfluss auf die Inflammation oder die Veränderung der reaktiven Sauerstoffspezies. Aber auch der Zusammenhang von Fasten und den Transaminasen GPT und GOT bedarf noch weiterer Forschung, genau wie die Gewichtsreduktion in der Leber.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer 16-stündigen Fastenperiode auf die Gefäßfunktion in einem Adipositas-Modell untersucht. Männliche C57BL/6J-Mäuse wurden ab dem Alter von 6 Wochen für 18 Wochen einer fettreichen Diät (HFD) unterzogen. Die mit HFD gefütterten Mäuse wurden adipös, hatten eine vergrößerte Leber, erhöhte Werte der Leberenzyme (GPT und GOT) sowie gesteigerten Serumspiegel an Gesamtcholesterin. Diese Daten sprechen dafür, dass das Adipositas-Modell erfolgreich war. Zur Untersuchung der Gefäßfunktion wurden die thorakalen Aorten isoliert und jeweils mit oder ohne PVAT (perivaskuläres Fettgewebe) im Myograph-System montiert. Nach einer Vorkontraktion mit Noradrenalin wurden die Aortenringe mit Acetylcholin in steigenden Konzentrationen relaxiert. In den Aortenringen mit PVAT war die Acetylcholin-induzierte Relaxation der HFD-Mäuse deutlich verschlechtert im Vergleich zu den mit normalem Kontrollfutter (NCD) gefütterten Mäuse. Dagegen war die Relaxation der PVAT-freien Aortenringen in beiden Gruppen vergleichbar. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit bisherigen Studien und weisen darauf hin, dass die Ursache der Gefäßdysfunktion der adipösen Mäuse im PVAT und nicht im Endothel liegt. Interessanterweise konnte eine 16-stündige Nahrungskarenz die PVAT-Funktion so weit verbessern, dass die Acetylcholin-induzierte Relaxation der PVAT-haltigen Aortenringe der HFD-Mäuse das Niveau der schlanken NCD-Kontrolltiere erreichte.

Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dabei konnte im PVAT der HFD-Mäuse keine Wirkung durch die 16-stündige Fastenperiode beobachtet werden, weder auf die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) oder der Akt-Kinase, noch auf die Expression von Rictor (einem Regulatorprotein im mTOR-Komplex 2) oder Nampt (dem ratenlimitierenden Enzym für die NAD⁺-Biosynthese). Das Fasten der adipösen Mäuse hatte auch keine Auswirkung auf die Serumlipide oder der Leberenzyme.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit die Beobachtung bestätigen, dass das PVAT eine wichtigere Rolle als das Endothel für die Gefäßdysfunktion der HFD-induzierten adipösen Mäuse spielt. Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die PVAT-Dysfunktion der adipösen Mäuse durch eine 16-stündige Fastenperiode normalisiert werden konnte. Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten nicht identifiziert werden und sollen in weiteren Studien untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation. Obesity and overweight 2020 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>].
2. Meldrum, D. R., Morris, M. A., Gambone, J. C. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will? *Fertility and Sterility*. 2017;107(4):833-9.
3. Katz, D. L., Meller, S. Can we say what diet is best for health? *Annu Rev Public Health*. 2014;35:83-103.
4. Chin, S. H., Kahathuduwa, C. N., Binks, M. Physical activity and obesity: what we know and what we need to know. *Obes Rev*. 2016;17(12):1226-44.
5. Aghamohammadzadeh, R., Greenstein, A. S., Yadav, R., Jeziorska, M., Hama, S., Soltani, F., et al. Effects of bariatric surgery on human small artery function: evidence for reduction in perivascular adipocyte inflammation, and the restoration of normal anticontractile activity despite persistent obesity. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(2):128-35.
6. Li, H., Xia, N., Hasselwander, S., Daiber, A. Resveratrol and Vascular Function. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2155.
7. Johnstone, A. Fasting for weight loss: an effective strategy or latest dieting trend? *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(5):727-33.
8. Wilson, R. A., Deasy, W., Stathis, C. G., Hayes, A., Cooke, M. B. Intermittent Fasting with or without Exercise Prevents Weight Gain and Improves Lipids in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*. 2018;10(3).
9. Xia, N., Li, H. The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(20):3425-42.
10. Witkos, M., Uttaburanont, M., Lang, C. D., Arora, R. Costs of and reasons for obesity. *J Cardiometab Syndr*. 2008;3(3):173-6.
11. James, W. P. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med*. 2008;263(4):336-52.
12. Drewnowski, A., Specter, S. E. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(1):6-16.
13. Lavie, C. J., Milani, R. V., Ventura, H. O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(21):1925-32.
14. Siegel-Axel, D. I., Häring, H. U. Perivascular adipose tissue: An unique fat compartment relevant for the cardiometabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(1):51-60.
15. Saklayen, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(2):12.
16. Holt, R. I. International Diabetes Federation re-defines the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7(5):618-20.
17. National Cholesterol Education Program. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001;285(19):2486-97.
18. Wildman, R. P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A. P., Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J., et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med*. 2008;168(15):1617-24.

19. Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518(7538):197-206.
20. Després, J. P. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition*. 1993;9(5):452-9.
21. Stromsdorfer, K. L., Yamaguchi, S., Yoon, M. J., Moseley, A. C., Franczyk, M. P., Kelly, S. C., et al. NAMPT-Mediated NAD(+) Biosynthesis in Adipocytes Regulates Adipose Tissue Function and Multi-organ Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Rep*. 2016;16(7):1851-60.
22. Xia, N., Horke, S., Habermeier, A., Closs, E. I., Reifenberg, G., Gericke, A., et al. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(1):78-85.
23. Künstle, G., Laine, J., Pierron, G., Kagami Si, S., Nakajima, H., Hoh, F., et al. Identification of Akt association and oligomerization domains of the Akt kinase coactivator TCL1. *Mol Cell Biol*. 2002;22(5):1513-25.
24. Förstermann, U. Pharmakologie des kardiovaskulären Systems - die Blutgefäße - Behandlung von Hypertonie und Hypotonie. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 122017. p. 403-38.
25. Laroux, F. S., Pavlick, K. P., Hines, I. N., Kawachi, S., Harada, H., Bharwani, S., et al. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*. 2001;173(1):113-8.
26. Michell, B. J., Griffiths, J. E., Mitchelhill, K. I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol*. 1999;9(15):845-8.
27. Förstermann, U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem*. 2006;387(12):1521-33.
28. Brandes, R., Busse, R. Das Endothel. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen mit Pathphysiologie*. 31 ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p. 600-6.
29. Corson, M. A., James, N. L., Latta, S. E., Nerem, R. M., Berk, B. C., Harrison, D. G. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 1996;79(5):984-91.
30. Heiss, E. H., Dirsch, V. M. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3503-13.
31. Dudzinski, D. M., Michel, T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res*. 2007;75(2):247-60.
32. Förstermann, U., Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
33. Lee, D. E., Kehlenbrink, S., Lee, H., Hawkins, M., Yudkin, J. S. Getting the message across: mechanisms of physiological cross talk by adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(6):E1210-29.
34. Pudlo, M., Demougeot, C., Girard-Thernier, C. Arginase Inhibitors: A Rational Approach Over One Century. *Med Res Rev*. 2017;37(3):475-513.
35. Gao, Y. J., Lu, C., Su, L. Y., Sharma, A. M., Lee, R. M. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol*. 2007;151(3):323-31.
36. Galic, S., Oakhill, J. S., Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316(2):129-39.
37. Ketonen, J., Shi, J., Martonen, E., Mervaala, E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circulation Journal*. 2010;74(7):1479-87.

