



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Der Einfluss von Bilirubin auf den Fettstoffwechsel in
C2C12 Muskelzellen“

verfasst von / submitted by

Yvonne Hirtl, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2018 / Vienna 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner

"Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir."

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Bereitstellung dieses Masterarbeitsthemas und die nette und hilfreiche Betreuung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Mag. Claudia Lang, MSc. für die großartige Unterstützung und Betreuung, von der Einschulung im Labor, über die Durchführung bis hin zur Datenauswertung und zum Verfassen dieser Arbeit.

Weiters möchte ich mich bei meinen Freunden und Studienkollegen bedanken, mit denen ich gemeinsam durchs Studium gegangen bin.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund Martin. Sie sind mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ohne ihre seelische und finanzielle Unterstützung wäre das Studium nicht möglich gewesen. Danke

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungen	VII
1. Einleitung und Hypothese	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1. Bilirubin.....	2
2.1.1. Bilirubinmetabolismus.....	2
2.2. Gilbert's Syndrom (GS).....	3
2.3. Fettstoffwechsel.....	4
3. Materialien und Methoden	5
3.1. Materialien und Geräte	5
3.1.1. Materialien	5
3.1.2. Geräte, Utensilien.....	6
3.2. Zellkultur.....	7
3.2.1. Zelllinie	7
3.2.2. Routine Zellkultur.....	8
3.2.3. Einfrieren und Lagerung der Zellen.....	9
3.2.4. Auftauen von Zellen.....	10
3.2.5. Herstellung der Behandlungen	10
3.3. MTT-Test.....	12
3.3.1. Protokoll MTT-Test.....	13
3.4. Nilrot-Assay (NR-Assay).....	14
3.4.1. Protokoll Nilrot-Assay	14
3.5. Proteinquantifizierung	16
3.5.1. Kristallviolett-Färbung.....	16
3.5.2. Höchstfärbung	16
3.5.3. Bradford-Assay.....	17

3.6.	Statistische Auswertung.....	20
4.	Resultate	21
4.1.	MTT-Test.....	21
4.1.1.	Ergebnisse MTT-Test nach Behandlung mit Glukose	21
4.1.2.	Ergebnisse MTT-Test nach Behandlung ohne Glukose	23
4.1.3.	Ergebnisse MTT-Test nach Behandlung Normoglukose	24
4.2.	NR-Assay und Bradford.....	25
4.2.1.	Ergebnisse nach Behandlung mit Glukose.....	25
4.2.2.	Ergebnisse nach Behandlung ohne Glukose	27
4.2.3.	Ergebnisse nach Normoglukose-Behandlung	29
4.3.	Bradford-Assay	30
4.3.1.	Vergleich der Behandlungen.....	30
4.4.	Konfokalmikroskopie.....	32
5.	Methodenvalidierung.....	35
5.1.	Methodenvalidierung MTT	35
5.2.	Methodenvalidierung NR	37
5.2.1.	Wellenlänge.....	37
5.2.2.	NR Inkubationszeiten.....	40
5.2.1.	NR Konzentrationen	42
5.2.2.	Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung	43
5.2.3.	Top vs. Bottom Reading	43
5.2.4.	Art der 96 Lochplatte – µClear Schwarz oder Transparent.....	44
5.2.5.	Verwendung von Formaldehyd	45
5.2.6.	Anzahl der Messungen pro Well	47
5.2.7.	Konzentrationen der Behandlungen.....	48
5.2.8.	Vorinkubationsexperiment	49
5.2.1.	Fluoreszenzmessung bei 60% bzw. 90% Gain	52
6.	Diskussion und Schlussfolgerung	54

6.1. Weiterer Forschungsbedarf	56
7. Zusammenfassung	57
8. Abstract	59
9. Referenzen	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur von Bilirubin.....	2
Abbildung 2:	Der Abbauweg von Häm zu Urobilinogen über Biliverdin und Bilirubin	3
Abbildung 3:	C2C12 Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit der Negativkontrolle BSA/DMSO.....	8
Abbildung 4:	Reduktion von MTT zu Formazan	12
Abbildung 5:	Chemische Struktur von NR.....	14
Abbildung 6:	Darstellung der verwendeten Standardgerade zur Berechnung der Proteingehalte mittels der gemessenen Absorptionswerte	19
Abbildung 7:	Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach 24 Stunden Behandlung mit FFS, UKB und Glukose (4,5g/L)	21
Abbildung 8:	Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach 12 Stunden Behandlung mit FFS, UKB ohne Glukose	23
Abbildung 9:	Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach 12 Stunden Behandlung mit FFS, UKB und Normoglukose (0,09g/100mL)	24
Abbildung 10:	NR-Fluoreszenz pro mg Protein nach Behandlung mit FFS, UKB und Glukose (4,5g/L)	25
Abbildung 11:	NR-Fluoreszenz pro mg Protein nach Behandlung mit FFS, UKB ohne Glukose.	27
Abbildung 12:	NR-Fluoreszenz nach einer Normoglukose-Behandlung mit FFS und UKB	29
Abbildung 13:	Vergleich der Proteingehalte nach 5 Stunden Behandlung mit Glukose, ohne Glukose oder Normoglukose.....	31
Abbildung 14:	Zellen nach 24 Stunden Behandlung ohne Fett, mit Glukose und ohne bzw. mit 17,1µM UKB, durchgeführt mittels Konfokalmikroskopie	33

Abbildung 15: Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit 1mM FFS, mit Glukose und ohne bzw. mit 17,1µM UKB, durchgeführt mittels Konfokalmikroskopie	33
Abbildung 16: Wellenlänge der Absorption von MTT und gebildeten Formazankristallen	35
Abbildung 17: Vergleich der Messwellenlängen zur Ermittlung der Zellviabilität	36
Abbildung 18: Vergleich der Wellenlängen mit welcher die NR-Fluoreszenz gemessen wurde.....	38
Abbildung 19: λ-Scan eines mit NR gefärbten Fetttröpfchen, mittels Konfokalmikroskopie durchgeführt.....	39
Abbildung 20: Vergleich von 15 Minuten und 4 Stunden Inkubation mit NR (3,3µg NR/mL PBS).....	40
Abbildung 21: Vergleich von 2 und 4 Stunden Inkubation mit NR.....	41
Abbildung 22: Vergleich von 2 NR-Konzentrationen	42
Abbildung 23: Vergleich der NR-Fluoreszenz bei der Verwendung von transparenten bzw. schwarzen µClear 96 Lochplatten.....	44
Abbildung 24: Vergleich der NR-Fluoreszenz von Zellen mit bzw. ohne Behandlung von Formaldehyd.....	46
Abbildung 25: Vergleich der Messungen pro Well bei der Bestimmung der NR-Fluoreszenz	47
Abbildung 26: Vergleich aller für 24 Stunden getesteten Behandlungen	48
Abbildung 27: NR-Fluoreszenz nach 1 Stunde Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB und anschließender Behandlung mit FFS ...	50
Abbildung 28: NR-Fluoreszenz nach 24 Stunden Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB und anschließender Behandlung mit FFS ...	51
Abbildung 29: Vergleich der Messung bei 60% bzw. 90% Gain nach 24 Stunden Inkubation mit der Behandlung	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Physiologische Konzentration von FFS im Blutplasma.....	10
Tabelle 2:	Pipettierschema für Well-Platten zur Erstellung der Protein-Standardgerade.	18
Tabelle 3:	Vergleich der Proteinmenge (Mittelwerte der Proteine in mg/mL) nach 12 Stunden Behandlung.....	32

Abkürzungen

BLVRA Biliverdinreduktase

BSA Rinderserumalbumin

Diff.Medium Differenzierungsmedium

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM ns nicht supplementiertes DMEM

DMEM suppl. supplementiertes DMEM

DMEM sws supplementiertes DMEM ohne Serum

DMSO Dimethylsulfoxid

ER Endoplasmatisches Retikulum

FABP1 Fettsäurebindendes Protein

FBS Fetales Kälberserum

FFS freie Fettsäure

FS Fettsäure

GS Gilbert's Syndrom

GST B Glutathion-S-Transferase

Hb Hämoglobin

HDL High-Density Lipoprotein

HMOX 1/2 Hämoxygenase

HS Pferdeserum

LA Linolsäure

LDL Low-Density Lipoprotein

MTT (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NADH Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NR Nilrot

OA Ölsäure

P/S Penicillin, Streptomycin

PA Palmitinsäure

PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

UKB unkonjugiertes Bilirubin

Rcf Relative Zentrifugalkraft

TAG Triacylglycerid

UGT1A1 UDP-Glucuronosyltransferase 1A1

VLDL Very-Low-Density Lipoprotein

1. Einleitung und Hypothese

Die vorliegende Masterarbeit befasst sich mit der Frage, ob Bilirubin einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat und wie es sich auf die Fettakkumulation in Zellen auswirken kann.

Bilirubin ist ein Abbauprodukt von Häm, welches über mehrere Ab- und Umbauschritte über den Fäzes ausgeschieden werden kann. Hat man das sogenannte Gilbert Syndrom (GS, siehe auch Kapitel 2.2), so funktionieren nicht alle dieser Abbaupfade optimal, Bilirubin kann nicht in derselben Menge wie bei Personen ohne GS glucuronidiert und ausgeschieden werden. Es kommt daher zu einer Anreicherung von unkonjugiertem Bilirubin (UKB) im Blut. Bei GS handelt es sich um eine milde Form der Hyperbilirubinämie mit einer Blutkonzentration von $\geq 17,1 \mu\text{M}$ UKB (Wagner et al., 2015).

Es konnte beobachtet werden, dass in der Personengruppe mit GS u.a. sowohl der BMI als auch der Triglyceridstatus signifikant niedriger ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (Personen ohne erhöhten UKB-Spiegel im Blut) (Wagner et al., 2015, Seyed-Khoei et al., 2017).

Um herauszufinden, ob Bilirubin einen spezifischen Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Bilirubin auf die zelluläre Lipidaufnahme bzw. den Lipidstoffwechsel im Zellversuch an C2C12 Muskelzellen untersucht. Muskelzellen sind metabolisch sehr aktiv und können überschüssiges Fett in Form von Lipidtröpfchen speichern (Morales et al., 2017). Aus diesem Grund wurde die Hypothese an C2C12 Maus-Muskelzellen getestet.

Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob UKB einen Einfluss auf die Fettaufnahme und den Fettstoffwechsel in C2C12 Zellen hat. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Inkubationszeiten und Konzentrationen von freien Fettsäuren (FFS) und UKB auf ihre Zelltoxizität und ihren Einfluss auf den Lipidstoffwechsel von C2C12-Zellen untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Validierung eines fluoreszenz-basierten Assays zur quantitativen Ermittlung der zellulären Lipidaufnahme und – Verwertung in C2C12-Zellen.

Die Hypothesen der Arbeit waren 1. Bilirubin erhöht die Aufnahme von Triglyceriden in metabolisch aktive Zellen und 2. Bilirubin steigert die Energiegewinnung über Triglyceride.

2. Literaturübersicht

2.1. Bilirubin

Bilirubin ist ein gelber Gallenfarbstoff, welcher in der Leber produziert und in der Gallenblase gespeichert wird und dabei hilft, Fette zu verdauen. Bilirubin ist das Endprodukt eines physiologischen Katabolismus, welcher nur in Säugetieren auftritt. Im Menschen liegt Bilirubin hauptsächlich unkonjugiert vor, es ist also nicht an Glucuronsäuren gebunden. Um im Körper transportiert werden zu können, wird Bilirubin an das Protein Albumin gebunden (Heirwegh et al., 1989).

Bilirubin ist bekannt für sein hohes antioxidatives Potential, wobei es bei Anwesenheit von Sauerstoff oder direkten Lichteinfall zu einer Autooxidation bzw. zur Bildung von Oxidationsprodukten kommen kann (Vitek et al., 2009).

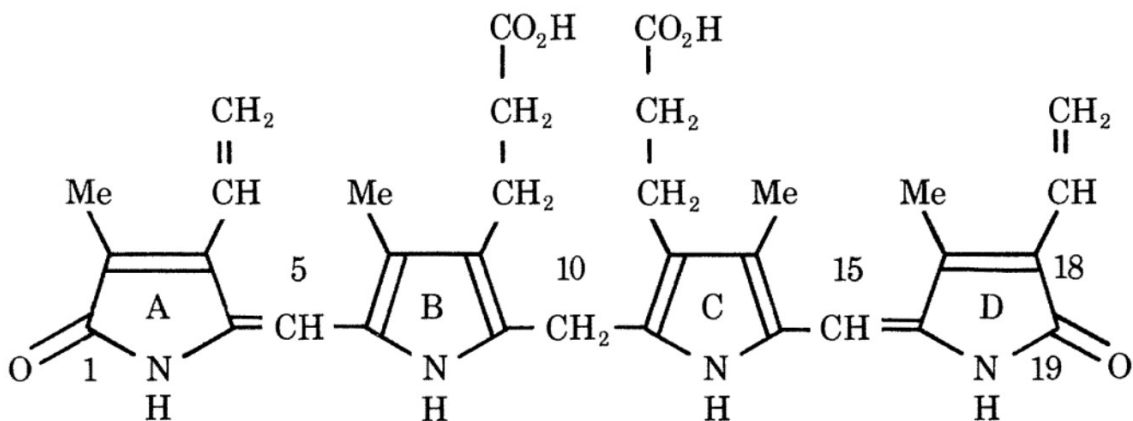


Abbildung 1: Struktur von Bilirubin
Bilirubin ist ein Tetrapyrrol, welches ein wichtiges Abbauprodukt von Häm ist (Bonnett et al. 1978)

2.1.1. Bilirubinmetabolismus

Unter der katalytischen Aktivität von mehreren Enzymen wird Häm über einige Zwischenschritte zu Bilirubin metabolisiert (Wagner et al, 2015).

In Milzmakrophagen wird Hämoglobin aus alternden roten Blutkörperchen und nicht-erythroiden Hämproteinen freigesetzt. Dies sind die Hauptquellen des Häms, welches für die Produktion von Gallenpigmenten verfügbar ist. Häm wird oxidativ durch das Enzym Hämoxygenase 1/2 (HMOX 1/2) abgebaut. Bei dieser Reaktion entsteht Kohlenstoffmonoxid, Eisen und Biliverdin. Der grüne Farbstoff Biliverdin wird durch das Enzym Biliverdinreduktase (BLVRA), welches im Cytosol der meisten eukariotischen Zellen exprimiert wird, zu Bilirubin reduziert. UKB ist schlecht wasserlöslich und wird deshalb an Albumin gebunden, um in die Hepatozyten transportiert werden zu können.

Anschließend wird Bilirubin zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch Glutathion-S-Transferase (GST B), Ligandin (Protein Y) oder durch das Fettsäurebindende Proteine (FABP1) transportiert, in welchem durch UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) Bilirubin Glucuronide gebildet werden. Durch die intestinale Mikroflora werden Bilirubin Glucuronide durch Dekonjugation bzw. Reduktion zu Urobilinogen abgebaut, welches hauptsächlich über den Fäces ausgeschieden wird (Wagner et al, 2015).

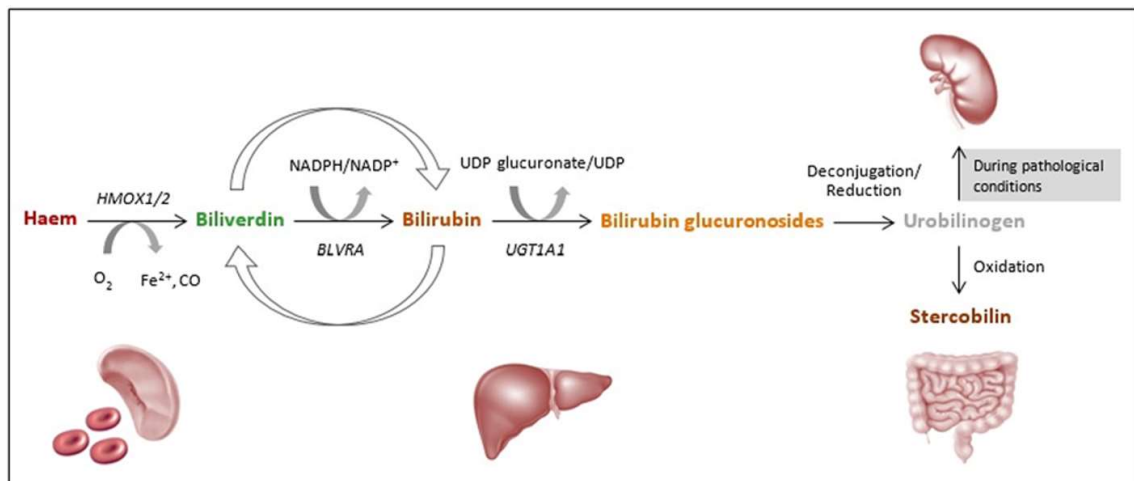


Abbildung 2: Der Abbauweg von Häm zu Urobilinogen über Biliverdin und Bilirubin
Häm wird über Biliverdin zu Bilirubin abgebaut. In der Leber wird Bilirubin mit Hilfe von UGT1A1 konjugiert um die Ausscheidung zu ermöglichen (Wagner et al. 2015).

2.2. Gilbert's Syndrom (GS)

Das GS ist durch eine leicht erhöhte Bilirubin-Konzentration im Blut charakterisiert. Der Bilirubinspiegel liegt in einem Bereich von $17,1\mu M$ bis etwa $85\mu M$ (Bulmer et al., 2012, Chowdhury et al., 2009).

Ursache für die moderate Erhöhung der UKB-Konzentrationen im Blut ist eine Mutation des UGT1A1-Promoters. Diese Variation führt zu einer geringeren UGT1A1 Enzymfunktion (etwa 30% des Normalwertes), was wiederum zu einer verminderten Konjugation von Bilirubin an Albumin führt und somit die Ausscheidung verhindert (Mölzer et al., 2016, Chowdhury et al., 2009).

Bei einer Fall-Kontroll-Studie mit insgesamt 120 Teilnehmern (60 mit GS und 60 ohne GS) konnte gezeigt werden, dass die Teilnehmer mit GS einen signifikant erniedrigten BMI und signifikant niedrigere Triglyceridwerte verglichen mit der Kontrollgruppe aufweisen (Mölzer et al., 2016).

2.3. Fettstoffwechsel

Im menschlichen Blut liegen gesättigte Fettsäuren (FS), ungesättigte FS und mehrfach ungesättigte FS im Verhältnis 2:1:2 vor. Den größten Anteil an gesättigten FS trägt die Palmitinsäure (PA). Bei den einfach ungesättigten FS entspricht dem größten Anteil Ölsäure (OA) und Linolsäure (LA) hält den größten Anteil der mehrfach ungesättigten FS. Die Gesamtkonzentration an FFS im Plasma liegt bei 0,35 – 0,75mM (Hodson et al., 2008; de Almeida et al., 2002).

Diese physiologischen Verhältnisse bilden die Basis für die gewählten FFS und deren Konzentrationen der Behandlungen für die C2C12 Zellen in unserem Experiment.

Cholesterin und Triglyceride sind wasserunlöslich. Deshalb werden sie im Blut an Proteinen gebunden und in Form von Lipoproteinen transportiert. Triglyceride und Cholesterinester bilden den Kern der Lipoproteine. Deren Hülle wird aus unverestertes Cholesterin und Phospholipide gebildet. Lipoproteine können in 4 Hauptklassen eingeteilt werden: Chylomikronen, Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL), Low-Density Lipoproteine (LDL) und High-Density Lipoproteine (HDL) (Zyriax et al., 2010, Horn, 2009).

Triglyceride und Cholesterin werden aus dem Darm in Chylomikronen über die Lymphe der Pfortader zugeführt. Ein Großteil der Triglyceride wird im Blut hydrolisiert und die freigesetzten Fettsäuren in die Muskulatur und das Fettgewebe aufgenommen (Zyriax et al., 2010, Horn, 2009).

FFS werden mit Hilfe von Transportproteinen (zum Beispiel FFS-bindende Proteine) in die Zellen aufgenommen (Morales et al., 2017).