38. Gálvez-Prieto, B., Bolbrinker, J., Stucchi, P., de Las Heras, A. I., Merino, B., Arribas, S., et al. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol.* 2008;197(1):55-64.
39. Szasz, T., Webb, R. C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(1):1-12.
40. Hausman, G. J., Campion, D. R., Martin, R. J. Search for the adipocyte precursor cell and factors that promote its differentiation. *J Lipid Res.* 1980;21(6):657-70.
41. Bays, H. E. Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(25):2461-73.
42. Soltis, E. E., Cassis, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A.* 1991;13(2):277-96.
43. Almagro, T. A., Ewart, M. A., Salt, I. P., Kennedy, S. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *Br J Pharmacol.* 2014;171(3):595-617.
44. Trayhurn, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand.* 2005;184(4):285-93.
45. Gollasch, M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol.* 2012;165(3):633-42.
46. Soliman, G. A. The integral role of mTOR in lipid metabolism. *Cell Cycle.* 2011;10(6):861-2.
47. Oh, W. J., Jacinto, E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle.* 2011;10(14):2305-16.
48. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307(5712):1098-101.
49. Bhattacharya, I., Dräger, K., Albert, V., Contassot, E., Damjanovic, M., Hagiwara, A., et al. Rictor in perivascular adipose tissue controls vascular function by regulating inflammatory molecule expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(9):2105-11.
50. Mirdamadi, Y., Bommhardt, U., Goihl, A., Guttek, K., Zouboulis, C. C., Quist, S., et al. Insulin and Insulin-like growth factor-1 can activate the phosphoinositide-3-kinase /Akt/FoxO1 pathway in T cells in vitro. *Dermatoendocrinol.* 2017;9(1):e1356518.
51. Ando, H., Yanagihara, H., Hayashi, Y., Obi, Y., Tsuruoka, S., Takamura, T., et al. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology.* 2005;146(12):5631-6.
52. Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., et al. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science.* 2009;324(5927):651-4.
53. Xia, N., Reifenberg, G., Schirra, C., Li, H. The Involvement of Sirtuin 1 Dysfunction in High-Fat Diet-Induced Vascular Dysfunction in Mice. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(3).
54. Greenstein, A. S., Khavandi, K., Withers, S. B., Sonoyama, K., Clancy, O., Jeziorska, M., et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation.* 2009;119(12):1661-70.
55. Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R. D., Greenstein, A. S., Heagerty, A. M. Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res.* 2015;52(5):299-305.
56. Viridis, A., Duranti, E., Rossi, C., Dell'Agnello, U., Santini, E., Anselmino, M., et al. Tumour necrosis factor- α participates on the endothelin-1/nitric oxide imbalance in small arteries from obese patients: role of perivascular adipose tissue. *Eur Heart J.* 2015;36(13):784-94.
57. Gao, Y. J., Takemori, K., Su, L. Y., An, W. S., Lu, C., Sharma, A. M., et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):363-73.

58. Gil-Ortega, M., Condezo-Hoyos, L., García-Prieto, C. F., Arribas, S. M., González, M. C., Aranguéz, I., et al. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2014;9(4):e95312.
59. Klop, B., Elte, J. W., Cabezas, M. C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013;5(4):1218-40.
60. Wechsler, J. G. [Obesity and lipid metabolism disorders]. *Internist (Berl)*. 1997;38(3):231-6.
61. Ashen, M. D., Blumenthal, R. S. Clinical practice. Low HDL cholesterol levels. *N Engl J Med*. 2005;353(12):1252-60.
62. Prassl, R. Human low density lipoprotein: the mystery of core lipid packing. *J Lipid Res*. 2011;52(2):187-8.
63. Helkin, A., Stein, J. J., Lin, S., Siddiqui, S., Maier, K. G., Gahtan, V. Dyslipidemia Part 1--Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vasc Endovascular Surg*. 2016;50(2):107-18.
64. Badimón, L., Vilahur, G., Padró, T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(10):1161-78.
65. Assmann, G., Gotto, A. M., Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):Ii8-14.
66. Stadler, J. T., Marsche, G. Obesity-Related Changes in High-Density Lipoprotein Metabolism and Function. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
67. Ouimet, M., Barrett, T. J., Fisher, E. A. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*. 2019;124(10):1505-18.
68. Nofer, J. R., van der Giet, M., Tölle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H. A., et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*. 2004;113(4):569-81.
69. Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., Shaul, P. W. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006;98(11):1352-64.
70. Norata, G. D., Callegari, E., Inoue, H., Catapano, A. L. HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(5):871-7.
71. Van Linthout, S., Spillmann, F., Lorenz, M., Meloni, M., Jacobs, F., Egorova, M., et al. Vascular-protective effects of high-density lipoprotein include the downregulation of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension*. 2009;53(4):682-7.
72. Panzenböck, U., Stocker, R. Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1703(2):171-81.
73. Garner, B., Waldeck, A. R., Witting, P. K., Rye, K. A., Stocker, R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem*. 1998;273(11):6088-95.
74. Calabresi, L., Franceschini, G., Sirtori, C. R., De Palma, A., Saresella, M., Ferrante, P., et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238(1):61-5.
75. Litvinov, D., Mahini, H., Garelnabi, M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci*. 2012;4(11):523-32.
76. Clemente-Postigo, M., Queipo-Ortuño, M. I., Fernandez-Garcia, D., Gomez-Huelgas, R., Tinahones, F. J., Cardona, F. Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. *PLoS One*. 2011;6(9):e24783.
77. Walton, R. G., Zhu, B., Unal, R., Spencer, M., Sunkara, M., Morris, A. J., et al. Increasing adipocyte lipoprotein lipase improves glucose metabolism in high fat diet-induced obesity. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11547-56.