Sobald die freien Fettsäuren (FFS) in die Zelle aufgenommen wurden, sind sie Teil der Triacylglycerid (TAG) Synthese oder sie werden als Lipidtröpfchen gespeichert, wenn die FFS-Aufnahme die Kapazität des Metabolismus überschreitet (Morales et al., 2017). Diese gespeicherten Lipidtröpfchen sind der Mittelpunkt der Experimente, da diese durch Färbung mit Nilrot (NR) messbar gemacht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Materialien

- **(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid** MTT, >98%, Produktcode: M2128 (Sigma-Aldrich)
- **Accutase Lösung:** steril filtriert, geeignet für Zellkultur, Produktcode: A6964 (Sigma-Aldrich)
- **Bilirubin** >98%, Pulver, Produktcode: B412 (Sigma-Aldrich)
- **Bradford Reagenz** für 0,1 – 1,4mg/mL Protein, Produktcode: B6916 (Sigma-Aldrich Life Science, Deutschland)
- **C2C12 Zellen** ATCC-CRL-1772 (LGC Standards)
- **Dimethylsulfoxid**, Produktcode: D8418 (Sigma-Aldrich)
- **Dulbecco's Phosphate Buffered Saline** modifiziert, ohne Calciumchlorid und Magnesiumchlorid, flüssig, steril filtriert, geeignet für Zellkultur, Produktcode: D8537 (Sigma-Aldrich)
- **Dulbecco's Modified Eagle's Medium** mit 4500mg/L Glukose und Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin, Natriumpyruvat und Phenolrot, steril filtriert, geeignet für Zellkultur, DMEM, Produktcode: D1145 (Sigma-Aldrich)
- **Dulbecco's Modified Eagle's Medium Pulver** ohne Glukose, L-Glutamin, Phenolrot, Natriumpyruvat und Natriumbicarbonat, Pulver, geeignet für Zellkultur, DMEM powder Produktcode: D5030 (Sigma-Aldrich)
- **Fetales Kälberserum** Fetal Bovine Serum, FBS Produktcode: 10270 (Gibco)
- **Formaldehyd** 36,5% Produktcode: F1635 (Sigma-Aldrich)
- **Glukose** D-Glukose, Produktcode: D8270 (Sigma-Aldrich)
- **Höchst Farblösung** Produktcode: H6024 (Sigma-Aldrich)
- **Kristallviolett:** Produktcode: C3886 (Sigma-Aldrich)
- **L-Glutamin** 200mM, Lösung, steril filtriert, BioXtra, geeignet für Zellkultur, Produktcode: G7513 (Sigma-Aldrich)
- **Linolsäurenatriumsalz** >98% (GC), Produktnummer: L8134 (Sigma-Aldrich)
- **Natriumhydroxid** 98 – 100,5%, Pellets, Produktcode: 06203-M (Sigma-Aldrich)
- **Natriumoleat** ≥99%, Produktcode: O7501 (Sigma-Aldrich)
- **Natriumpalmetat** ≥98,5%, Produktcode: P9767 (Sigma-Aldrich)
- **Nilrot** zum Mikroskopieren, Produktcode: 72485 (Sigma-Aldrich)

- **Penicillin-Streptomycin** mit 10000 Einheiten Penicillin und 10mg Streptomycin pro mL in 0,9% NaCL, steril filtriert, BioReagent, geeignet für Zellkultur, Produktcode: P0781 (Sigma-Aldrich)
- **Pferdeserum**, Fetal Bovine Serum, FBS, Produktcode: 10500-056 (Gibco)
- **Rinderserumalbumin** Bovines Serum Albumin, BSA Albumin, Fraction V Fatty Acid Free Roche 10775835001
- **Trypanblau** 0,4% für die Verwendung von Countess (Automatischer Zellzähler), Produktcode: T10282 (Life Technologies)

3.1.2. Geräte, Utensilien

- **96 Lochplatte** µClear Schwarz, Greiner
- **96 Lochplatte** Transparent, VWR
- **Inkubator** Heraeus Instrument Function Line
- **Laminar** Bioair Safemate 1.8
- **Magnetrührer** Heidolph MR 3001 K
- **Mikroskop** Hund Wetzlar Wilovert S
- **Multikanalpipette** 100 – 300µL Biohit Proline Plus
- **Multikanalpipette** 5 – 100µL Sartorius
- **Multikanalpipette** 50 – 300µL Biohit Proline
- **Objektträger** Luna Cell Counting Slides
- **pH-Meter** Metrohm 827 pH lab
- **Pipette** 0,1 – 1mL Biohit Proline
- **Pipette** 0,5 – 10µL Accumax Pro
- **Pipette** 1 - 5mL Biohit Proline
- **Pipette** 20 – 200µL Biohit Proline
- **Plate Reader** Fluostar Optima
- **Reagenzröhrchen** 15mL Braun VWR Centrifuge Tube
- **Reagenzröhrchen** 15mL transparent VWR Centrifuge Tube
- **Reagenzröhrchen** 50mL VWR Centrifuge Tube
- **Schüttelwasserbad** GFL 1086
- **Schüttler** Ika Labortechnik KS 125 Basic
- **Vakuumpumpe** Membranvakuumpumpe Bartelt
- **Vortex** Heidolph Reax 2000
- **Waage** Mettler Toledo XSE 205 Dual Range
- **Wasserbad** GFL 1002

- **Zellkulturflaschen** 75cm² Cellstar Cell Culture Flasks
- **Zellzähler** Luna Dual Fluorescence Cell Counter
- **Zentrifuge** Eppendorf Centrifuge 5417 R
- **Zentrifuge** Heraeus Megafuge 1.0 R Centrifuge

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zelllinie

Die verwendete Zelllinie C2C12 (ATCC CRL-1772) sind Muskelzellen von adulten Mäusen (Yaffe et al, 1977). C2C12 Zellen sind adhärente Myoblasten (Vorläuferzelle der Skelettmuskelfaser) mit einer Verdopplungszeit von etwa 12 Stunden (McMahon et al., 1994). Die C2C12 Myoblasten differenzieren bei Konfluenz von mindestens 90 – 100% in einem nährstoffarmen Medium (2% Pferdeserum (HS) statt 10% Kalbsserum (FBS)) zu kontraktilen, multinukleären Myotubes, welche charakteristische Muskelproteine produzieren. Erste Anzeichen der Fusion zu multinukleären Myotubes zeigen sich nach 24 – 48 Stunden Inkubation mit dem Differenzierungsmedium (Diff.Medium), eindeutig sichtbar werden die Myotubes nach 5 – 8 Tagen Inkubation (ATCC Product Sheet C2C12; Hirabara et al., 2010; McMahon et al., 1994).

Die Energiegewinnung dieser Zellen findet weitgehend durch Glukose und Fettsäuren (FS) statt. Nur metabolisch aktive Zellen verfügen über die Fähigkeit FFS aufzunehmen und als Lipidtröpfchen zu speichern. Da Muskelzellen metabolisch sehr aktiv sind eignen sie sich gut für dieses Experiment (ATCC Product Sheet C2C12).

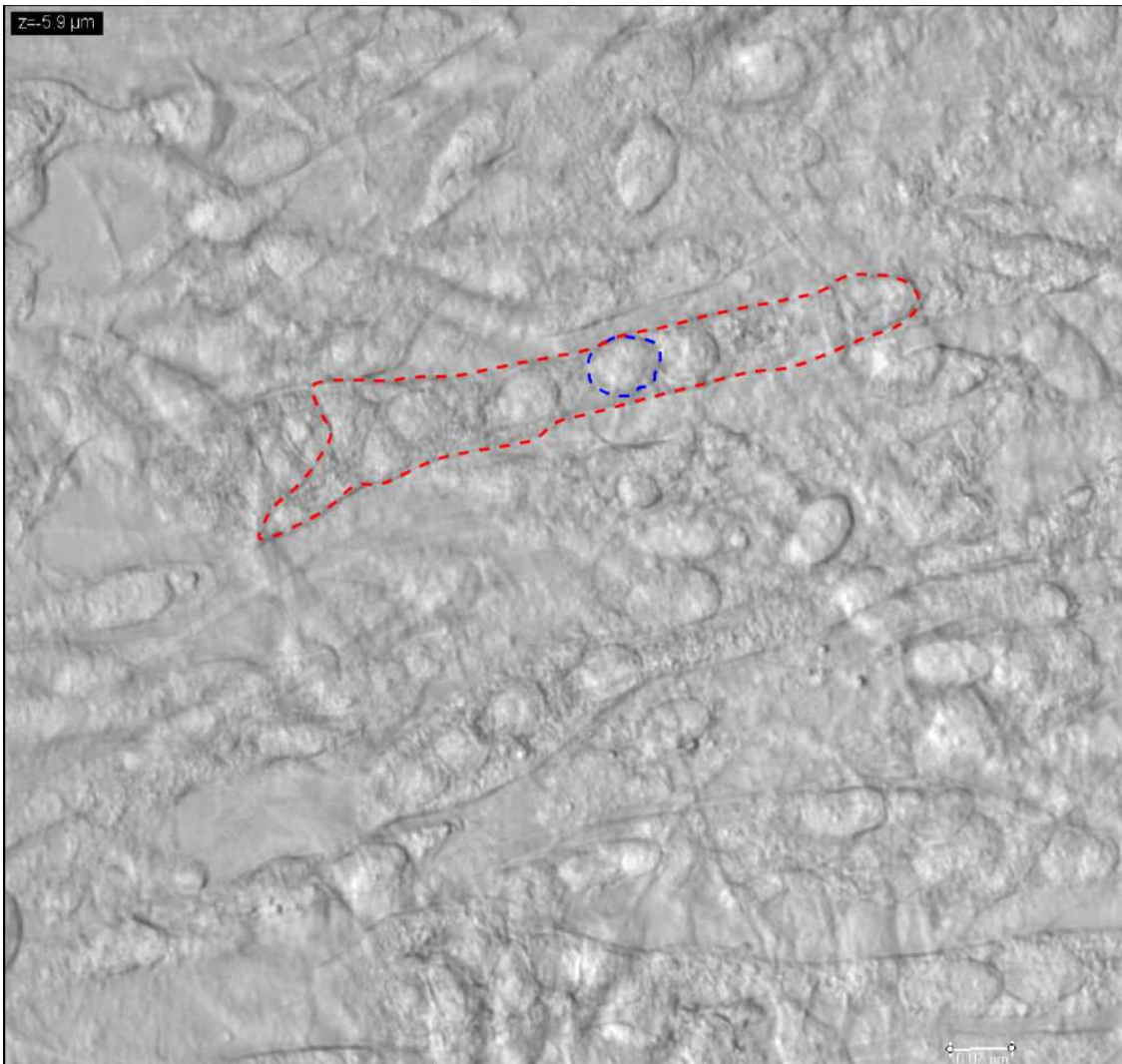


Abbildung 3: C2C12 Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit der Negativkontrolle BSA/DMSO.
 Rot markiert ist ein Myotube zu sehen, blau markiert ist ein Zellkern im Myotube, wobei in jedem Myotube mehrere Zellkerne vorhanden sind.

Abbildung 3 zeigt differenzierte C2C12 Zellen, welche 24 Stunden mit der Negativkontrolle BSA/DMSO behandelt wurden. Gut erkennbar sind die länglichen multinukleären Myotubes.

3.2.2. Routine Zellkultur

Für die Kultivierung der Zellen wurden folgende Medien benötigt und hergestellt:

1. DMEM supplementiert (DMEM suppl.): Dieses Medium wurde aus DMEM, 4mM L-Glutamin, 1% P/S und 10% FBS hergestellt und zur Zellproliferation verwendet.
2. Differenzierungsmedium (Diff.Medium): Dieses Medium wurde aus DMEM, 4mM L-Glutamin, 1% P/S und 2% FHS hergestellt und zur Differenzierung der Zellen eingesetzt.

3. DMEM supplementiert ohne Serum (DMEM sws, supplemented without serum):
Dieses Medium wurde aus DMEM, 4mM L-Glutamin und 1% P/S hergestellt. Es wurde bei der Durchführung des MTT-Tests verwendet.
4. DMEM ns: nicht supplementiertes DMEM

C2C12 Zellen wurden in einer strikten Routine verwendet. Die C2C12 Myoblasten wurden 2 Mal pro Woche mit einer Zellzahl von $0,2 \times 10^6$ bzw. $0,3 \times 10^6$ pro 10mL DMEM suppl. in 75cm² Zellkulturflaschen passagiert, wobei die Konfluenz der Zellen maximal 70 – 80% betrug. Die Proliferationszeit betrug 4 bzw. 3 Tage bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

Um die Zellen aus den Zellkulturflaschen zu lösen, wurde 3mL Accutase verwendet. Accutase ist eine Lösung aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen, welche die adhärente Bindung der Myoblasten lösen kann. Vor der Behandlung mit Accutase wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Reste der in dem Medium vorhandenen Proteine von den Zellen abzuwaschen. Um die Aktivität der Accutase nach 5 Minuten zu stoppen, wurden 6mL DMEM suppl. hinzugefügt und anschließend in ein 15mL Tube überführt und zentrifugiert (5 Minuten, 20°C, 179 rcf [Relative Zentrifugalkraft]).

Der MTT-Test, das NR-Assay und die Proteinquantifizierung wurden in 96 Well-Plates durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^4 Zellen pro Well gesät. Nach einer Proliferationszeit von 2 Tagen in den Wells und einer Konfluenz von 100% wurde das Medium in den Wells gegen das nährstoffärmere Diff.Medium getauscht, um die Umwandlung der Myoblasten zu multinukleären Myotubes zu gewährleisten (McMahon et al., 1994). Die anschließende Differenzierungsdauer betrug 6 Tage.

3.2.3. Einfrieren und Lagerung der Zellen

Zum Tiefkühlen der C2C12 Zellen, wurde ein Medium bestehend aus 90% FBS und 10% DMSO benötigt. Bei einer Konfluenz von 60 – 70% in den 75cm² Flasks (Zellkulturflasche) wurden die Zellen wie beim Passagieren aus dem Flask geerntet und die Zellzahl mittels Zellzähler (Luna Dual Fluorescence Cell Counter) bestimmt. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen tiefgekühlt, welche 1,8mL Lösung mit einer Zellzahl von insgesamt $3,6 \times 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen enthielten. Anschließend wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen für 24 Stunden bei -80°C tiefgekühlt bevor sie in Flüssigstickstoff (-196°C) überführt wurden. In Flüssigstickstoff können sie über mehrere Monate gelagert werden.

3.2.4. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der C2C12 Zellen wurde der Inhalt eines der Kryoröhrchens in 8mL DMEM suppl. (37°C) gelöst und anschließend zentrifugiert (5 Minuten, 20°C, 179 rcf). Das dadurch entstandene Zellpellet wurde wiederum in DMEM suppl. 37°C gelöst und auf 2-3 (abhängig von der Proliferationszeit) 75cm² Flasks aufgeteilt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.5. Herstellung der Behandlungen

Für die Experimente wurden die differenzierten Zellen mit FFS (0,1mM, 0,5mM und 1mM FFS), UKB (0,1µM, 1µM, 10µM und 17,1µM UKB) und AICAR (0,5mM) mit Glukose (4,5g/L), mit normoglykämischem Glukosegehalt (0,9g/L) und ohne Glukose behandelt.

Die Behandlungen für die Zellen wurden soweit wie möglich an die physiologischen Bedingungen im Blut angepasst.

Analog zu den physiologischen Konzentrationen im Blut wurde die FFS-Behandlung aus drei FS hergestellt. Palmitinsäure (PA, gesättigte FS; C16:0), Ölsäure (OA, einfach ungesättigte FS; C18:1) und Linolsäure (LA, mehrfach ungesättigte FS; C18:2) wurden im Verhältnis 2:1:2 gemixt. Diese drei FS stellen die im Blutplasma eines Menschen am häufigsten vorkommenden FS dar.

Art der FS im Plasma	Konzentration der FS im Plasma	Verhältnis der FS	FFS im Plasma	Häufigste FS bei Menschen
gesättigte FS	42,40%*	2	0,35 - 0,75mM	PA (C16:0)
einfach ungesättigte FS	17,10%*	1		OA (C18:1)
mehrfach ungesättigte FS	40,60%*	2		LA (C18:2)

*Tabelle 1: Physiologische Konzentration von FFS im Blutplasma
Hodson et al., 2008; de Almeida et al., 2002, *nicht veröffentlichte Daten*

In Tabelle 1 sind die physiologischen Konzentrationen von FFS im Blutplasma gezeigt, auf welchen die Erstellung der Behandlungen für die Zellen basiert.

Um diese Behandlungen für die Zellen herstellen zu können, wurden vier Vorlösungen erstellt. Als Vorlösungen wurden ein BSA-Stock (0,4545mM), ein FFS-Stock (1,5mM FFS:0,4545mM BSA), ein 55 µM UKB-Stock in 0,4545mM BSA und ein DMSO-Stock

(0,275% DMSO) in 0,4545mM BSA erstellt. Aus den genannten Vorlösungen wurden die endgültigen Behandlungen in verschiedenen Konzentrationen gefertigt.

Zur Herstellung des BSA-Stocks (0,4545mM) wurde pulveriges BSA in Wasser gelöst. Um die Löslichkeit zu erhöhen, wurde die Mischung unter stetigem rühren auf 37°C mittels Magnetrührer erwärmt. Dieser BSA-Stock stellt die Basis für die 3 weiteren Vorlösungen, welche erstellt wurden, dar.

Zur Erstellung der FFS-Vorlösung wurden die drei einzelnen FS (PA, OA, LA) bei 70°C wieder unter stetigem rühren in Wasser gelöst. Nach kurzer Abkühlzeit konnten dann langsam, ebenfalls unter stetigem Rühren, die FFS an BSA bei 37°C konjugiert werden.

Da Bilirubin im Blut gebunden an Protein Albumin vorliegt, wurde für unsere Behandlung Bilirubin an BSA gebunden um auch hier die Analogie zu den physiologischen Bedingungen im menschlichen Blut gewährleisten zu können. Die Blut-Konzentration von 17,1µM UKB gilt als unterer Grenzwert für die Diagnose von GS. Die UKB Konzentration in Skelettmuskelzellen von GS ist nicht bekannt (Bulmer et al, 2012). In den folgenden Experimenten wurde eine maximale Konzentration von 17,1µM UKB zur Behandlung der C2C12 Zellen gewählt.

Da UKB nicht wasserlöslich ist, musste dieses zuvor in DMSO gelöst werden, um es anschließend an BSA konjugieren zu können. Damit UKB bei der Konjugation an BSA nicht als Kristall ausfällt, muss sowohl die Temperatur (37°C) als auch der pH-Wert (7,7 – 7,8) eingestellt werden.

Um auch in den UKB-freien Behandlungen der Zellen die gleiche Menge an DMSO gewährleisten zu können, wurde eine DMSO-Vorlösung mit der gleichen Menge an DMSO hergestellt, welche auch in der UKB Vorlösung verwendet wurde.

Der pH-Wert der Vorlösungen wurde auf 7,36 – 7,44 adjustiert, um auch hier analog zur Physiologie des Blutes zu arbeiten.

Die Behandlungen wurden mit 4,5g Glukose/L hergestellt, da C2C12 Zellen ein Medium mit dieser Glukosekonzentration benötigen (ATCC Product Sheet C2C12). Hierbei besteht die Möglichkeit, dass überschüssige Glukose in den Zellen als Fetttröpfchen gespeichert wird und die Menge der intrazellulären Fetttröpfchen ansteigt. Um dies ausschließen zu können wurden die Behandlungen zusätzlich ohne Glukose erstellt. Um anschließend die physiologische Konzentration zu testen, wurden die Experimente auch

mit normoglykämischer Behandlung mit einem Glukosegehalt von 90mg Glukose/dL durchgeführt.

3.3. MTT-Test

Der MTT-Test ist eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen (Mosmann, 1983). MTT ist ein gelbes Tetrazoliums Salz, welches von metabolisch aktiven Zellen durch Reduktion in wasserunlösliche blau-violette Formazankristalle verstoffwechselt wird (Liu et al, 1997).

In vitro werden MTT Salze, welche leicht in die Zelle aufgenommen werden können, durch verschiedene intrazelluläre Reduktionsmittel reduziert und gespalten. Die Reduktion von MTT erfolgt über mitochondriale und nicht-mitochondriale Oxidoreduktasen.

Dehydrogenasen und deren Coenzyme Nicotinamadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) sowie deren mitochondrialen Substrate wie Succinat, Pyruvat, Malat oder Glutamat stellen die wesentlichen Bestandteile der MTT Reduktion dar. Jedoch sind detaillierte Mechanismen der MTT Reduktion noch nicht eindeutig identifiziert (Berridge et al., 2005, Liu et al., 1997).

A

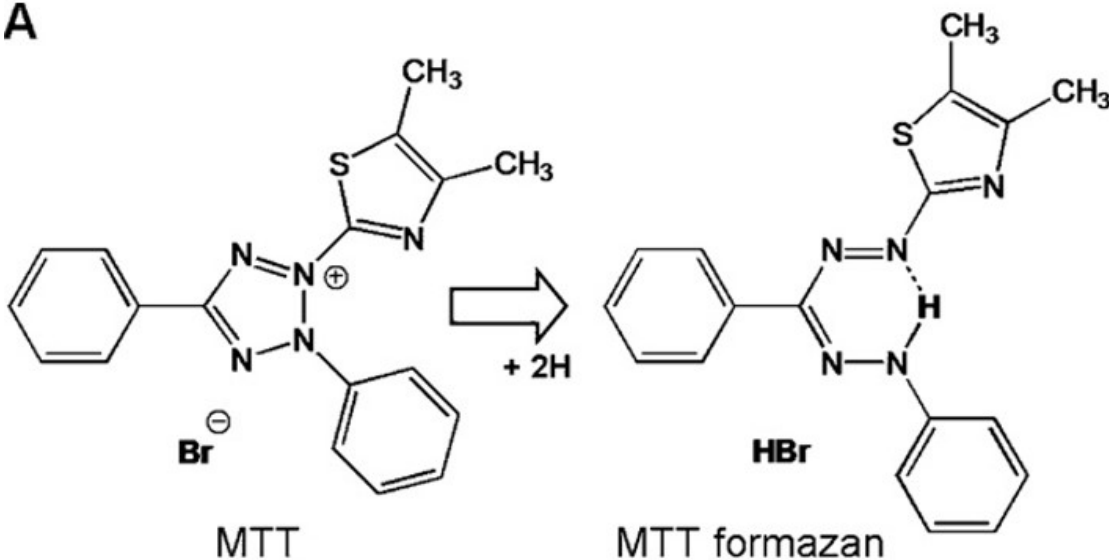


Abbildung 4: Reduktion von MTT zu Formazan
Beschreibung der Reduktion von MTT zu MTT Formazan (Stockert et al., 2012).

Abbildung 4 beschreibt die Reduktion von MTT (gelbes Tetrazoliums Salz) zu blau-violetten Formazankristallen (MTT Formazan).

Die reduzierten Formazankristalle können in DMSO gelöst werden, was eine Messung der Extinktion ermöglicht. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen. Sind keine metabolisch aktiven Zellen vorhanden, kann MTT nicht reduziert werden und somit bilden sich keine blau-violetten Kristalle (Berridge et al., 2005, Slater et al., 1963).

3.3.1. Protokoll MTT-Test

Für die Durchführung des MTT-Tests wurden 96 Lochplatten mit 10.000 Zellen (in 200µL DMEM suppl.) pro Well verwendet. Die Zellen wurden in den Wells 2 Tage proliferiert und anschließend 6 Tage differenziert.

Alle Arbeitsschritte des MTT-Tests wurden steril durchgeführt.

Die Zellen wurden in 96 Wells überführt, jedoch wurden zu weiteren Durchführungen nur die inneren 60 Wells verwendet. Pro Platte gab es eine Negativkontrolle (BSA/DMSO) und eine Positivkontrolle (20% DMSO in BSA). Für die Positivkontrolle wurden 20% DMSO mit der 0,4545mM BSA-Vorlösung vermengt. Die Zellen in den äußeren Wells wurden mit DMEM sws (200µL pro Well) behandelt. Die Zellen in den inneren 60 Wells wurden für 24 Stunden (Behandlung mit Glukose) bzw. 12 Stunden (Behandlung ohne Glukose und Normoglukose) inkubiert. Die Konzentrationen von freien Fettsäuren (FFS) und Bilirubin betrugen 0,1mM, 0,5mM und 1mM FFS und 0,1µM, 1µM, 10µM, 17,1µM und 55µM Bilirubin sowie die Kombination dieser Konzentrationen bei der Inkubation mit Glukose. Beim Treatment ohne Glukose bzw. bei den normoglykämischen Treatments wurden die Konzentrationen 0,5mM und 1mM FFS und 17,1µM UKB getestet. Die Zellen wurden mit 200µL Treatment pro Well behandelt. Pro Behandlung und Experiment gab es 6 technische Replikate. Die Inkubation fand bei 37°C und 5% CO₂ statt.

MTT wurde in der Konzentration von 1mg MTT/mL DMEM ns gelöst und auf 37°C erwärmt. Für die Durchführung des Tests wurde das Treatment nach 24 Stunden bzw. 12 Stunden Inkubation vollständig mittels Pumpe aus den Wells abgesaugt. Anschließend wurden die behandelten Zellen 4 Stunden mit 100µL der zuvor hergestellten MTT-Lösung (1mg MTT/mL DMEM ns) inkubiert (bei 37°C, 5% CO₂). Nach dieser Inkubationszeit wurde die MTT-Lösung wieder mittels Pumpe abgesaugt und gegen 200µL DMSO ersetzt. Die Inkubationszeit mit DMSO betrug 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂. DMSO diente dazu, die entstandenen Formazankristalle zu lösen und ermöglichte somit die Messung der Absorption.

Die Absorption wurde mittels Plate Reader bei einer Wellenlänge von 485nm gemessen. Mit der gemessenen Absorption konnte anschließend die metabolische Aktivität der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet werden.

Dazu wurde der Mittelwert der 6 Absorptionswerte pro Treatment berechnet, welcher durch den Mittelwert der Negativkontrolle dividiert und in Prozent dargestellt wurde.

Zellviabilitätswerte, die unter 100% liegen zeigen an, dass die metabolische Aktivität der Zellen in der Vergleichsgruppe geringer als in der Negativkontrolle ist. Bei Werten größer als 100% ist die metabolische Aktivität in der Vergleichsgruppe höher als in der Negativkontrolle.

3.4. Nilrot-Assay (NR-Assay)

Nilrot (NR), 9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one, ist ein stark fluoreszierender Farbstoff, welcher intrazelluläre Lipidtröpfchen einfärbt und sie somit mittels Fluoreszenz messbar macht. NR ist nur schwer löslich in Wasser, jedoch gut löslich in vielen organischen Lösungsmitteln. Der Farbstoff ist in allen organischen Lösungsmitteln stark fluoreszierend. Abhängig von der Polarität der zu detektierenden Fette können die Extinktionen und Emissionen von NR in einem Bereich von 450 – 580nm (Extinktion) und 500 – 620nm (Emission) liegen, die Farbe kann somit von gelb bis dunkelrot schwanken. In diesem Experiment liegt eine dunkelrote Farbe vor.

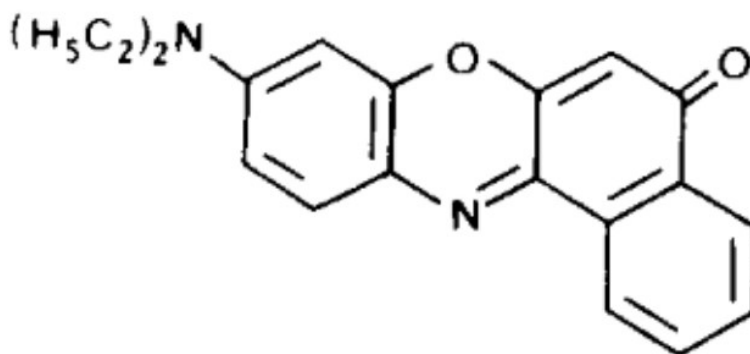


Abbildung 5: Chemische Struktur von NR
Diese Abbildung zeigt die chemische Struktur von NR (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one). NR ist ein stark fluoreszierender Farbstoff, welcher Fetttröpfchen einfärbt und mittels Fluoreszenz messbar macht (Greenspan et al., 1985).

3.4.1. Protokoll Nilrot-Assay

Zur Durchführung des NR Assays wurden in schwarzen 96 Well-Platten mit transparentem Boden (μ Clear Black Cellstar) 10.000 Zellen (200 μ L Volumen) pro Well überführt, welche 2 Tage proliferierten und 6 Tage differenzierten. Die zu Myotubes

differenzierten Myoblasten wurden anschließend für 30 Minuten, 5 Stunden, 8 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden mit Behandlungen mit bzw. ohne Glukose inkubiert. Die Myotubes wurden mit FFS und UKB in folgenden Konzentrationen behandelt: FFS 0,1mM, 0,5mM und 1mM und UKB 0,1µM, 1µM, 10µM und 17,1µM und alle Kombinationen dieser Konzentrationen bei Behandlung mit Glukose. Für die Behandlung ohne Glukose und Normoglukose wurden die Konzentrationen 0,5mM und 1mM FFS und 17,1µM UKB gewählt.

Alle Arbeitsvorgänge wurden steril durchgeführt. Da sowohl die FFS und UKB als auch NR lichtensible Stoffe sind, wurden alle Arbeitsschritte zudem so dunkel wie möglich durchgeführt (Greenspan et al., 1985, Vitek et al., 2009).

Die behandelten Zellen wurden vor dem Einfärben mit NR mit einer 3%igen Formaldehyd-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, um die metabolische Aktivität der Zellen zu stoppen und die Fettakkumulation nach Ablauf der Inkubationszeit zu fixieren. Anschließend musste die Fluoreszenz der ungefärbten, gewaschenen (einmal mit 100µL PBS) Zellen gemessen werden (Messung der Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm). Diese Hintergrund-Fluoreszenz wurde zur späteren Berechnung benötigt.

Die Färbung der Zellen wurde mit 3,3µg NR/mL PBS durchgeführt. Diese wurde aus einer Stock-Lösung von 1mg NR/mL Methanol verdünnt.

Die Stock-Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, die 3,3µg NR/mL PBS für jeden Versuch neu erstellt. Die Zellen wurden 2 Stunden (37°C, 5%CO₂) mit 100µL der 3,3 µg NR/mL PBS Lösung gefärbt. Die Farblösung wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 100µL PBS gewaschen und für 22 – 24 Stunden bei Raumtemperatur in 100µL PBS belassen.

Die Messung der Fluoreszenz wurde mit 60% Gain (bei der Methodenvvalidierung wurde testweise auch mit 90% Gain gemessen) bei einer Extinktionswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm durchgeführt. Die Gain-Adjustierung wurde bei der Behandlung mit 1mM FFS durchgeführt, da hier die höchsten Fluoreszenzwerte erwartet wurden. Gemessen wurde mit 9 Messungen pro Well (Well scan) und durch den Boden der 96 Lochplatte (Bottom reading).

Zur Berechnung der NR-Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle wurden zuerst die gemessenen Hintergrund-Fluoreszenzwerte von den gemessenen NR-

Fluoreszenzwerten nach der Färbung subtrahiert und diese Differenzen anschließend in Relation zur Negativkontrolle gesetzt.

3.5. Proteinquantifizierung

Im Anschluss an die NR-Färbung wurde die Protein-Konzentration in jedem Well bestimmt, um ausschließen zu können, dass eine gesteigerte NR-Fluoreszenz auf eine erhöhte Zellzahl in den Wells zurückzuführen ist. Die Proteinquantifizierung wurde mittels Bradford-Assay durchgeführt. Zu Vergleichszwecken wurden die Proteine auch mittels Kristallviolett-Färbung und Höchstfärbung bestimmt, um die ideale Methodik zur Proteinquantifizierung nach dem NR-Assay ermitteln zu können.

3.5.1. Kristallviolett-Färbung

Kristallviolett ist ein Farbstoff, welcher an Proteine und DNA bindet. Durch diese Färbemethode können lebende, adhärente Zellen eingefärbt werden. Sobald Zellen dem Zelltod unterliegen, verlieren sie ihre Adhärenz und können somit nicht mehr eingefärbt werden. Durch die Stärke der Färbung kann auf die Menge der lebenden Zellen in der Kultur zurückgeschlossen werden (Feoktistova et al., 2016).

3.5.1.1. *Protokoll Kristallviolett Färbung*

Für die Kristallviolett-Färbung von Zellen wurden eine färbende Kristallviolettlösung (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol und 79,5% demineralisiertes Wasser) und ein EtOH/NaCitrat-Gemisch (1:1 EtOH:0,1M NaCitrat) zum Lösen der violetten Kristalle erstellt. Die Vorgänge für die Färbung mit Kristallviolett mussten nicht steril erfolgen, da alle folgenden Inkubationen nicht mehr im sterilen Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ sondern bei Raumtemperatur stattgefunden haben.

Das verbliebene PBS der NR Färbung wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 100µL der Kristallviolettlösung 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Kristallviolettlösung abgesaugt und die Platte mit Leitungswasser gewaschen, wofür die Platte 4 Mal in einen Behälter mit Leitungswasser getaucht wurde. Das Wasser im Behälter wurde nach jeder Waschung gewechselt. Nach einer Trocknungszeit von ca. 16 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Kristallviolett mit 100µL einer EtOH/NaCitrat-Lösung pro Well gelöst. Liegt das Kristallviolett gelöst vor, kann die Absorption mittels Plate-Reader bei 540nm und 584nm gemessen werden.

3.5.2. Höchstfärbung

Höchst ist ein Bis-Benzimidazol Farbstoff, welcher in Lösung nur sehr schwach fluoreszierend ist, aber eine starke Fluoreszenz aufweist wenn er an DNA gebunden

vorliegt (Latt et al., 1975). Durch die Stärke der Fluoreszenz können somit Rückschlüsse auf die Menge der Zellen und die Proteinmenge gezogen werden.

3.5.2.1. Protokoll Höchstfärbung

Für die Durchführung der Höchstfärbung, wurde eine Farblösung von 0,5µg Höchst/mL H₂O hergestellt (Latt et al., 1975). Vor der Färbung der Zellen wurde die Hintergrund-Fluoreszenz mit der Extinktion 355nm und Emission 430nm gemessen. Die Messung wurde mittels Bottom Reading (Well scan) und 9 Messungen pro Well durchgeführt.

Nach der Messung wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 25 Minuten mit der zuvor hergestellten Höchst-Lösung, dunkel inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenz der mit Höchst eingefärbten Zellen wurde analog zur Hintergrundfluoreszenz gemessen.

3.5.3. Bradford-Assay

Die Proteinbestimmung nach Bradford gehört zu den häufigsten Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteingehalts. Das Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau an Proteine im sauren Milieu. Durch die Bindung an Proteine kommt es zu einem Farbumschlag von braun nach blau. Durch den Farbumschlag verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm (Bradford, 1976). Durch die Erstellung einer Standardgeraden mit BSA kann auf die Proteingehalte der Proben geschlossen werden.

3.5.3.1. Protokoll Bradford-Assay

Die Durchführung des Bradford Assays musste nicht steril erfolgen. Für die Durchführung dieses Assays mussten folgende Vorbereitungen getroffen werden: das Bradford Reagenz, die Well-Platte mit den behandelten Zellen und 0,05M NaOH-Lösung (0,05M NaOH in Wasser gelöst) mussten auf Raumtemperatur erwärmt werden.

Vor der Durchführung des Bradford-Tests, musste eine geeignete Protein-Standardgerade hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde BSA in steril-filtriertem Wasser in folgenden Konzentrationen gelöst: 0,1mg BSA/mL H₂O, 0,25mg BSA/mL H₂O, 0,5mg BSA/mL H₂O, 0,75mg BSA/mL H₂O und 1mg BSA/mL H₂O. Diese Standards wurden nach der Herstellung aliquotiert und konnten tiefgekühlt (-20°C) für 2 Monate verwendet werden.

Die Standardgerade wurde wie die Proben in einer schwarzen 96 Well-Platte mit transparentem Boden, welcher das Bottom Reading ermöglicht, gemessen. Es wurden 30µL der BSA-Lösungen verwendet und jede Konzentration der Standards wurde

dreifach erstellt. Als Blank für die Standards bzw. die Proben wurde steriles, demineralisiertes Wasser bzw. 0,05M NaOH verwendet.

Pipettiert wurde nach folgendem Schema:

	A	B	C
1	0,05M NaOH	0,05M NaOH	0,05M NaOH
2	Steriles Wasser	Steriles Wasser	Steriles Wasser
3	0,1mg BSA/mL H ₂ O	0,1mg BSA/mL H ₂ O	0,1mg BSA/mL H ₂ O
4	0,25mg BSA/mL H ₂ O	0,25mg BSA/mL H ₂ O	0,25mg BSA/mL H ₂ O
5	0,5mg BSA/mL H ₂ O	0,5mg BSA/mL H ₂ O	0,5mg BSA/mL H ₂ O
6	0,75mg BSA/mL H ₂ O	0,75mg BSA/mL H ₂ O	0,75mg BSA/mL H ₂ O
7	1mg BSA/mL H ₂ O	1mg BSA/mL H ₂ O	1mg BSA/mL H ₂ O

Tabelle 2: Pipettierschema für Well-Platten zur Erstellung der Protein-Standardgerade.

Pro Well wurden 250µL des Bradford Reagenz (Raumtemperatur) zu den 30µL des Standards pipettiert. Anschließend wurde die Platte für eine Minute bei 500rpm auf der Schüttelplatte geschüttelt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 620nm gemessen.

Für Experimente in dieser Arbeit wurden nur Standardgeraden mit $R^2 > 0,98$ herangezogen. Zusätzlich wurde für jedes Experiment ein interner Standard (0,5mg BSA/mL H₂O) hergestellt.

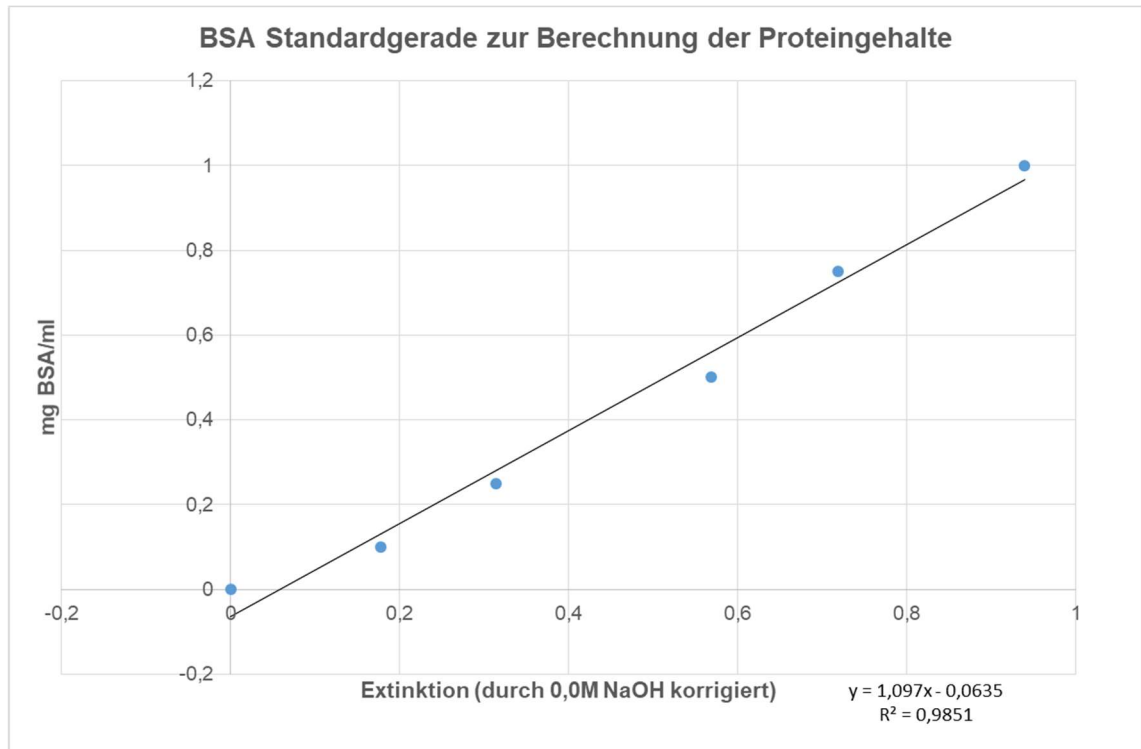


Abbildung 6: Darstellung der verwendeten Standardgerade zur Berechnung der Proteingehalte mittels der gemessenen Absorptionswerte
Die Absorption für jede getestete Proteinkonzentration wurde aus 3 Wiederholungen berechnet. Pipettiert wurde nach dem Schema, welches in Tabelle 1 ersichtlich ist. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 620nm gemessen.

Abbildung 6 zeigt die Standardgerade, welche zur Berechnung aller Proteingehalte pro Well herangezogen wurde. Die Formel zur Berechnung lautet: $y = 1,097x - 0,0635$ wobei den gemessenen Absorptionswerten entspricht. Das Bestimmtheitsmaß R^2 hat einen Wert von 0,9851, womit die Standardgerade für die Berechnungen verwendbar ist. Die Proteingehalte aller Platten mit welchen der NR-Assay durchgeführt wurde, wurden mit dieser Standardgeraden berechnet.

Nach Abschluss des NR-Assays wurde das PBS abgesaugt. Pro Well wurden 30µL der 0,05M NaOH-Lösung (Raumtemperatur) pipettiert um die Zellen zu lysieren. Die Platte wurde anschließend 2 Minuten bei 500rpm auf der Schüttelplatte geschüttelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Erfolg der Lyse wurde mittels Mikroskop überprüft und die Lyse war erfolgreich, wenn keine intakten mehr Zellen vorhanden waren. Den lysierten Zellen wurden pro Well 250µL des Bradford Reagenz beigelegt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Pipettenspitzen die Flüssigkeit in den Wells nicht berührt, da es sonst zu einer Verschleppung der Proteine kommt. Die Platte wurde für 1 Minute auf der Schüttelplatte geschüttelt mit 500rpm und anschließend für

20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Absorption wurde bei 620nm gemessen.

Durch Einsetzen der gemessenen Absorptionswerte der einzelnen Wells in die Standardgerade konnte der Proteingehalt pro Well berechnet werden.

Die NR-Fluoreszenz wurde durch die Proteinkonzentration dividiert, um so die NR-Fluoreszenz um die Proteinkonzentration zu normalisieren. So wird die Vergleichbarkeit der Daten erhöht.

Da die Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay die gängigste Methode ist, wurde diese für alle folgenden Experimente herangezogen und gegenüber der Bestimmung mittels Kristallviolett- bzw. Höchstfärbung bevorzugt.

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS durchgeführt. Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurde getestet, ob die Daten einer Normalverteilung folgen. Bei normalverteilten Daten wurden die möglichen Signifikanzen ($p \leq 0,05$) mittels ANOVA nach Bonferroni bzw. t-Test, bei nicht normalverteilten Daten mittels Kruskal-Wallis-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die berechneten p-Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,1$ (T).

4. Resultate

4.1. MTT-Test

Da nur metabolisch aktive Zellen Fette aufnehmen und speichern können, musste vor der Durchführung des NR-Assays sichergestellt werden, dass die gewählten Behandlungen die metabolische Aktivität der Zellen nicht negativ beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss aller Konzentrationen die geplant waren für einen Testansatz auf die Zellviabilität mittels MTT-Test getestet.