78. Taskinen, M. R., Nikkilä, E. A. Lipoprotein lipase of adipose tissue and skeletal muscle in human obesity: response to glucose and to semistarvation. *Metabolism*. 1981;30(8):810-7.
79. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W., Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
80. Kosmas, C. E., Martinez, I., Sourlas, A., Bouza, K. V., Campos, F. N., Torres, V., et al. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context*. 2018;7:212525.
81. Sorrentino, S. A., Besler, C., Rohrer, L., Meyer, M., Heinrich, K., Bahlmann, F. H., et al. Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*. 2010;121(1):110-22.
82. Johannis, W., Dörner, K. Leber. In: Kohse KP, editor. *Klinische Chemie und Hämatologie*. 9 ed. Stuttgart: Thieme-Verlag; 2019. p. 477-81.
83. Neuschwander-Tetri, B. A., Caldwell, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37(5):1202-19.
84. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221-31.
85. Festi, D., Colecchia, A., Sacco, T., Bondi, M., Roda, E., Marchesini, G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev*. 2004;5(1):27-42.
86. Min, H. K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2012;15(5):665-74.
87. Arab, J. P., Karpen, S. J., Dawson, P. A., Arrese, M., Trauner, M. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology*. 2017;65(1):350-62.
88. Fernandez, N. J., Kidney, B. A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol*. 2007;36(3):223-33.
89. Cho, S. R., Lim, Y. A., Lee, W. G. Unusually high alkaline phosphatase due to intestinal isoenzyme in a healthy adult. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1274-5.
90. Kwo, P. Y., Cohen, S. M., Lim, J. K. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(1):18-35.
91. Maughan, R. J., Fallah, J., Coyle, E. F. The effects of fasting on metabolism and performance. *Br J Sports Med*. 2010;44(7):490-4.
92. Welton, S., Minty, R., O'Driscoll, T., Willms, H., Poirier, D., Madden, S., et al. Intermittent fasting and weight loss: Systematic review. *Can Fam Physician*. 2020;66(2):117-25.
93. Collier, R. Intermittent fasting: the next big weight loss fad. *Cmaj*. 2013;185(8):E321-2.
94. Collier, R. Intermittent fasting: the science of going without. *Cmaj*. 2013;185(9):E363-4.
95. Mosley, M., Spencer, M. the 5:2 fast diet 2021 [Available from: <https://thefastdiet.co.uk/how-many-calories-on-a-non-fast-day/>].
96. Harvie, M., Wright, C., Pegington, M., McMullan, D., Mitchell, E., Martin, B., et al. The effect of intermittent energy and carbohydrate restriction v. daily energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers in overweight women. *Br J Nutr*. 2013;110(8):1534-47.
97. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. Intervallfasten 2021 [Available from: <https://www.dge.de/ernaehrungspraxis/diaeten-fasten/intervallfasten/?L=0>].
98. Longo, V. D., Mattson, M. P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*. 2014;19(2):181-92.

99. Harder-Lauridsen, N. M., Rosenberg, A., Benatti, F. B., Damm, J. A., Thomsen, C., Mortensen, E. L., et al. Ramadan model of intermittent fasting for 28 d had no major effect on body composition, glucose metabolism, or cognitive functions in healthy lean men. *Nutrition*. 2017;37:92-103.
100. Zanetti, M., Gortan Cappellari, G., Burekovic, I., Barazzoni, R., Stebel, M., Guarnieri, G. Caloric restriction improves endothelial dysfunction during vascular aging: Effects on nitric oxide synthase isoforms and oxidative stress in rat aorta. *Exp Gerontol*. 2010;45(11):848-55.
101. Rippe, C., Lesniewski, L., Connell, M., LaRocca, T., Donato, A., Seals, D. Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress. *Aging Cell*. 2010;9(3):304-12.
102. Donato, A. J., Walker, A. E., Magerko, K. A., Bramwell, R. C., Black, A. D., Henson, G. D., et al. Life-long caloric restriction reduces oxidative stress and preserves nitric oxide bioavailability and function in arteries of old mice. *Aging Cell*. 2013;12(5):772-83.
103. Bussey, C. E., Withers, S. B., Aldous, R. G., Edwards, G., Heagerty, A. M. Obesity-Related Perivascular Adipose Tissue Damage Is Reversed by Sustained Weight Loss in the Rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(7):1377-85.
104. Cerqueira, F. M., Laurindo, F. R., Kowaltowski, A. J. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis. *PLoS One*. 2011;6(3):e18433.
105. Chen, D., Bruno, J., Easlou, E., Lin, S. J., Cheng, H. L., Alt, F. W., et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev*. 2008;22(13):1753-7.
106. Song, J., Ke, S. F., Zhou, C. C., Zhang, S. L., Guan, Y. F., Xu, T. Y., et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase is required for the calorie restriction-mediated improvements in oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and metabolic adaptation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69(1):44-57.
107. Caton, P. W., Kieswich, J., Yaqoob, M. M., Holness, M. J., Sugden, M. C. Metformin opposes impaired AMPK and SIRT1 function and deleterious changes in core clock protein expression in white adipose tissue of genetically-obese db/db mice. *Diabetes Obes Metab*. 2011;13(12):1097-104.
108. Mercader, J., Granados, N., Caimari, A., Oliver, P., Bonet, M. L., Palou, A. Retinol-binding protein 4 and nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin in rat obesity models. *Horm Metab Res*. 2008;40(7):467-72.
109. Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J., Imai, S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab*. 2011;14(4):528-36.
110. Wang, Y., Snel, M., Jonker, J. T., Hammer, S., Lamb, H. J., de Roos, A., et al. Prolonged caloric restriction in obese patients with type 2 diabetes mellitus decreases plasma CETP and increases apolipoprotein AI levels without improving the cholesterol efflux properties of HDL. *Diabetes Care*. 2011;34(12):2576-80.
111. Maroofi, M., Nasrollahzadeh, J. Effect of intermittent versus continuous calorie restriction on body weight and cardiometabolic risk markers in subjects with overweight or obesity and mild-to-moderate hypertriglyceridemia: a randomized trial. *Lipids Health Dis*. 2020;19(1):216.
112. Liang, K. W., Lee, W. J., Lee, I. T., Lee, W. L., Lin, S. Y., Hsu, S. L., et al. Persistent elevation of paraoxonase-1 specific enzyme activity after weight reduction in obese non-diabetic men with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2011;412(19-20):1835-41.
113. Kotani, K., Sakane, N., Sano, Y., Tsuzaki, K., Matsuoka, Y., Egawa, K., et al. Changes on the physiological lactonase activity of serum paraoxonase 1 by a diet intervention for weight loss in healthy overweight and obese women. *J Clin Biochem Nutr*. 2009;45(3):329-34.

114. Varady, K. A., Bhutani, S., Church, E. C., Klempel, M. C. Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(5):1138-43.
115. Hernáez, Á., Castañer, O., Elosua, R., Pintó, X., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., et al. Mediterranean Diet Improves High-Density Lipoprotein Function in High-Cardiovascular-Risk Individuals: A Randomized Controlled Trial. *Circulation.* 2017;135(7):633-43.
116. Klempel, M. C., Kroeger, C. M., Bhutani, S., Trepanowski, J. F., Varady, K. A. Intermittent fasting combined with calorie restriction is effective for weight loss and cardio-protection in obese women. *Nutr J.* 2012;11:98.
117. Horio, Y., Tanaka, T., Taketoshi, M., Uno, T., Wada, H. Rat cytosolic aspartate aminotransferase: regulation of its mRNA and contribution to gluconeogenesis. *J Biochem.* 1988;103(5):805-8.
118. Kostogrys, R. B., Franczyk-Żarów, M., Manterys, A., Wybrańska, I. Effect of caloric restriction on liver function in young and old ApoE/LDLr^{-/-} mice. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2018;69(1):37-43.
119. Hagopian, K., Ramsey, J. J., Weindruch, R. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Exp Gerontol.* 2003;38(3):267-78.
120. Evans, J. P., Sutton, P. A., Winiarski, B. K., Fenwick, S. W., Malik, H. Z., Vimalachandran, D., et al. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98:94-105.
121. Peters, L. L., Robledo, R. F., Bult, C. J., Churchill, G. A., Paigen, B. J., Svenson, K. L. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet.* 2007;8(1):58-69.
122. West, D. B., Boozer, C. N., Moody, D. L., Atkinson, R. L. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol.* 1992;262(6 Pt 2):R1025-32.
123. Almind, K., Kahn, C. R. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes.* 2004;53(12):3274-85.
124. Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, DeFuria, J., Jick, Z., et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes.* 2007;56(12):2910-8.
125. Heydemann, A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2902351.
126. Hariri, N., Gougeon, R., Thibault, L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res.* 2010;30(9):632-43.
127. Hariri, N., Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010;23(2):270-99.
128. Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(6):1109-17.
129. Higa, T. S., Spinola, A. V., Fonseca-Alaniz, M. H., Evangelista, F. S. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014;6(1):47-54.
130. Deacon, R. M. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nat Protoc.* 2006;1(1):122-4.
131. Kitada, K., Daub, S., Zhang, Y., Klein, J. D., Nakano, D., Pedchenko, T., et al. High salt intake reprioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation. *J Clin Invest.* 2017;127(5):1944-59.
132. Rakova, N., Kitada, K., Lerchl, K., Dahlmann, A., Birukov, A., Daub, S., et al. Increased salt consumption induces body water conservation and decreases fluid intake. *J Clin Invest.* 2017;127(5):1932-43.