4.1.1. Ergebnisse MTT-Test nach Behandlung mit Glukose

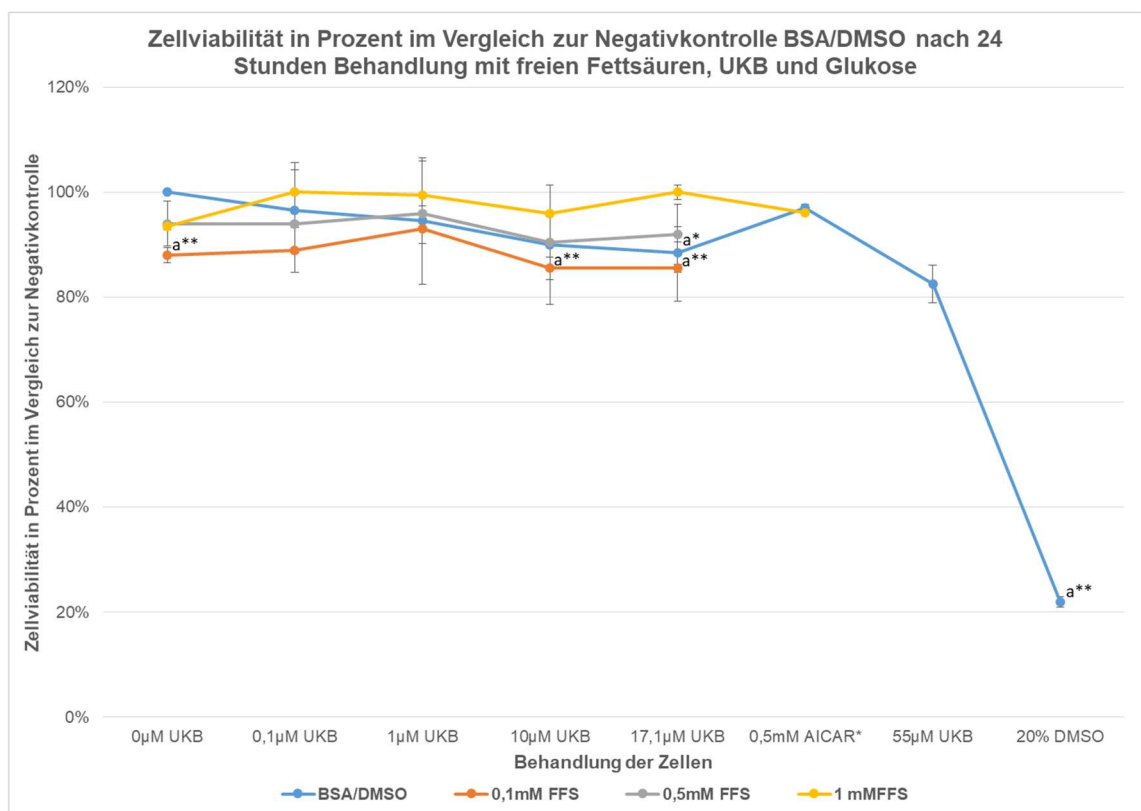


Abbildung 7: Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach 24 Stunden Behandlung mit FFS, UKB und Glukose (4,5g/L)
Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 2 x 6 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^{*}=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. Die Inkubationszeit der Behandlungen betrug 24 Stunden mit Ausnahme von allen Behandlungen mit 0,5mM AICAR. Bei diesen Behandlungen betrug die Inkubationszeit nur 5 Stunden. Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 485nm.

Die Berechnung und Interpretation der Zellviabilität ist unter Punkt 3.3.1 beschrieben.

Abbildung 7 zeigt die Zellviabilität der Zellen nach 24 Stunden Behandlung +/- FFS und +/- UKB. Auf der Ordinate ist die Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle zu sehen, der Abszisse können die getesteten Behandlungen entnommen werden. Diese Abbildung zeigt, dass die C2C12 Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit FFS (0,5mM, 1mM), UKB (17,1µM) und AICAR (0,5mM, 5 Stunden) mit Glukose (4,5g/L) weiterhin metabolisch aktiv sind. Die Zellviabilität der behandelten Zellen unterscheidet sich nicht signifikant von der Zellviabilität der Negativkontrolle mit Ausnahme der Behandlungen mit 17,1µM UKB, 0,1mM FFS, 0,1mM FFS + 10µM UKB und 0,1mM FFS + 17,1µM UKB. Trotz der signifikant erniedrigten Zellviabilität dieser Behandlungen wiesen sie eine metabolische Aktivität von über 80% auf und könnten somit für weiterführende Experimente herangezogen werden. Die Zellviabilität der Positivkontrolle (20% DMSO in BSA) lag bei ca. 20%, war signifikant erniedrigt im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO und zeigte, dass der Assay funktioniert hat.

4.1.2. Ergebnisse MTT-Test nach Behandlung ohne Glukose

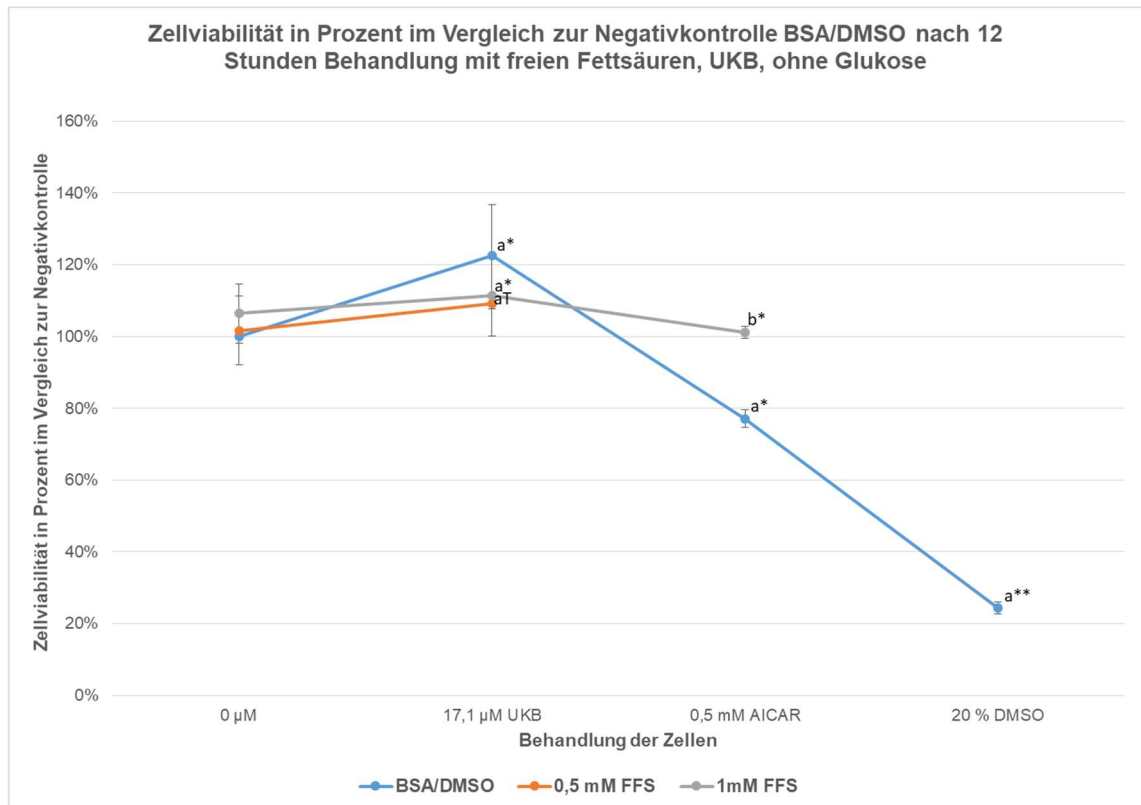


Abbildung 8: Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach 12 Stunden Behandlung mit FFS, UKB ohne Glukose
 Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 2 x 6 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: a**= $p \leq 0,01$, a*= $p \leq 0,05$, aT= $p \leq 0,1$. b zeigt die Unterschiede zwischen der AICAR-Behandlung ohne bzw. mit 1mM FFS. Die Inkubationszeit der Behandlungen betrug 12 Stunden mit Ausnahme von allen Behandlungen mit 0,5mM AICAR, hier betrug die Inkubationszeit nur 5 Stunden. Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 485nm.

Abbildung 8 zeigt die metabolische Aktivität der Zellen nach einer 12 stündigen Inkubation mit Behandlungen ohne Glukose. Auf der y-Achse ist die Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle zu sehen, auf der x-Achse die getesteten Behandlungen. Bei dem Versuch mit glukosefreier Behandlung wurde die Inkubationszeit auf 12 Stunden reduziert. Die Reduktion der Inkubationszeit war notwendig, da Inkubationszeiten über 12 Stunden vermutlich auf Grund des Nährstoffmangels zum Zelltod führten. Bei der 12 stündigen Inkubationszeit liegen die Zellviabilitäten aller Behandlungen über 100%, was zeigt, dass sie für weiterführende Experimente herangezogen werden können. Lediglich bei der Behandlung BSA/DMSO + 0,5mM AICAR mit einer Inkubationszeit von 5 Stunden betrug die Zellviabilität 79% im

Vergleich zur Negativkontrolle ($p \leq 0,05$). Auch die Positivkontrolle mit 20% DMSO ist im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant gesenkt ($p \leq 0,01$). Die Inkubation mit 17,1 μM UKB ohne FFS bzw. mit 1mM FFS sind im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht ($p \leq 0,05$). Bei 0,5mM FFS + 17,1 μM UKB liegt gegenüber der Negativkontrolle ein statistischer Trend vor ($p \leq 0,1$).

4.1.3. Ergebnisse MTT-Test nach Behandlung Normoglukose

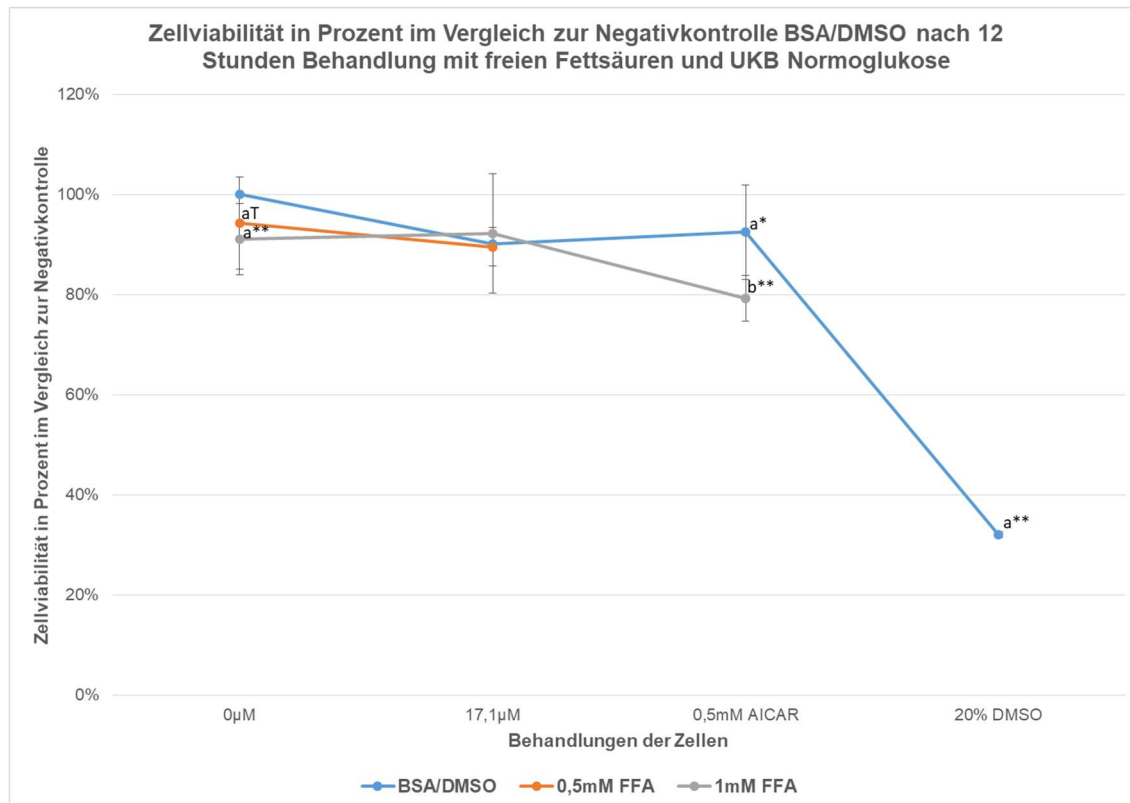


Abbildung 9: Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach 12 Stunden Behandlung mit FFS, UKB und Normoglukose (0,09g/100mL). Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 2 x 6 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p \leq 0,01$, $a^*=p \leq 0,05$, $aT=p \leq 0,1$. b zeigt die Unterschiede der AICAR-Behandlungen ohne bzw. mit 1mM FFS. Die Inkubationszeit der Behandlungen betrug 12 Stunden mit Ausnahme von allen Behandlungen mit 0,5mM AICAR, hier betrug die Inkubationszeit nur 5 Stunden. Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 485nm.

Abbildung 9 zeigt die Zellviabilität nach 12 Stunden Inkubationen mit Normoglukose-Behandlungen (0,09g Glukose/100mL). Auf der y-Achse ist die Zellviabilität in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO zu sehen, auf der x-Achse die getesteten Behandlungen. Auch bei der Normoglukose-Behandlung betrug die Inkubationszeit 12 Stunden. Wieder zeigt sich, dass alle Viabilitäten größer als 80% sind und somit alle

Konzentrationen für weiterführende Experimente herangezogen werden können. Die Behandlungen 1mM FFS, 1mM FFS + 0,5mM AICAR und die Positivkontrolle (20% DMSO in BSA) sind signifikant erniedrigt ($p \leq 0,01$) im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Zellviabilität der Behandlung BSA/DMSO + 0,5mM AICAR ist mit $p \leq 0,05$ signifikant niedriger im Vergleich zur Negativkontrolle.

4.2. NR-Assay und Bradford

4.2.1. Ergebnisse nach Behandlung mit Glukose

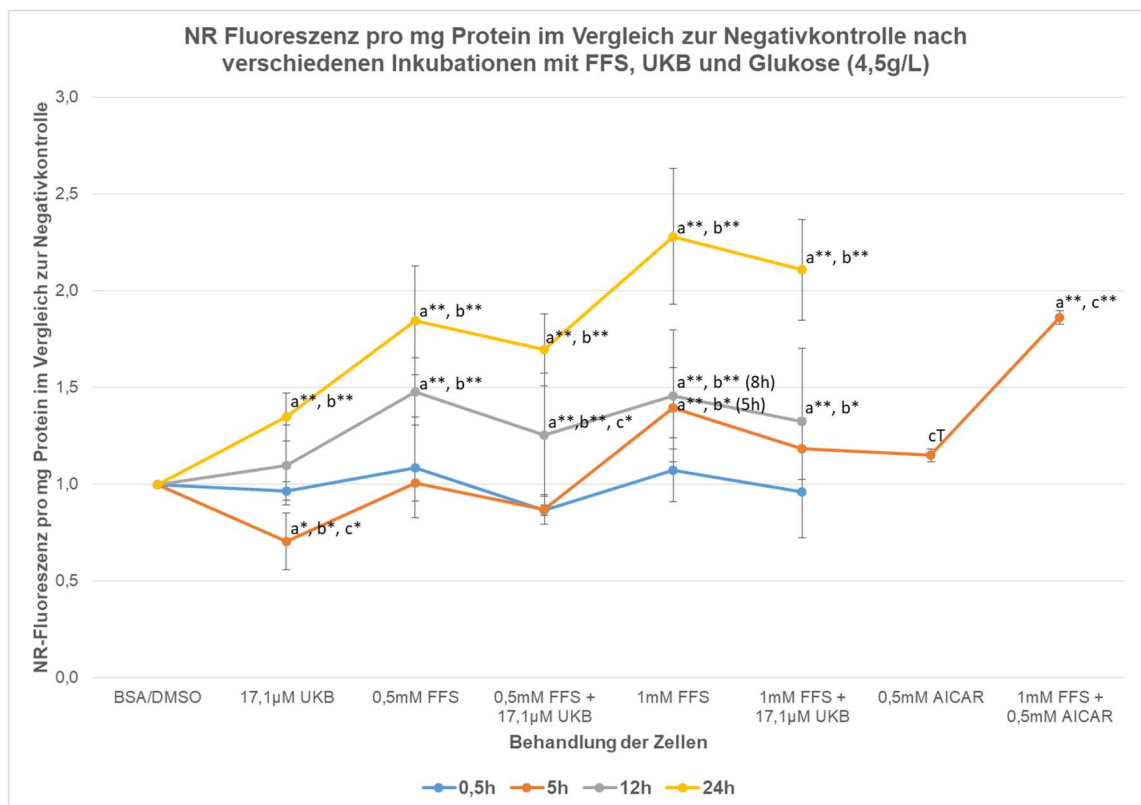


Abbildung 10: NR-Fluoreszenz pro mg Protein nach Behandlung mit FFS, UKB und Glukose (4,5g/L)

Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens 2 x 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p \leq 0,01$, $a^*=p \leq 0,05$, $aT=p \leq 0,1$; b zeigt Unterschiede zwischen den Zeitpunkten: $b^{**}=p \leq 0,01$, $b^*=p \leq 0,05$, $bT=p \leq 0,1$; c zeigt Unterschiede zwischen +/- UKB bzw. +/- AICAR: $c^{**}=p \leq 0,01$, $c^*=p \leq 0,05$, $cT=p \leq 0,1$. Die Extinktionswellenlänge der Messung war 485nm, die Emissionswellenlänge 590nm.

Abbildung 10 zeigt die NR-Fluoreszenz pro mg Protein im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach Inkubation mit FFS, UKB und Glukose (4,5g/L). Auf der Abszisse sind die getesteten Behandlungen der Zellen aufgetragen und auf der Ordinate wird die NR-Fluoreszenz im Bezug zur Negativkontrolle BSA/DMSO pro mg Protein gezeigt.

Bei einer Inkubationszeit von 0,5 Stunden können keine signifikanten Unterschiede zwischen der Negativkontrolle BSA/DMSO und den Behandlungen mit 0,5mM FFS bzw. 1mM FFS mit bzw. ohne UKB gezeigt werden. Auch zwischen den Behandlungen mit und ohne UKB bei jeweils gleicher FFS-Konzentration besteht kein signifikanter Unterschied. Es ist jedoch eine leichte Abnahme der NR-Fluoreszenz pro mg Protein bei den Behandlungen mit UKB im Vergleich zu Proben ohne UKB erkennbar.

Bei der Inkubationszeit von 5 Stunden sind die Behandlungen 17,1µM UKB ($p \leq 0,05$), 1mM FFS und 1mM FFS + 0,5mM AICAR ($p \leq 0,01$) signifikant von der Negativkontrolle BSA/DMSO unterschiedlich (bei 17,1µM erniedrigt, bei 1mM FFS und 1mM FFS + 0,5mM AICAR erhöht). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen Proben mit bzw. ohne UKB bei gleicher FFS-Konzentration ersichtlich, wobei auch hier das Muster erkennbar ist, dass die NR-Fluoreszenz nach Behandlung mit 17,1µM UKB leicht erniedrigt ist.

Bei der Inkubationszeit von 12 Stunden unterscheiden sich alle Behandlungen mit Fett (unabhängig von UKB) signifikant ($p \leq 0,01$) von der Negativkontrolle BSA/DMSO. Bei dieser Inkubationszeit ist ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzen pro mg Protein bei 0,5mM FFS und 0,5mM FFS + 17,1µM UKB messbar ($p \leq 0,05$).

Bei 24 Stunden Inkubation unterscheiden sich alle Behandlungen signifikant von der Negativkontrolle mit $p \leq 0,01$.

Ein vergleichbares Muster der Abbildung über die Inkubationszeiten lässt erkennen, dass Zellen, welche mit FFS und 17,1µM UKB behandelt wurden, tendenziell erniedrigte und bei 12 Stunden Inkubation signifikant erniedrigte NR-Fluoreszenzen zeigen im Vergleich zu nur mit FFS behandelten Zellen. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass UKB die Lipidakkumulation erniedrigt.

Des Weiteren ist auch ersichtlich, dass die Intensität der NR-Fluoreszenz bei zunehmender Fettkonzentration und zunehmender Inkubationszeit ansteigt. Zwischen 0,5 Stunden und 5 Stunden gibt es nur bei 17,1µM UKB und 1mM FFS einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). Zwischen 0,5 und 12 Stunden gibt es nur nach der Behandlung mit 17,1µM UKB keinen signifikanten Unterschied. Bei allen anderen Behandlungen unterschieden sich diese Inkubationszeiten signifikant ($p \leq 0,01$ bei 0,5mM FFS +/- 17,1µM UKB und $p \leq 0,05$ bei 1mM FFS +/- 17,1µM UKB). Beim Vergleich der Inkubationszeiten 0,5 Stunden und 24 Stunden unterschieden sich alle Treatments mit

$p \leq 0,01$ signifikant voneinander, was deutlich macht, dass die Fettakkumulation in den Zellen mit steigenden Inkubationszeit ansteigt.

Entgegen der angenommenen Hypothese scheint AICAR, ein AMP-Analog, die NR-Fluoreszenz und somit die Lipidakkumulation zu erhöhen. AICAR hat sowohl Einfluss auf den Lipidverbrauch als auch auf die zelluläre Lipidaufnahme. Da der NR-Assay Information zur Lipidakkumulation gibt, aber nicht zwischen Lipidverbrauch und Lipidaufnahme unterscheidet, wird vermutet, dass die Lipidaufnahme zugunsten des Lipidverbrauchs nach 5 Stunden AICAR Inkubation erhöht ist, bzw. der Energieverbrauch vor allem durch Glukosekatabolismus stattfindet.