133. Bankir, L., Perucca, J., Norsk, P., Bouby, N., Damgaard, M. Relationship between Sodium Intake and Water Intake: The False and the True. *Ann Nutr Metab.* 2017;70 Suppl 1:51-61.
134. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399(6736):601-5.
135. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399(6736):597-601.
136. Aguilar, D., Fernandez, M. L. Hypercholesterolemia induces adipose dysfunction in conditions of obesity and nonobesity. *Adv Nutr.* 2014;5(5):497-502.
137. Biesalski, H. K. Ernährung. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* Heidelberg: Springer Verlag; 2010. p. 829-31.

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei _____ bedanken für die gute Atmosphäre während unserer Zusammenarbeit. Sie hatten immer ein offenes Ohr für die vielen Unwägbarkeiten, die sich in den 5 Jahren immer wieder aufgetan haben. Auch für Ihre Geduld, dass Sie mir immer den Freiraum gelassen haben, mir die Arbeit im Labor und zu Hause am Computer so einzuteilen, dass ich sie mit Studium und Beruf vereinbaren konnte, möchte ich Danke sagen.

Auch bedanken möchte ich mich bei _____ für die Planung und Durchführung dieser Dissertation. Sie haben mich mit viel Geduld und hilfreichen Tipps an die Methoden des experimentellen Arbeitens herangeführt.

_____ danke ich für vor allem, dass Sie es nach 5 Jahren immer noch nicht leid war mir zu zeigen, wo ich was im Labor finde, und sie mir egal wie viel Arbeit sie hatte immer geholfen hat. Besonders danke ich Ihr für die Durchführung des Western Blots.

Liebe _____, die ständigen Inkubationszeiten an den langen Organbad-Tagen wurden durch dich zu stets amüsanten und kurzweiligen Kaffeepausen. Danke, dass du mich so oft an die Hand genommen hast und mir nicht nur die Arbeit im Labor gezeigt hast, sondern mich auch in die Tiefen der Statistik begleitet hast.

Danke an alle Freunde die als Lektoren herhalten mussten und ihre rar gesäte Freizeit geopfert haben, um diese Arbeit zu lesen und zu korrigieren. Die Belohnung wird wie immer in flüssiger Form erfolgen.

_____ gilt besonderer Dank. Du musstest mich in den vielen Stunden der Auswertung ertragen. Danke das du dich nie beschwert hast, dass du so viele Wochenenden und Abendstunden ohne mich verbringen musstest. Auch das ich in den besonders anstrengenden Phasen immer deine Unterstützung hatte, ist ein Gefühl, das ich nicht vermissen möchte.

Zum Schluss gilt der größte Dank meinen Eltern _____. Ihr habt mir nicht nur finanziell dieses Studium und die Promotion ermöglicht, sondern standet mir auch immer mit Rat und Tat in jeder Situation zur Seite. Ihr habt immer dafür gesorgt, dass ich das Ziel nicht aus den Augen verliere und habt mir immer wieder Energie zum Weitermachen gegeben.

9 Tabellarischer Lebenslauf