4.2.2. Ergebnisse nach Behandlung ohne Glukose

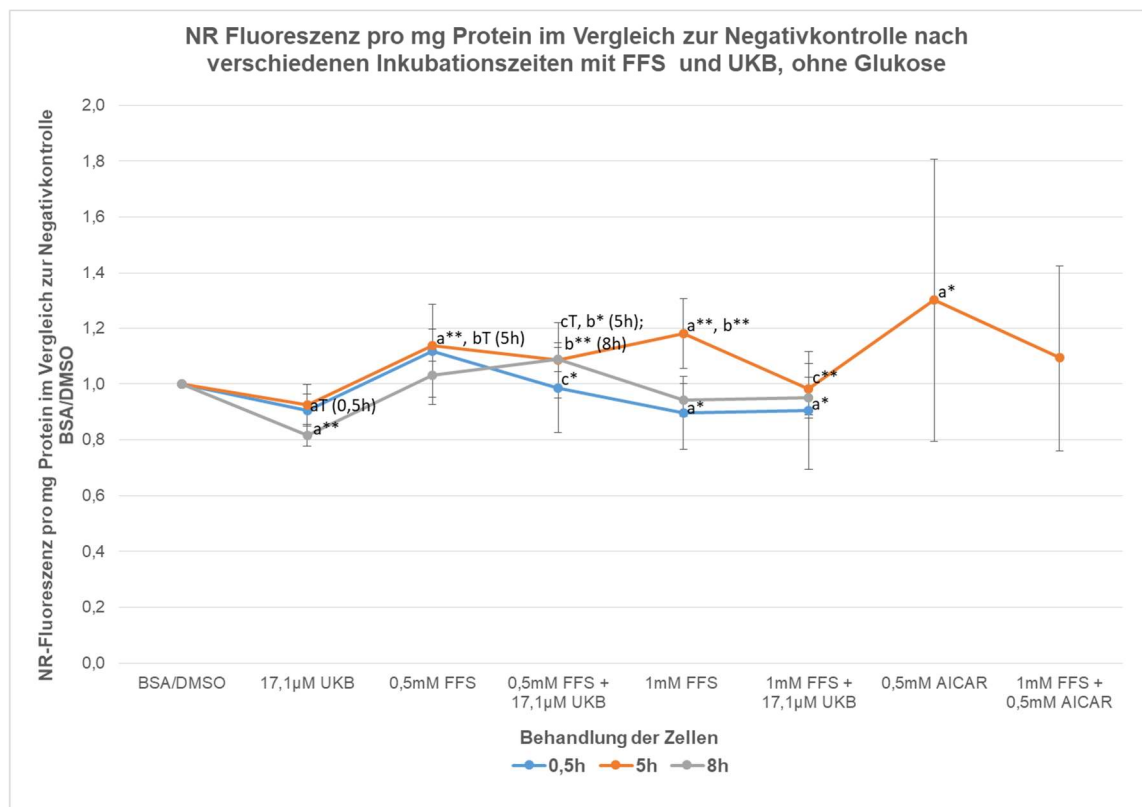


Abbildung 11: NR-Fluoreszenz pro mg Protein nach Behandlung mit FFS, UKB ohne Glukose. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens 2 x 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p \leq 0,01$, $a^*=p \leq 0,05$, $aT=p \leq 0,1$; b zeigt Unterschiede zwischen den Zeitpunkten: $b^{**}=p \leq 0,01$, $b^*=p \leq 0,05$, $bT=p \leq 0,1$; c zeigt Unterschiede zwischen $\pm$ UKB bzw. $\pm$ AICAR: $c^{**}=p \leq 0,01$, $c^*=p \leq 0,05$, $cT=p \leq 0,1$. Die Extinktionswellenlänge der Messung war 485nm, die Emissionswellenlänge 590nm.

Abbildung 11 zeigt die NR-Fluoreszenz pro mg Protein im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach der Behandlung mit FFS, UKB, ohne Glukose. Auf der Abszisse sind die Behandlungen der Zellen aufgetragen und auf der Ordinate wird die NR-Fluoreszenz pro mg Protein gezeigt.

Nach einer Inkubationszeit von 0,5 Stunden ist die Fluoreszenz der C2C12 Zellen nach Behandlung mit 1mM FFS und 1mM FFS + 17,1µM UKB signifikant erniedrigt ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO. 17,1µM UKB ist im Vergleich zur Negativkontrolle erniedrigt (Trend $p \leq 0,1$). Nach einer halbstündigen Inkubation zeigt sich auch ein signifikanter Unterschied bei der Behandlung 0,5mM FFS mit bzw. ohne UKB. Die Fluoreszenz der Proben mit UKB ist in diesem Fall signifikant erniedrigt im Vergleich zu derselben FFS-Konzentration ohne UKB ($p < 0,05$).

Bei der Inkubationszeit von 5 Stunden unterscheiden sich 0,5mM und 1mM FFS sowie 0,5mM AICAR signifikant von der Negativkontrolle (0,5mM und 1mM FFS $p \leq 0,01$; 0,5mM AICAR $p \leq 0,05$). Das Treatment 0,5mM FFS + 17,1µM UKB weist im Vergleich zu 0,5mM FFS eine reduzierte Fluoreszenzintensität auf (Trend $p \leq 0,1$), bei der Fettkonzentration von 1mM FFS unterscheiden sich die Behandlung mit und ohne UKB signifikant voneinander ($p \leq 0,01$).

Nach einer Inkubation von 8 Stunden ist die Fluoreszenz der Zellen welche mit 17,1µM UKB behandelt wurden zur Negativkontrolle signifikant reduziert.

Nach 8 Stunden Inkubation unter hypoglykämischen Bedingungen scheint trotz gesteigerter FFS Behandlung (0,5mM und 1mM FFS) keine Lipid-Akkumulation in den C2C12 Zellen stattzufinden. Dies könnte bedingt sein durch einen veränderten Metabolismus während des anhaltenden Glukose Entzuges (siehe Punkt 4.1.2).

Die AICAR Behandlung wies sehr große Schwankungen auf, was, wie bereits unter Punkt 4.1.2 beobachtet, auf einen erhöhten metabolischen Stress während des anhaltenden Glukoseentzugs zurückzuführen ist.

4.2.3. Ergebnisse nach Normoglukose-Behandlung

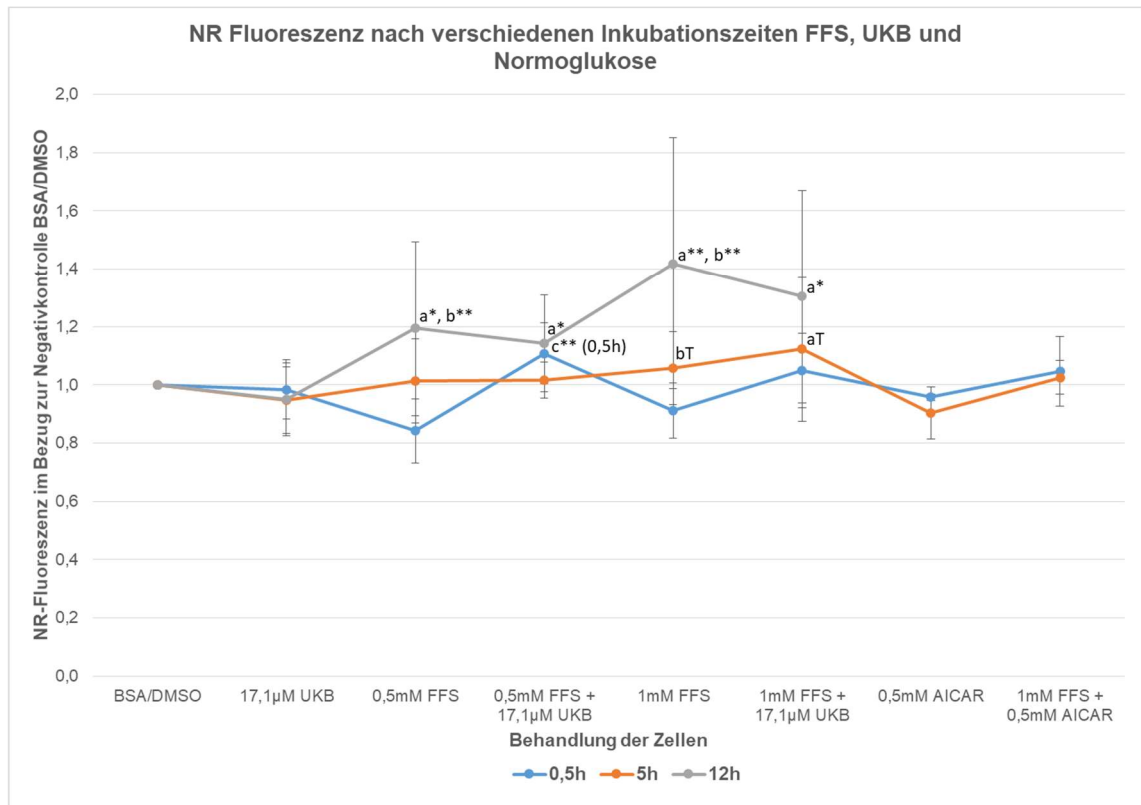


Abbildung 12: NR-Fluoreszenz nach einer Normoglukose-Behandlung mit FFS und UKB
 Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens 2 x 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^{*}=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$; b zeigt Unterschiede zwischen den Zeitpunkten: $b^{**}=p\leq 0,01$, $b^{*}=p\leq 0,05$, $bT=p\leq 0,1$; c zeigt Unterschiede zwischen $\pm$ UKB bzw. $\pm$ AICAR: $c^{**}=p\leq 0,01$, $c^{*}=p\leq 0,05$, $cT=p\leq 0,1$. Die Extinktionswellenlänge der Messung war 485nm, die Emissionswellenlänge 590nm.

Abbildung 12 zeigt die NR-Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO. Da unter normoglykämischen Bedingungen die Proteingehalte deutlich reduziert sind, und sich das Verhältnis der Proteingehalte zwischen fettfreien Behandlungen und fetthaltigen Behandlungen verschiebt, ist hier der Bezug der NR-Fluoreszenz auf die Proteinmenge nicht mehr möglich (siehe 4.3.1).

Betrachtet man die NR-Fluoreszenz so ist ersichtlich, dass nach einer Inkubationszeit von 0,5 Stunden die NR-Fluoreszenz nach der Behandlung mit 0,5mM FFS + 17,1µM UKB die Fluoreszenz signifikant ansteigt im Vergleich zur Behandlung mit 0,5mM FFS ohne UKB. Zur Negativkontrolle unterscheidet sich keine der Behandlungen signifikant.

Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden weist die NR-Fluoreszenz einen Trend bei 1mM FFS + 17,1µM UKB im Vergleich zur Negativkontrolle auf.

Nach 12 Stunden Behandlung der Zellen unterscheiden sich alle Behandlungen mit FFS unabhängig von UKB signifikant von der Negativkontrolle. Hier gibt es jedoch keine Unterschiede zwischen den Behandlungen mit bzw. ohne UKB.

Das Muster der erniedrigten NR-Fluoreszenz bei Behandlungen mit UKB, welches bei den hyper- und hypoglykämischen Behandlungen erkennbar war, ist bei der normoglykämischen Behandlung nur nach 12 Stunden Inkubation ersichtlich. Nach 0,5 Stunden bzw. 5 Stunden Inkubation ist hier ein gegenläufiges Muster erkennbar, wobei die fehlende Lipidakkumulation und die veränderten Proteingehalte darauf schließen lassen, dass der Ansatz unter normoglykämischen Bedingungen nicht funktioniert.

4.3. Bradford-Assay

4.3.1. Vergleich der Behandlungen

Im Vergleich der verschiedenen Behandlungen (mit Glukose, ohne Glukose, Normoglukose) zeigt sich, dass die Proteingehalte bei der Behandlung mit Glukose am höchsten sind.

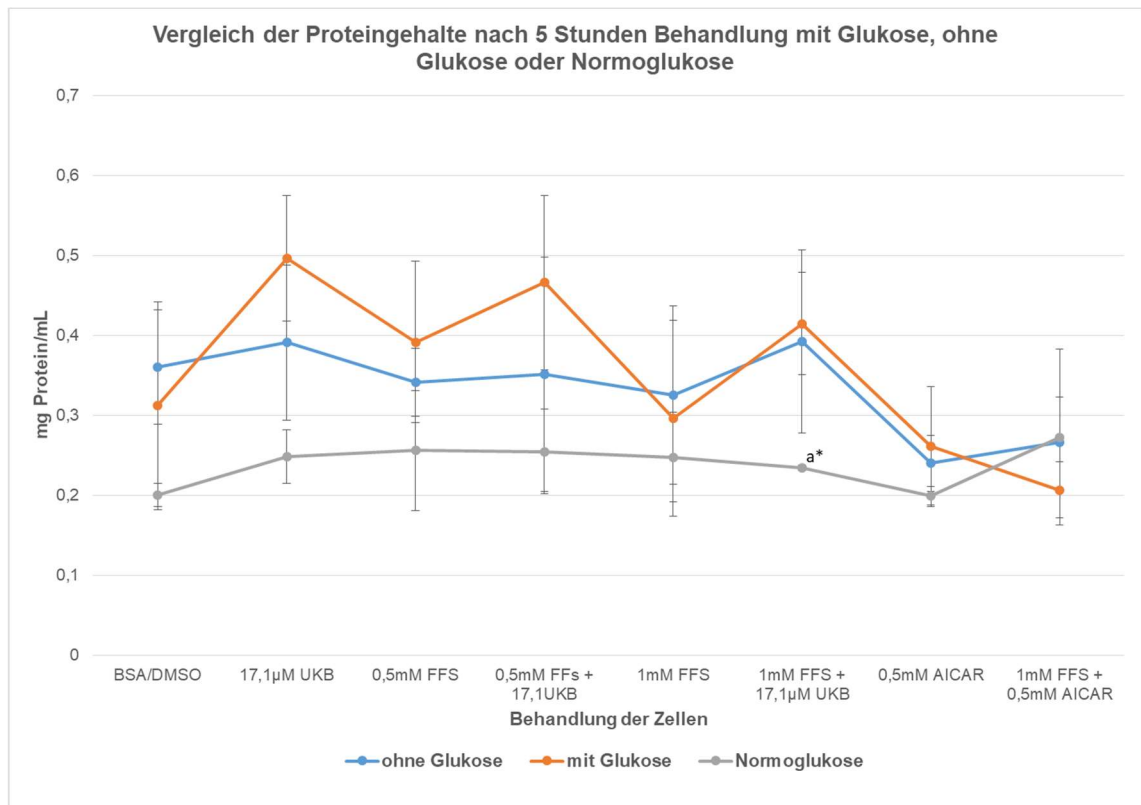


Abbildung 13: Vergleich der Proteingehalte nach 5 Stunden Behandlung mit Glukose, ohne Glukose oder Normoglukose
 Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von mindestens 2 x 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Behandlung mit Glukose: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^*=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$; Getestet wurden die Proteingehalte mittels Bradford-Assay mit einer anschließenden Absorptionsmessung bei 620nm.

Abbildung 13 zeigt den Vergleich der Proteingehalte nach 5 Stunden Behandlung mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen.

Auf der Ordinate ist die Proteinmenge in mg/mL zu sehen, auf der Abszisse sind die getesteten Behandlungen eingetragen. Bereits nach einer 5 stündigen Behandlung ist erkennbar, dass die Proteingehalte bei den Behandlungen mit Glukose höher sind, als bei der Behandlung ohne Glukose und vor allem höher als bei der normoglykämischen Behandlung.

Art der Behandlung	Mittelwerte der Proteingehalte der fettfreien Behandlung (mg/mL)	Mittelwerte der Proteingehalte bei 1mM FFS (mg/mL)	p-Wert
Mit Glukose	0,317	0,314	0,967
Normoglukose	0,213	0,265	0,039

Tabelle 3: Vergleich der Proteinmenge (Mittelwerte der Proteine in mg/mL) nach 12 Stunden Behandlung

Tabelle 3 zeigt den Vergleich der Proteingehalte nach 12 Stunden Behandlung ohne bzw. mit 1mM FFS. Nach der Inkubation mit Glukose zeigt sich, dass die Proteingehalte bei der Behandlung mit FFS annähernd gleich bleiben im Vergleich zu den Proteingehalten der fettfreien Behandlung. Es gibt keine signifikanten Unterschiede der Proteinmenge zwischen den fettfreien und den fetthaltigen Behandlungen ($p=0,967$).

Bei der normoglykämischen Behandlung zeigt sich dieses Muster nicht. Hier steigt der Proteingehalt nach Behandlung mit 1mM FFS signifikant im Vergleich zu dem Proteingehalt nach Behandlung ohne FFS an ($p=0,039$). Dieser signifikante Unterschied konnte bei der Behandlung mit und ohne Glukose bei keiner Inkubationszeit festgestellt werden und auch bei den normoglykämischen Behandlungen wurde dieser Effekt erst nach 12 Stunden Inkubation erkennbar.

Aufgrund des offensichtlich verstärkten Proteinmetabolismus welcher bei einer geringeren Menge an Glukose in der Behandlung und einer nährstoffarmen (=fettfreien) Behandlung auftritt, scheint dieser Assay bei normoglykämischen Bedingungen ab 12 Stunden nicht mehr valide zu sein und kann deshalb nicht durchgeführt werden.

4.4. Konfokalmikroskopie

Im Rahmen einer Kooperation mit Experten der Fluoreszenzmikroskopie wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt. Hierfür wurden Zellen mit Glukose für 24 Stunden ohne bzw. mit 1mM FFS und ohne bzw. mit 17,1 μ M UKB behandelt und anschließend mittels Konfokalmikroskopie fotografiert.

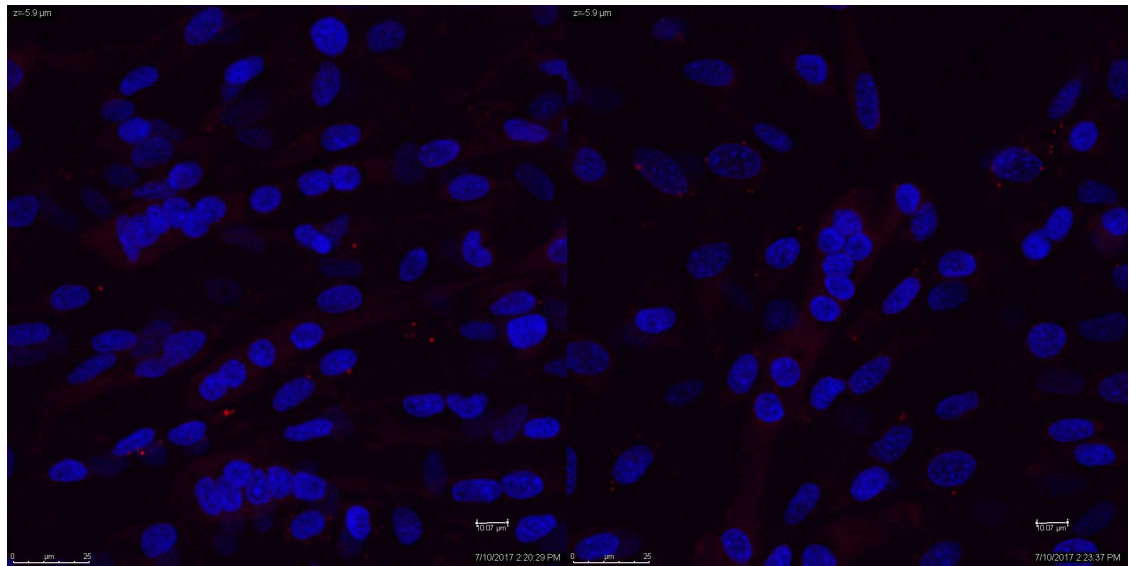


Abbildung 14: Zellen nach 24 Stunden Behandlung ohne Fett, mit Glukose und ohne bzw. mit 17,1µM UKB, durchgeführt mittels Konfokalmikroskopie
 Links: Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit der Negativkontrolle BSA/DMSO (mit Glukose). Rechts: Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit 17,1µM UKB (mit Glukose). Blau eingefärbt wurden die Zellkerne, rot eingefärbt wurden die vorhandenen Lipidtröpfchen.

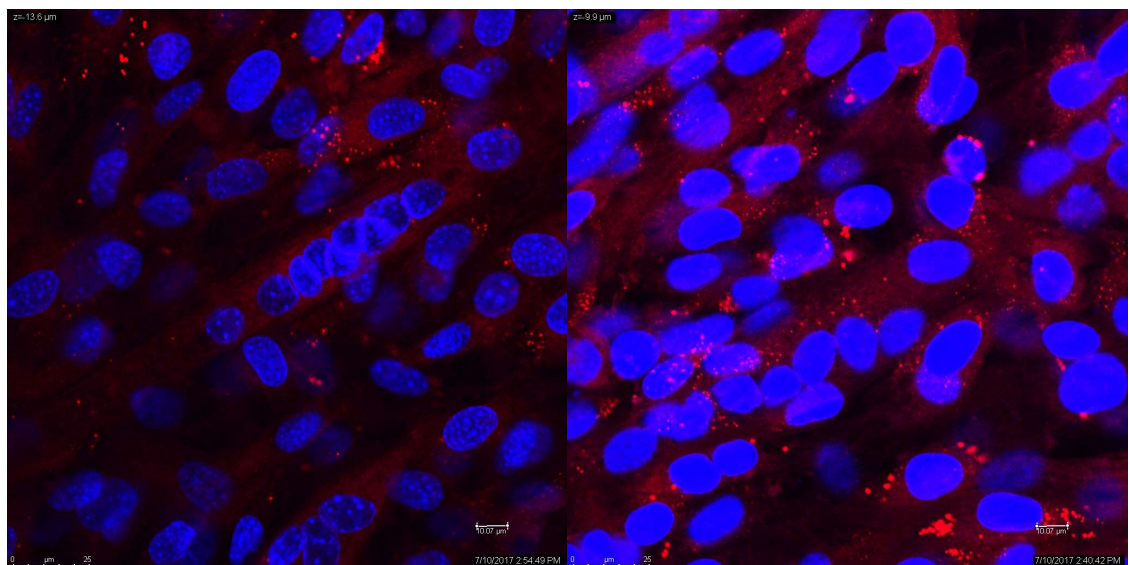


Abbildung 15: Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit 1mM FFS, mit Glukose und ohne bzw. mit 17,1µM UKB, durchgeführt mittels Konfokalmikroskopie
 Links: Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit 1mM FFS (mit Glukose). Rechts: Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit 1mM FFS + 17,1µM UKB (mit Glukose). Blau eingefärbt wurden die Zellkerne, rot eingefärbt wurden die vorhandenen Lipidtröpfchen

In Abbildung 14 sind Zellen zu sehen, welche für 24 Stunden ohne FFS behandelt wurden. Auf dem linken Foto sind Zellen zu sehen, welche mit der Negativkontrolle BSA/DMSO behandelt wurden, die Zellen der rechten Seite wurde mit 17,1µM UKB behandelt. Die blau eingefärbten Kügelchen sind die Zellkerne, in Rot sind die

Fetttröpfchen zu sehen, welche in den Zellen vorhanden sind. Es ist gut erkennbar, dass ohne FFS kaum bzw. gar keine Fetttröpfchen gebildet wurden. Dies ist sowohl bei der Inkubation ohne also auch mit $17,1\mu\text{M}$ UKB erkennbar.

In Abbildung 15 sind Zellen zu sehen, welche für 24 Stunden mit 1mM FFS behandelt wurden. Auf der linken Seite ohne UKB und auf der rechten Seite mit $17,1\mu\text{M}$ UKB. Hier sind sehr viele rote Fetttröpfchen zu sehen und in den fotografierten Ausschnitten ist die Anzahl der Fetttröpfchen nach Behandlung ohne bzw. mit UKB annähernd gleich.

Vergleicht man nun Abbildung 14 und Abbildung 15 so ist der Anstieg der intrazellulären Fetttröpfchen deutlich zu sehen und somit auch erkennbar, dass nach Behandlung mit FFS auch Fett als Fetttröpfchen in den Zellen vorliegt.

5. Methodenvalidierung

5.1. Methodenvalidierung MTT

Für die Durchführung des MTT Tests wurden zu Beginn verschiedene Wellenlängen zur Messung der Absorption getestet, um den sensitivsten Bereich dieser Methode zu ermitteln. Getestet wurden die Wellenlängen 485nm, 544nm und 620nm. Diese Wellenlängen wurden auf Grund der Literatur gewählt (siehe Abbildung 16). Aus der folgenden Abbildung ist ersichtlich, dass das Absorptionsmaximum der gelösten Formazankristalle bei 560nm bis 620nm liegt.

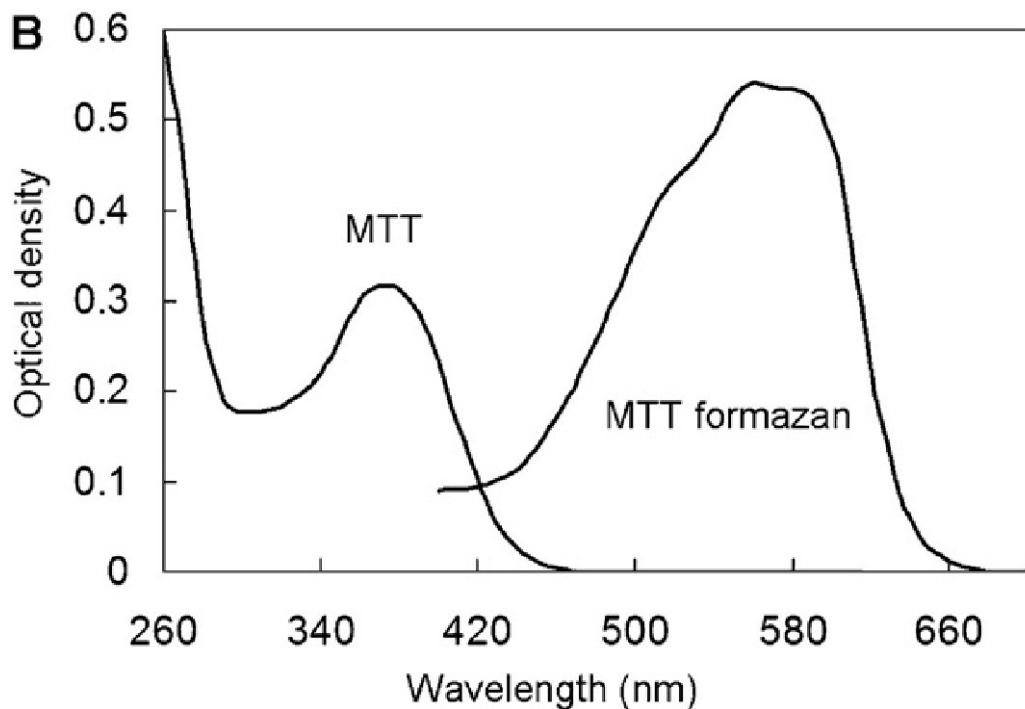


Abbildung 16: Wellenlänge der Absorption von MTT und gebildeten Formazankristallen
In dieser Abbildung wird gezeigt, in welchem Wellenlängenbereich die Absorption von MTT bzw. der gebildeten Formazankristalle liegen. Es ist erkennbar, dass das Absorptionsmaximum der Formazankristalle bei ca. 560nm liegt (Stockert et al., 2012).

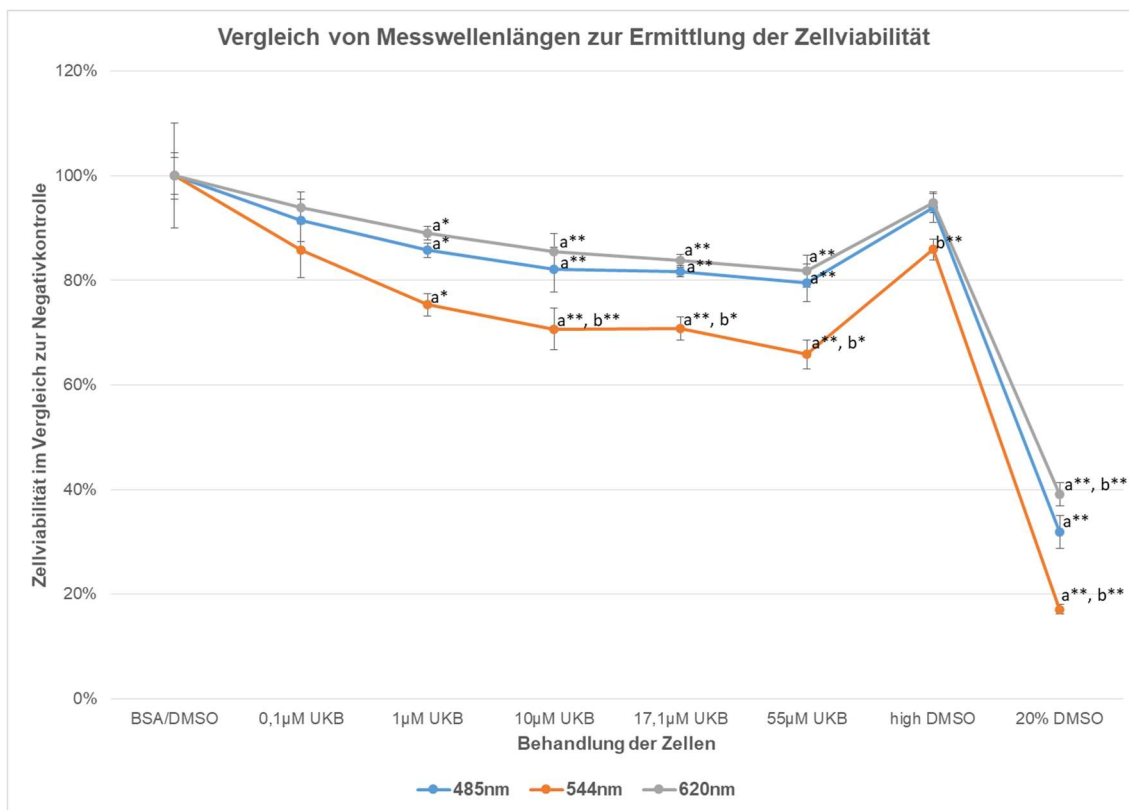


Abbildung 17: Vergleich der Messwellenlängen zur Ermittlung der Zellviabilität
 Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 6 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^*=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. b zeigt die Unterschiede zur Wellenlänge 485nm: $b^{**}=p\leq 0,01$, $b^*=p\leq 0,05$, $bT=p\leq 0,1$. Die Inkubationszeit der Behandlungen betrug 24 Stunden. Gemessen wurde die Absorption bei den Wellenlängen 485nm, 544nm und 620nm.

Abbildung 17 zeigt die Zellviabilitäten nach 24 Stunden Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an UKB (Behandlung mit Glukose) gemessen mit drei verschiedenen Absorptionswellenlängen. Auf der Ordinate sind die Zellviabilitätswerte im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle BSA/DMSO aufgetragen, auf der Abszisse sind die getesteten Behandlungen der Zellen.

Die Messungen bei 485nm und 620nm liefern ein sehr ähnliches Ergebnis, bei der Messung bei 544nm sind die Zellviabilitäten im Vergleich zu den Werten bei der Messung mit 485nm und 620nm erniedrigt, bei den UKB-Konzentrationen 10µM, 17,1µM und 55µM sowie bei der Positivkontrolle 20% DMSO sind die gemessenen Zellviabilitäten signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Werten welche bei 485nm gemessen wurden.

Aufgrund der Tatsache, dass die gemessenen Absolutwerte bei der Wellenlänge 544nm außerhalb des Messbereichs des Plate Readers lagen, konnten alle folgenden Messungen nicht mit dieser Wellenlänge durchgeführt werden.

Wie in Abbildung 16 erkennbar, ist die Absorption bei der Wellenlänge 485nm etwas höher ist als bei 620nm weshalb die Absorptionen bei allen folgenden Experimenten bei der Wellenlänge 485nm gemessen wurde.

5.2. Methodenvalidierung NR

Alle Versuche zur Methodenvalidierung des NR-Assays wurden mit glukosehaltigen Behandlungen durchgeführt (4,5g Glukose/L).

5.2.1. Wellenlänge

Um herauszufinden, mit welchen Wellenlängen die sensitivsten Ergebnisse erreicht werden, wurden vier verschiedene Wellenlängen getestet. Gemessen wurde mit einer Extinktion 485nm und einer Emissionswellenlänge 520nm, 590nm und 612nm und mit einer Extinktion 544nm und einer Emission 612nm. Diese Wellenlängen wurden aufgrund von bereits veröffentlichter Literatur gewählt (Greenspan et al., 1985). Vor der NR-Fluoreszenzmessung wurden die Zellen 24 Stunden behandelt und anschließend mit NR (3,3µg NR/mL PBS) gefärbt. Alle vier Messungen wurden bei derselben Platte durchgeführt.

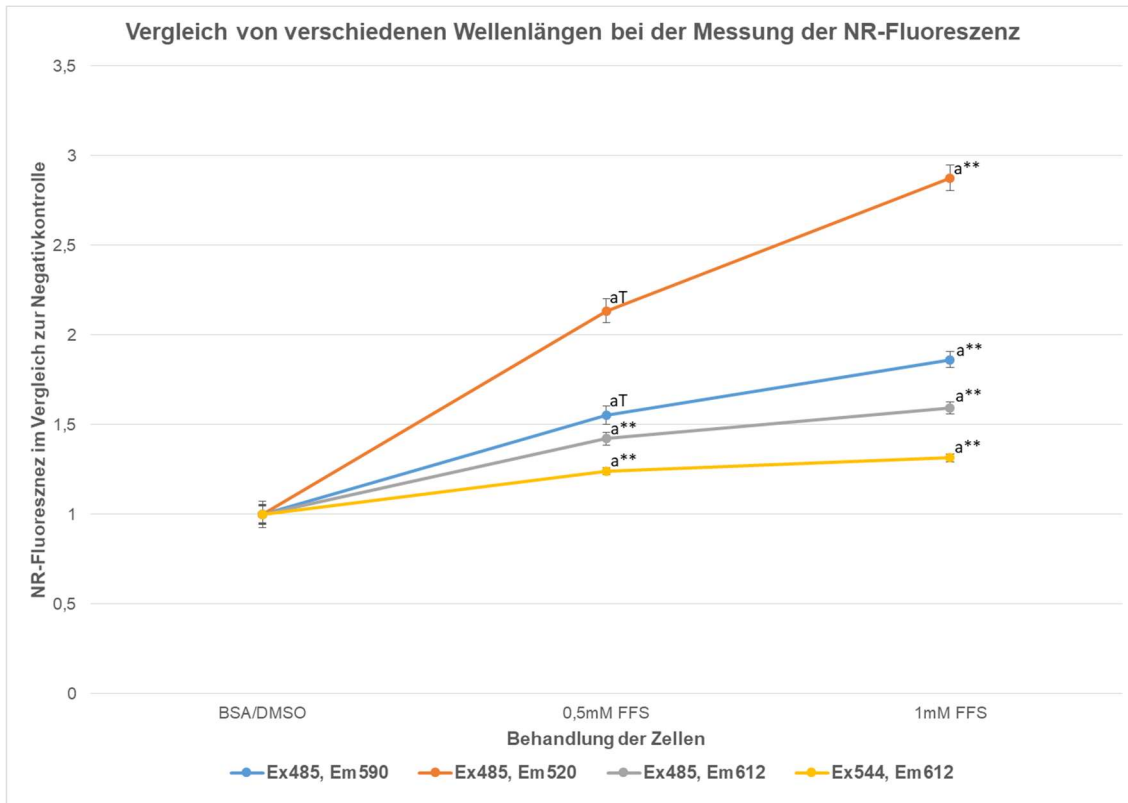


Abbildung 18: Vergleich der Wellenlängen mit welcher die NR-Fluoreszenz gemessen wurde. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $aT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 520nm, 590nm und 612nm bzw. Extinktion 544nm und Emission 612nm.

Abbildung 18 zeigt den Vergleich der unterschiedlichen Wellenlängen zur Messung der NR-Fluoreszenz.

Bei allen Wellenlängen ist das Muster zu erkennen, dass die Fluoreszenz mit steigender FFS-Konzentration ansteigt. Auch sind bei allen Wellenlängen signifikante Unterschiede der Behandlungen mit FFS gegeben.

Um die ideale Wellenlänge zur Fluoreszenzmessung der mit NR gefärbten Fetttröpfchen zu ermitteln wurde neben diesem Vergleich der unterschiedlichen Extinktions- und Emissionswellenlängen ein λ -Scan bei einem gefärbten Fetttröpfchen durchgeführt.

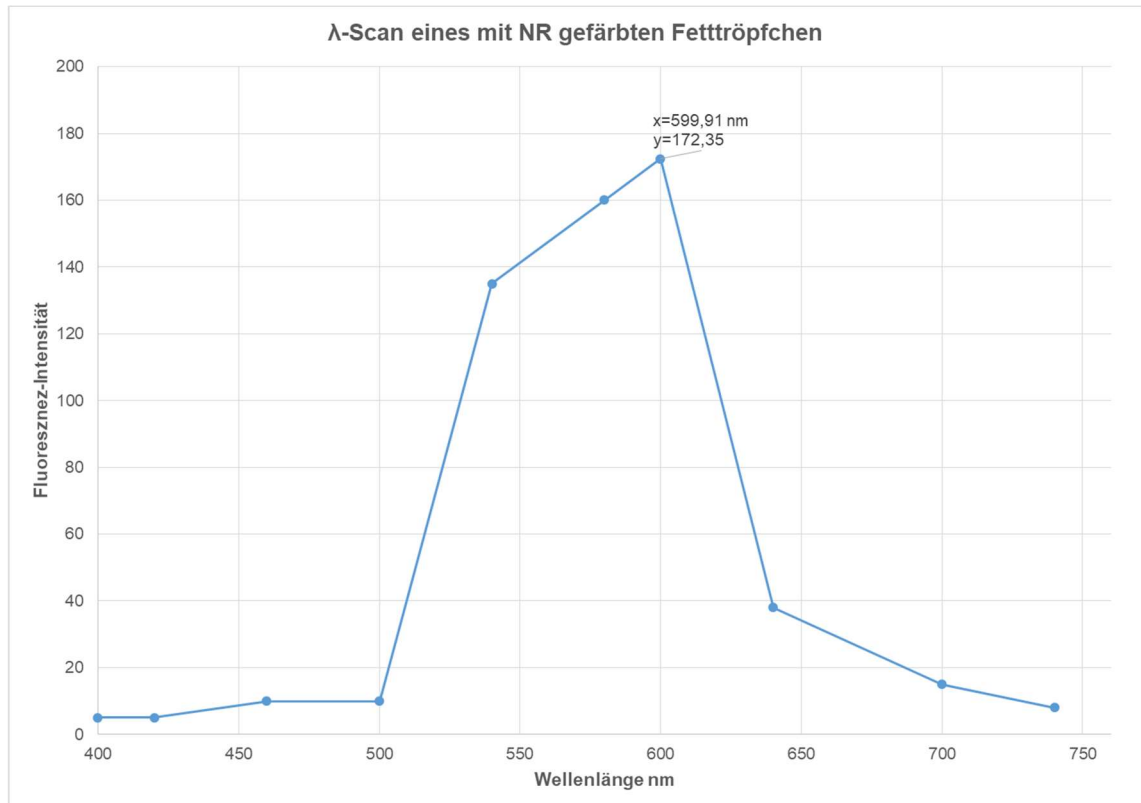


Abbildung 19: λ -Scan eines mit NR gefärbten Fetttropfchen, mittels Konfokalmikroskopie durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt den λ -Scan eines gefärbten Fetttropfchens. Auf Ordinate ist die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen, auf der Abszisse sind die getesteten Emissionswellenlängen zu sehen. Die Extinktionswellenlänge betrug 485nm. In der Abbildung ist zu erkennen, dass das Intensitätsmaximum bei einer Emissionswellenlänge von ca. 599nm liegt. Deshalb wurde bei alle weiteren Versuche mit einer Extinktionswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm gemessen.

Des Weiteren war deutlich zu sehen, dass die Autofluoreszenz der Zellen von allen Behandlungen bei 485nm Extinktion und 520nm Emission deutlich höher war als jene bei 590nm Extinktion. Die Fluoreszenzwerte nach der Färbung hingegen haben sich zwischen den beiden Emissionswellenlängen nicht stark unterschieden. Die berechneten Differenzen der NR-Fluoreszenzen und Hintergrund-Fluoreszenz war also bei einer Emissionswellenlänge von 520nm geringer und die Hintergrund-Fluoreszenz hatte hier einen stärkeren Einfluss als bei 590nm Emission.

5.2.2. NR Inkubationszeiten

Um herauszufinden, welche Inkubationszeit mit NR die sensitivsten Ergebnisse erzielt, wurden zunächst 2 Inkubationszeiten getestet, zum einen 15 Minuten und zum anderen 4 Stunden Inkubation mit 3,3µg NR/ml PBS (Vorlösung 1mg NR/mL Methanol).

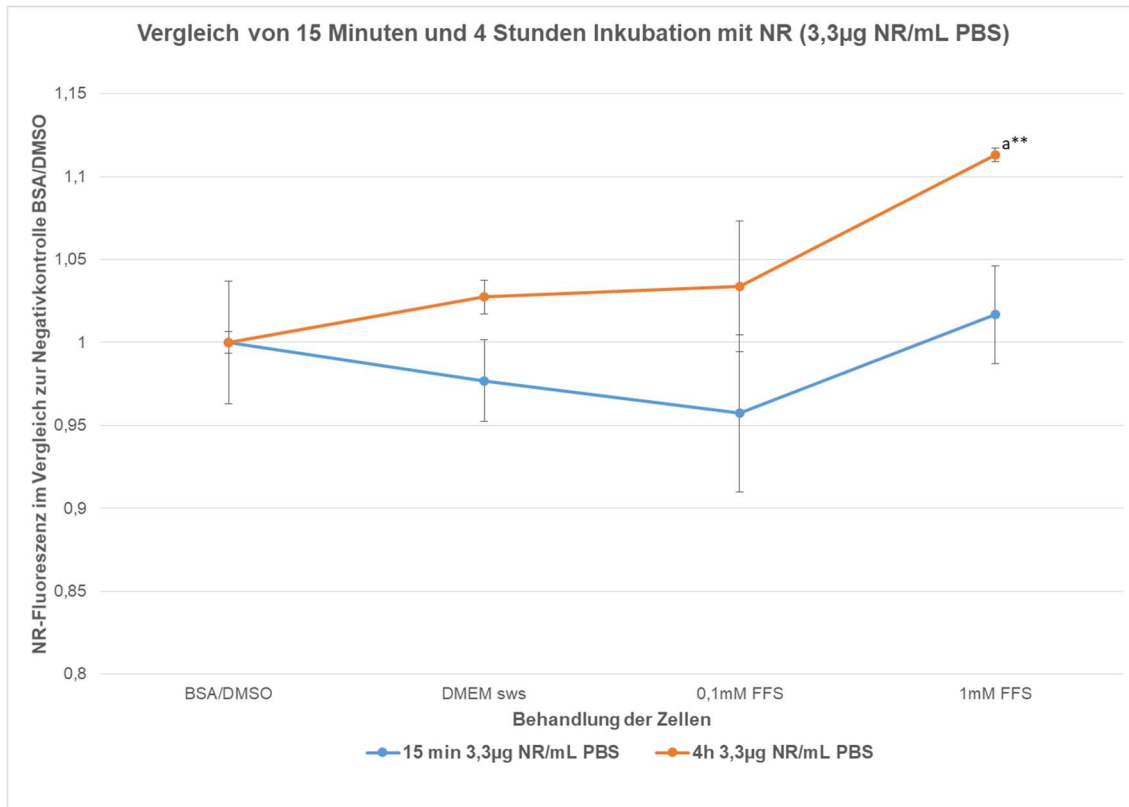


Abbildung 20: Vergleich von 15 Minuten und 4 Stunden Inkubation mit NR (3,3µg NR/mL PBS) Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: a**=p≤0,01. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm.

In Abbildung 20 wird der Vergleich der Fluoreszenzen nach 15 Minuten (bei 37°C und 5% CO₂) bzw. 4 Stunden (bei Raumtemperatur, dunkel) Inkubation mit 3,3µg NR/mL PBS beschrieben. Auf der Ordinate ist die NR-Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO aufgetragen, auf der Abszisse sind die getesteten Behandlungen der Zellen zu sehen. Nach beiden Inkubationszeiten wurde die Fluoreszenz mittels Plate-Reader bei einer Extinktion von 485nm und einer Emission von 590nm gemessen.

Nach 15 Minuten Inkubation mit 3,3µg NR/mL PBS ist zwischen den Behandlungen mit bzw. ohne FFS kein Unterschied in der Fluoreszenz erkennbar. Dies deutet darauf hin,

dass das Ergebnis nach dieser Inkubationszeit mit NR nicht sensitiv genug ist, um Unterschiede zwischen Behandlungen mit und ohne FFS zu erkennen.

Nach 4 Stunden Inkubation mit 3,3µg NR/mL PBS sind hingegen signifikante Unterschiede zwischen der fettfreien Negativkontrolle und der Behandlungen mit hoher FFS-Konzentration (1mM FFS) messbar. Zwischen der Negativkontrolle und niedrigen FFS-Konzentrationen (0,1mM FFS) ist auch hier kein signifikanter Unterschied messbar.

Das Ergebnis dieses Versuchs hat uns gezeigt, dass eine 15 minütige Inkubation mit 3,3µg NR/mL PBS nicht sensitiv genug ist, weshalb die folgenden Versuche mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden durchgeführt wurden.

In weiterer Folge wurde getestet, ob nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden (bei Raumtemperatur) mit 3,3µg NR/mL PBS ein vergleichbares Ergebnis zu sehen ist wie nach 4 Stunden Inkubation mit derselben Konzentration an NR.

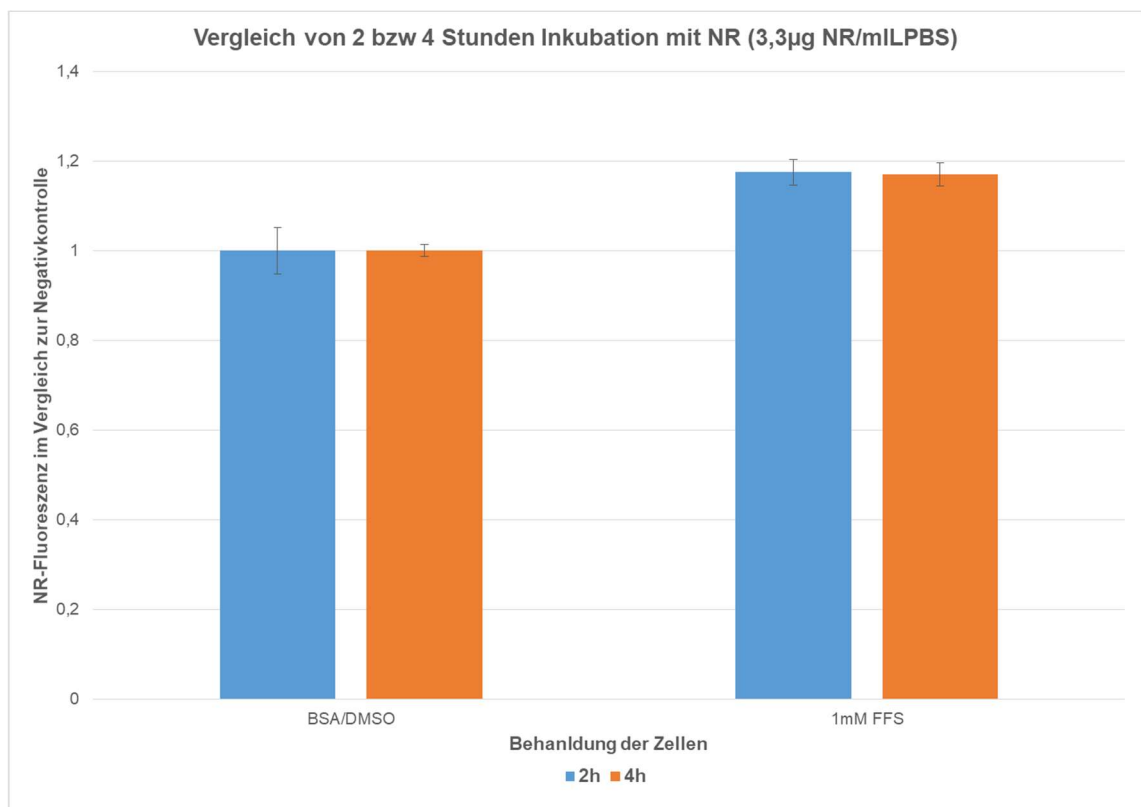


Abbildung 21: Vergleich von 2 und 4 Stunden Inkubation mit NR
 Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels t-Test berechnet. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm nach 2 Stunden bzw. 4 Stunden Inkubation mit 3,3µg NR/mL PBS.

Abbildung 21 zeigt die NR-Fluoreszenz nach 2 bzw. 4 Stunden Inkubation mit NR (3,3µg NR/mL PBS).

Die gemessene NR-Fluoreszenz nach 2 Stunden bzw. 4 Stunden Inkubation mit NR ist signifikant nicht unterschiedlich. Auch ist bei beiden Inkubationszeiten ein signifikanter Unterschied zwischen der fettfreien und der Behandlung mit 1mM FFS gegeben. Aufgrund dieses Experiments wurde für alle folgenden Experimente eine NR Inkubation von 2 Stunden gewählt.

5.2.1. NR Konzentrationen

Es wurden zwei NR-Konzentrationen getestet, um die sensitivste Methode zu ermitteln. Diese waren 0,318 μ g NR/mL PBS (Vorlösung von NR in DMSO) und 3,3 μ g NR/mL PBS (Vorlösung von NR in Methanol).

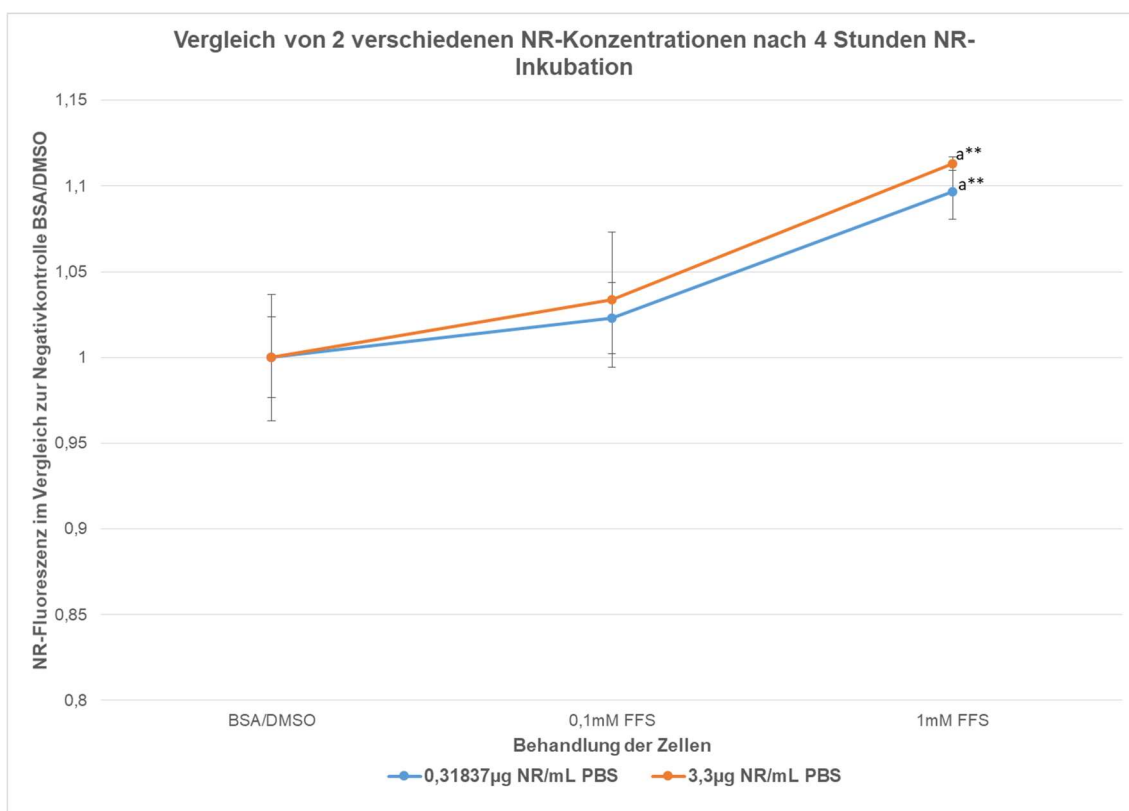


Abbildung 22: Vergleich von 2 NR-Konzentrationen
 Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels t-Test (bei normalverteilten Daten) bzw. Mann-Whitney-U-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^*=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm.

Abbildung 22 zeigt den Vergleich der NR-Konzentration 0,31837 μ g NR/mL PBS (Vorlösung 1mg NR/mL DMSO) und 3,3 μ g NR/mL PBS (Vorlösung 1mg NR/mL Methanol). Die Zellen wurden vor der NR-Färbung 24 Stunden behandelt und anschließend 4 Stunden mit der NR-Lösung inkubiert.

Das Ergebnis dieses Vorversuches zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den gewählten NR-Konzentrationen gibt. Bei beiden getesteten NR-Konzentrationen unterscheidet sich die Fluoreszenz nach Behandlung mit 1mM FFS signifikant von der Negativkontrolle BSA/DMSO. Für alle weiteren Experimente wurde auf Grund der nicht signifikanten Unterschiede die höhere Konzentration von 3,3µg NR/mL PBS gewählt, da hier eine höhere Genauigkeit in der Herstellung der Lösung gegeben ist.

5.2.2. Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung

Beim Zeitpunkt der Messung nach der Färbung wurden zwei Versuche durchgeführt. Beim ersten Versuch wurde die Fluoreszenz direkt nach der NR-Färbung gemessen. Beim zweiten Versuch wurden die gefärbten Zellen für 22 Stunden bei Raumtemperatur in PBS dunkel gelagert und erst anschließend die Messung der Fluoreszenz durchgeführt.

Bei der Messung direkt nach der Färbung war ein Anstieg der Fluoreszenz mit steigender FFS-Konzentration in der Behandlung zu erkennen.

Bei der Messung nach 22 Stunden Lagerung in PBS konnte jedoch ein erhöhter Anstieg, im Vergleich zur sofortigen Messung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Tatsache, dass die Absolutwerte der Fluoreszenz nach längerer Lagerung in PBS angestiegen sind und auch in der Literatur diese Technik angewandt wird, wurden alle weiteren Messungen nach einer Lagerung in PBS durchgeführt.

5.2.3. Top vs. Bottom Reading

Mittels Plate Reader kann die Fluoreszenz auf verschiedene Arten gemessen werden. Unterschieden wird zwischen Top Reading und Bottom Reading. Um herauszufinden welche Methode sensitiver ist, wurde die Fluoreszenz von Zellen nach 24 Stunden Behandlung und 4 Stunden Färbung mit 3,3µg NR/mL PBS in schwarzen µClear 96 Lochplatten auf diese beiden Arten gemessen.

In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass bei beiden Messarten (Top oder Bottom Reading) die NR-Fluoreszenz mit steigenden FFS-Konzentration ansteigt und in beiden Fällen die Behandlung mit 1mM FFS signifikant von der Negativkontrolle unterschieden ist (Daten nicht gezeigt).

Beim Bottom Reading der 96 Lochplatte kann während der Messung der Deckel der 96 Lochplatte auf der Platte verbleiben, weshalb die Sterilität der Platte länger gewährleistet

ist. Hingegen muss beim Top Reading die Plattenabdeckung entfernt werden. Dadurch ist die Platte nicht mehr steril. Um die Sterilität länger aufrechtzuerhalten, wurde für folgende Experimente eine Bottom Messung herangezogen.

5.2.4. Art der 96 Lochplatte – μ Clear Schwarz oder Transparent

Des Weiteren wurde getestet welche Art der 96 Lochplatte für diese Methode am sensitivsten und somit am besten geeignet ist. Jeweils ein Versuch wurde mit einer transparenten 96 Lochplatte von VWR und einer μ Clear Black Cellstar 96 Lochplatte durchgeführt. Bei beiden Platten wurden die Zellen 24 Stunden behandelt und anschließend 4 Stunden mit 3,3 μ g NR/mL PBS gefärbt. Gemessen wurde die Fluoreszenz mit einem Gain von 90% und einer Extinktionswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm.

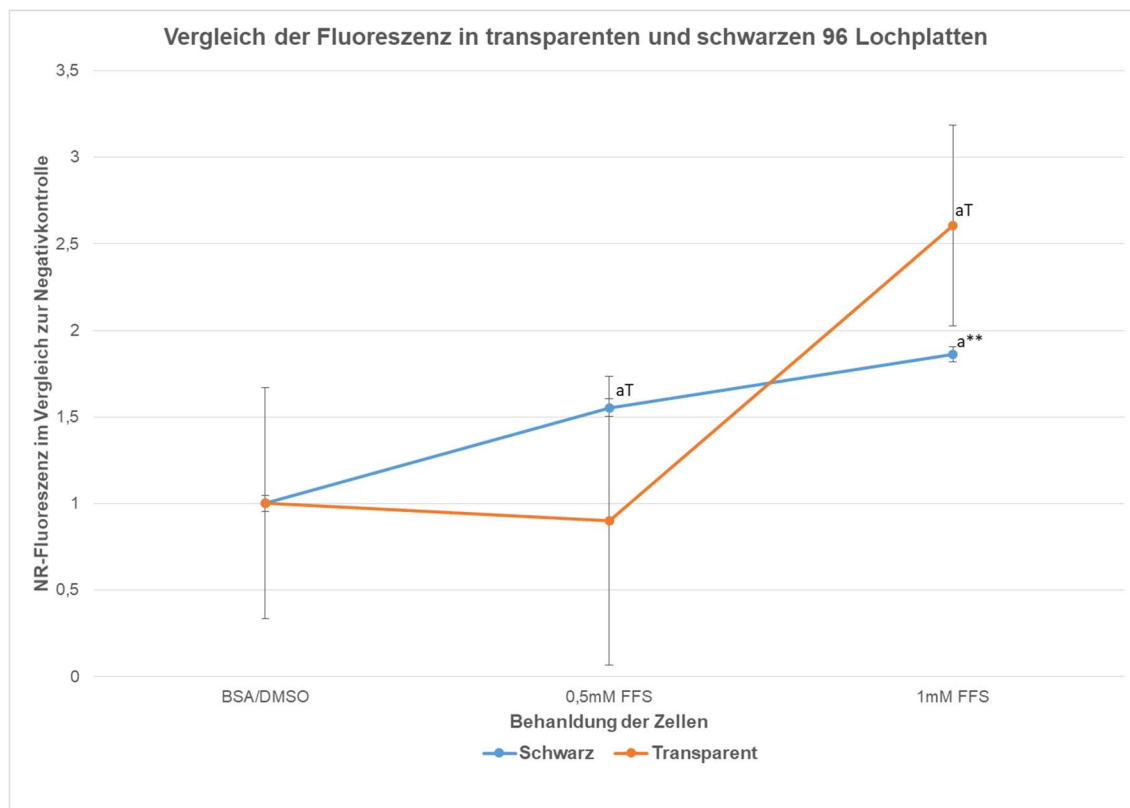


Abbildung 23: Vergleich der NR-Fluoreszenz bei der Verwendung von transparenten bzw. schwarzen μ Clear 96 Lochplatten

Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels t-Test (bei normalverteilten Daten) bzw. Mann-Whitney-U-Test (bei nicht normalverteilten Daten) beim Vergleich der unterschiedlichen Platten berechnet. Die Signifikanzen im Vergleich zur Negativkontrolle wurden mittels ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: a**= $p \leq 0,01$, a*= $p \leq 0,05$, aT= $p \leq 0,1$.

Abbildung 23 zeigt den Vergleich der NR-Fluoreszenz in unterschiedlichen 96 Lochplatten. Getestet wurde eine transparente 96 Lochplatte von VWR und eine schwarze µClear 96 Lochplatte von Cellstar.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass bei der Messung in der schwarzen 96 Lochplatte das erwartete Ergebnis auftritt. Die NR-Fluoreszenz steigt mit steigender Konzentration an FFS an. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Standardabweichungen der abhängigen Replikate bei dieser Plattenart relativ klein sind.

Bei der Messung in der transparenten 96 Lochplatten sind sehr starke Schwankungen der Fluoreszenzen innerhalb der Behandlungen zu erkennen. Des Weiteren ist der erwartete Verlauf der steigenden Fluoreszenz bei steigender FFS-Konzentration nicht erkennbar. Es wird vermutet, dass die transparente Platte autofluoreszent ist und somit die Messung in der transparenten 96 Lochplatte für diesen Versuch nicht geeignet ist.

5.2.5. Verwendung von Formaldehyd

Durch die Verwendung von Formaldehyd können die Zellen in den Wells fixiert werden, wodurch gewährleistet wird, dass die metabolische Aktivität der Zellen nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit gestoppt wird. Dies ist vor allem bei den kurzen Inkubationszeiten von großer Relevanz.

Laut Literatur kann die Färbung mit NR bei fixierten und nicht fixierten Zellen durchgeführt werden (Greenspan et al., 1985). Um sicherzustellen, dass dies auch auf die C2C12 Zelllinie zutrifft, wurden 2 Versuche der gleichen Inkubationszeit verglichen, wobei die Zellen bei einem der beiden Versuche mit Formaldehyd behandelt wurden.

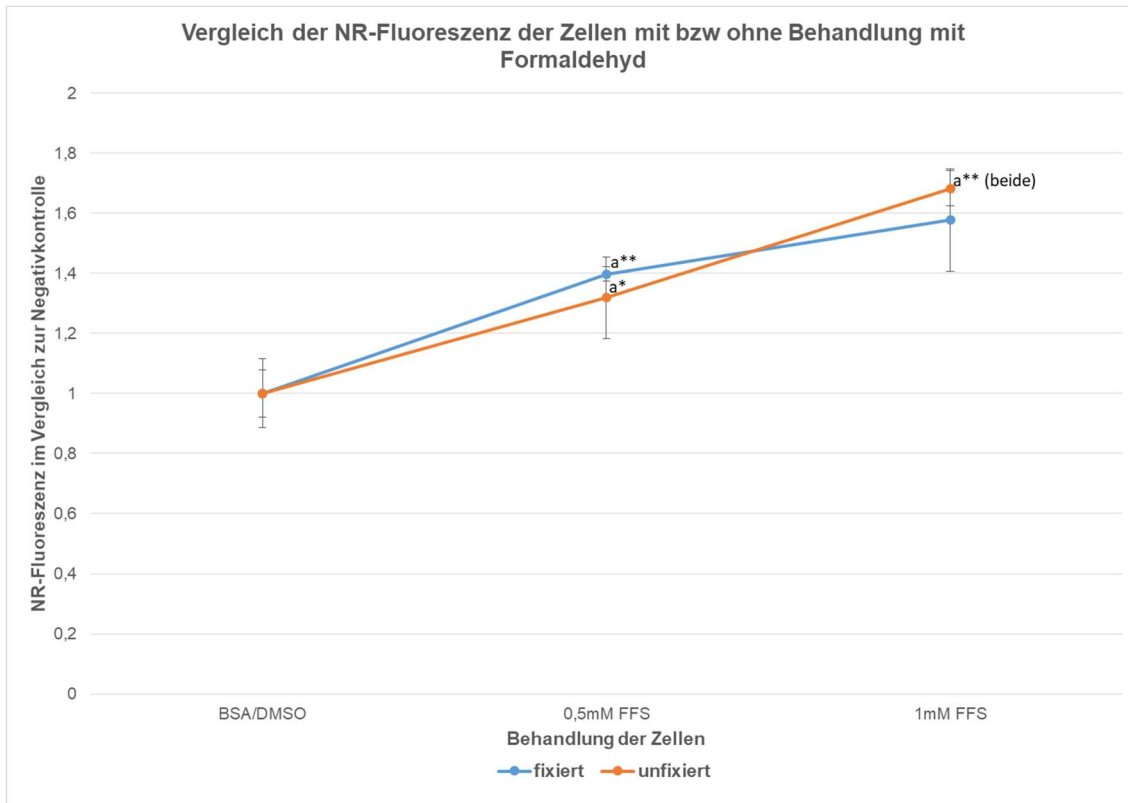


Abbildung 24: Vergleich der NR-Fluoreszenz von Zellen mit bzw. ohne Behandlung von Formaldehyd

Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen zwischen den verschiedenen Methoden wurden mittels t-Test (bei normalverteilten Daten) bzw. Mann-Whitney-U-Test (nicht normalverteilte Daten) berechnet. Die Signifikanzen im Vergleich zur Negativkontrolle wurden mittels ANOVA, Bonferroni (normalverteilte Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^{*}=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm.

Abbildung 24 zeigt den Vergleich der NR-Fluoreszenz von Zellen welche mit Formaldehyd fixiert wurden und welche nicht fixiert wurden. Die Zellen von beiden Platten wurden 24 Stunden behandelt und 4 Stunden mit $3,3\mu\text{g NR/mL PBS}$ gefärbt. Zusätzlich wurde eine Platte mit Formaldehyd behandelt, sodass die metabolische Aktivität der Zellen gestoppt wurde. Sowohl bei fixierten als auch bei nicht fixierten Zellen ist das Muster der steigenden NR-Fluoreszenz bei steigender FFS-Konzentration zu erkennen. Weiters ist in der Abbildung ersichtlich, dass es zwischen der NR-Fluoreszenzen der fixierten und der nicht fixierten Zellen keine Unterschiede gibt. Dieses Ergebnis zeigt uns, dass die Behandlung mit Formaldehyd keinen Einfluss auf die NR-Fluoreszenz hat und somit die nachfolgenden Experimente und Fluoreszenz-Messung nach Fixierung der Zellen stattfinden können.

5.2.6. Anzahl der Messungen pro Well

Bei der Einstellung des Plate Readers zur Messung der NR-Fluoreszenz gibt es die Möglichkeit, die Anzahl der Messungen pro Well zu bestimmen. Im Folgenden wurden 9 bzw. 4 Messungen pro Well getestet und miteinander verglichen.

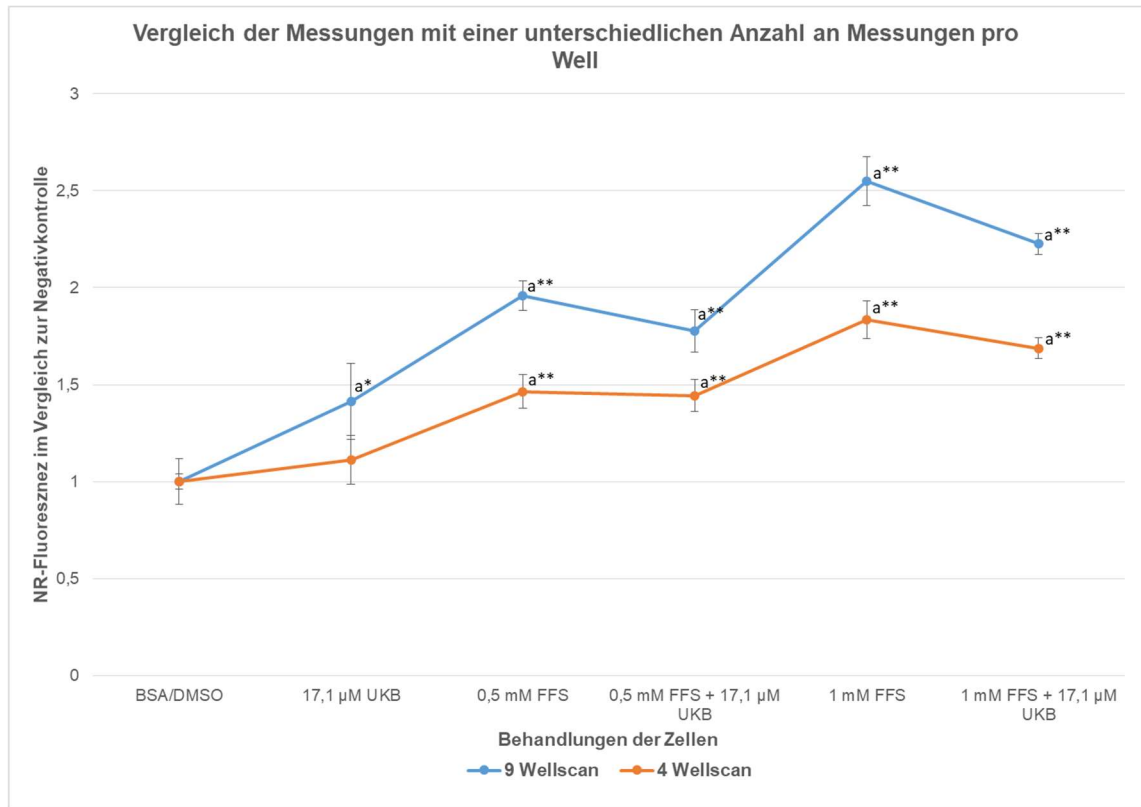


Abbildung 25: Vergleich der Messungen pro Well bei der Bestimmung der NR-Fluoreszenz. Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen im Vergleich zur Negativkontrolle wurden mittels ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^*=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm mittels mit 9 bzw. 4 Messungen pro Well.

In Abbildung 25 wird der Vergleich von 9 bzw. 4 Messungen pro Well bei der Messung der NR-Fluoreszenz gezeigt. Die Zellen wurden vor der Messung 24 Stunden behandelt, fixiert und anschließend mit NR gefärbt.

In der Abbildung ist zu sehen, dass sowohl bei 9 als auch bei 4 Messungen pro Well ein ähnliches Muster zu erkennen ist. Bei beiden steigt die NR-Fluoreszenz mit steigender FFS-Konzentration (unabhängig von UKB) signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle an. Dieses Ergebnis zeigt uns, dass beide Varianten zur Messung der NR-Fluoreszenz möglich sind. Der 9 Well Scan scheint jedoch sensibler zu sein (höhere Werte im Vergleich zur Negativkontrolle beim 9 Well Scan).

5.2.7. Konzentrationen der Behandlungen

Zu Beginn unserer Versuche wurden die Konzentrationen 0,1mM FFS, 0,5mM FFS und 1mM FFS und UKB-Konzentrationen 0,1µM, 1µM, 10µM und 17,1µM und deren Kombination getestet. Es hat sich nach einigen Versuchen herausgestellt, dass nicht alle Konzentrationen für unser Experiment relevant sind.

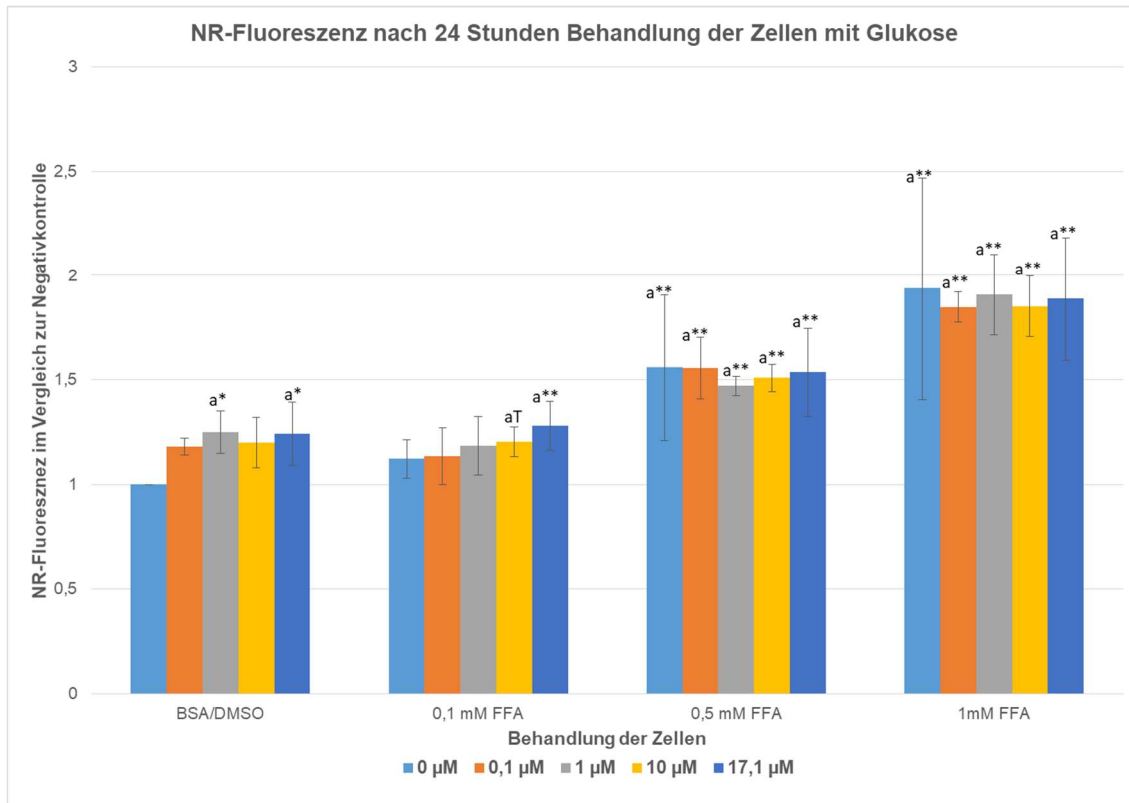


Abbildung 26: Vergleich aller für 24 Stunden getesteten Behandlungen
Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 x 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen im Vergleich zur Negativkontrolle wurden mittels ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^*=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm mittels mit 9 Messungen pro Well und 90% Gain.

Abbildung 26 zeigt den Vergleich aller Behandlungen die getestet wurden. Die Ordinate zeigt die NR-Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO, die Abszisse zeigt die getesteten Behandlungen der Zellen.

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass sich die Behandlung mit einer geringen FFS-Konzentration (0,1mM FFS) größtenteils nicht von der Negativkontrolle BSA/DMSO unterscheidet, weshalb diese FFS-Konzentration für weitere Experimente nicht mehr herangezogen wurde, da hier die Unterschiede zu klein sind. Die höheren FFS-Konzentrationen 0,5mM FFS und 1mM FFS hingegen unterscheiden sich signifikant von

der Negativkontrolle BSA/DMSO und wurden deshalb auch in allen folgenden Versuchen getestet.

Innerhalb einer FFS-Konzentration gibt es zwischen den unterschiedlichen UKB-Konzentrationen keine Unterschiede. Lediglich bei der Behandlung ohne FFS unterscheiden sich die Konzentrationen 1 μ M und 17,1 μ M UKB signifikant von der Negativkontrolle.

Aufgrund der nur kleinen Unterschiede zwischen den UKB-Konzentrationen wurde für folgende Versuche nur die UKB-Konzentration von 17,1 μ M herangezogen, auch weil diese Konzentrationen der Grenzwert zur Bestimmung des GS darstellt.

5.2.8. Vorinkubationsexperiment

Es wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Zellen zuerst 1 bzw. 24 Stunden mit BSA/DMSO bzw. 17,1 μ M UKB vorinkubiert und erst nach Ablauf dieser Inkubationszeit mit FFS behandelt wurden. Es wurde eine 2mM FFS-Lösung zu den mit BSA/DMSO bzw. mit 17,1 μ M UKB behandelten Zellen gegeben, sodass die Endkonzentration von FFS auf den Zellen bei 1mM lag. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten oder 120 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert um die metabolische Aktivität zu stoppen und mit NR gefärbt.

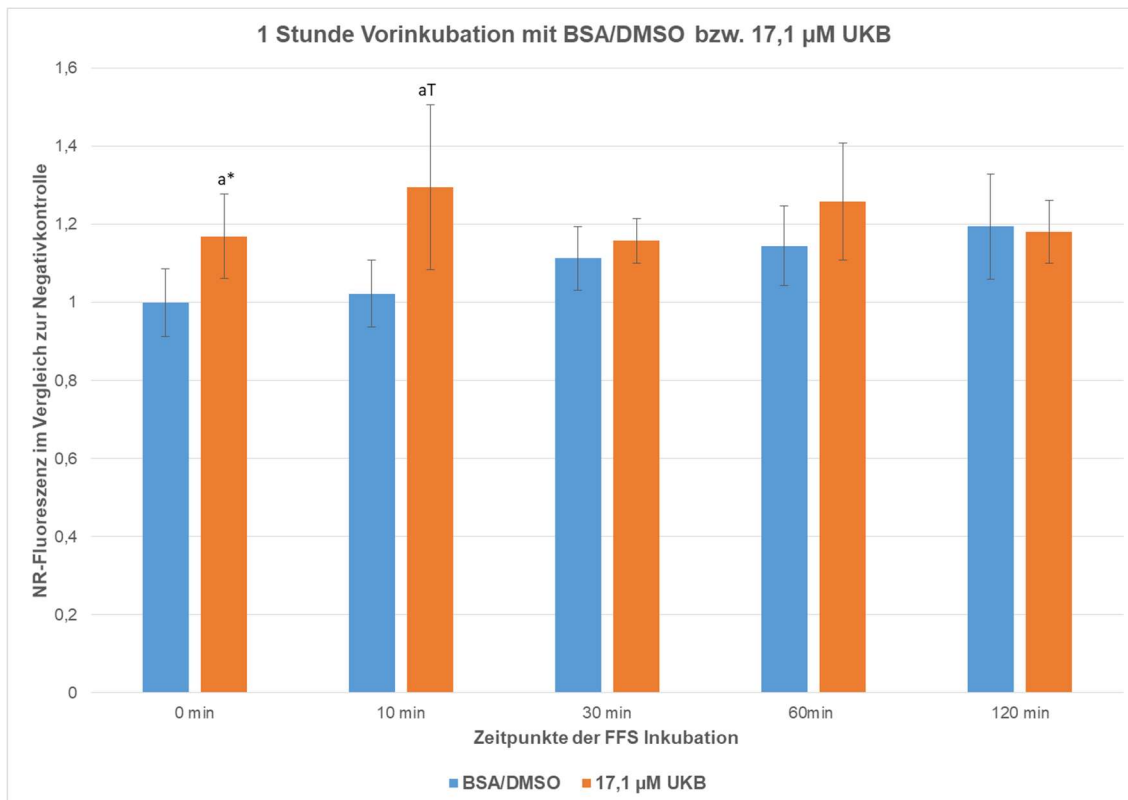


Abbildung 27: NR-Fluoreszenz nach 1 Stunde Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB und anschließender Behandlung mit FFS

Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen im Vergleich zur Negativkontrolle wurden mittels ANOVA, Bonferroni (normalverteilte Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (nicht normalverteilte Daten) berechnet. Die Signifikanzen zwischen der Behandlung mit bzw. ohne UKB wurden mittels t-Test (bei normalverteilten Daten) bzw. Mann-Whitney-U-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede bei einer FFS-Inkubationszeit zwischen der Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^{*}=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm mittels mit 9 Messungen pro Well und 90% Gain.

Abbildung 27 zeigt die NR-Fluoreszenz nach einer einstündigen Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB mit Glukose und einer anschließend FFS-Behandlung (die resultierende FFS-Konzentration auf den Zellen lag bei 1mM FFS).

Nach einer Stunde Vorbehandlung gibt es nach 0 und 10 Minuten Behandlung mit FFS einen signifikanten Unterschied der NR-Fluoreszenz zwischen den Zellen welche mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB vorbehandelt wurden.

Die Fluoreszenz der Zellen nimmt jedoch mit einer längeren FFS-Behandlung (länger als 10 Minuten) im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant zu.

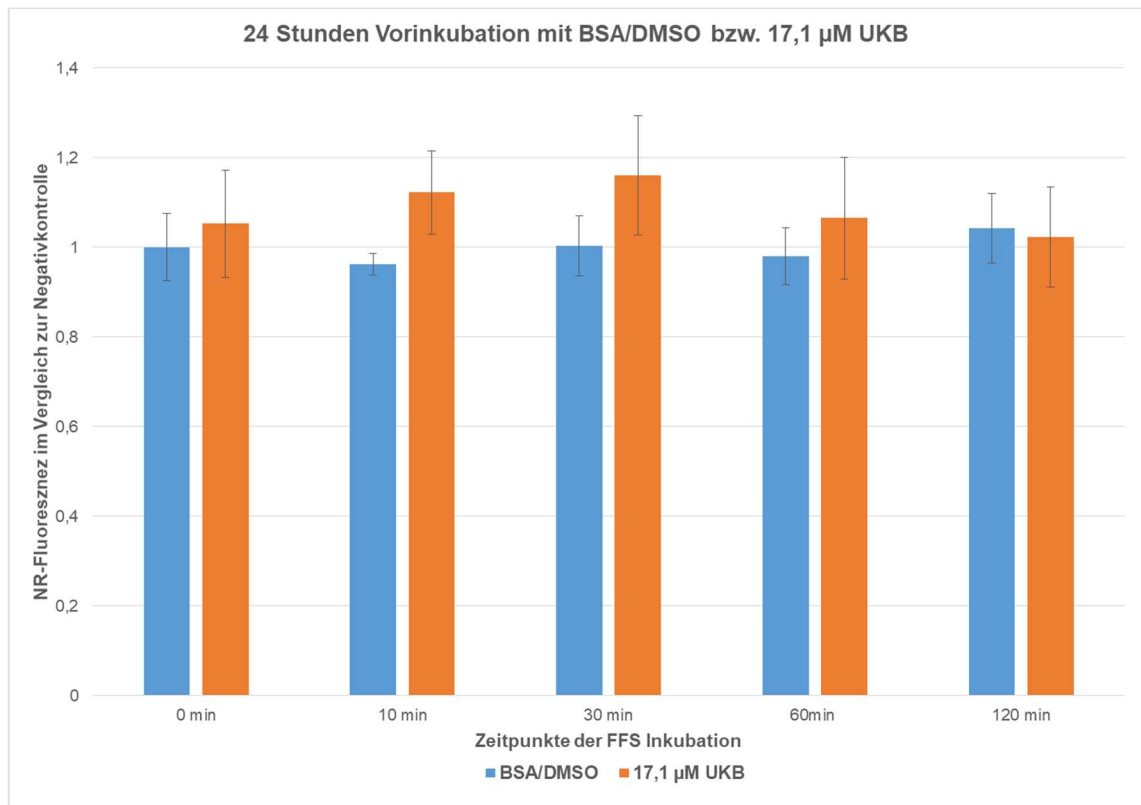


Abbildung 28: NR-Fluoreszenz nach 24 Stunden Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB und anschließender Behandlung mit FFS
 Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen im Vergleich zur Negativkontrolle wurden mittels ANOVA, Bonferroni (bei normalverteilten Daten) bzw. Kruskal-Wallis-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. Die Signifikanzen zwischen der Behandlung mit bzw. ohne UKB wurden mittels t-Test (bei normalverteilten Daten) bzw. Mann-Whitney-U-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede bei einer FFS-Inkubationszeit zwischen der Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^{*}=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm mittels mit 9 Messungen pro Well und 90% Gain.

Abbildung 28 zeigt die NR-Fluoreszenz nach 24 Stunden Vorbehandlung mit BSA/DMSO bzw. 17,1µM UKB und einer anschließenden Behandlung mit FFS (die resultierende FFS-Konzentration auf den Zellen lag bei 1mM FFS).

Im Vergleich zu dem Versuch mit nur einer Stunde Vorbehandlung gibt es nach einer 24-stündigen Vorbehandlung keine signifikanten Unterschiede unabhängig davon, ob die Zellen mit BSA/DMSO oder 17,1µM UKB vorbehandelt wurde und unabhängig davon, wie lange die Zellen mit 1mM FFS behandelt wurden.

Das 1 Stunde und 24 Stunden UKB-Vorinkubations-Experiment zeigt, dass die Fettakkumulation innerhalb von 10 – 60 Minuten FFS Inkubation bei den mit UKB vorinkubierten Zellen zunimmt und nach 120 Minuten wieder abnimmt bzw. sich an die

Negativkontrolle anpasst. Dies könnte darauf hinweisen, dass nach 10 – 60 Minuten die Fettaufnahme zunimmt und nach 120 Minuten die intrazelluläre Lipidverwertung bei den UKB-behandelten Zellen zunimmt.

Dieses Muster der erniedrigten Fluoreszenz bei den mit UKB behandelten Zellen im Vergleich zu Zellen welche ohne UKB behandelt wurden (bei derselben FFS-Konzentrationen) ist bei den Experimenten mit Glukose bereits ab einer Inkubationszeit von 30 Minuten zu erkennen (siehe Abbildung 10).

5.2.1. Fluoreszenzmessung bei 60% bzw. 90% Gain

Da die Autofluoreszenz der Zellen vor der eigentlichen NR-Fluoreszenz mit den gleichen „Gain-Einstellungen“ gemessen werden musste, wurde ein Versuch durchgeführt, um die passende Gain-Einstellung zu definieren. Die NR-Fluoreszenz nach 1mM FFS Behandlung wurde mit einem Gain von 90% und 60% gemessen.

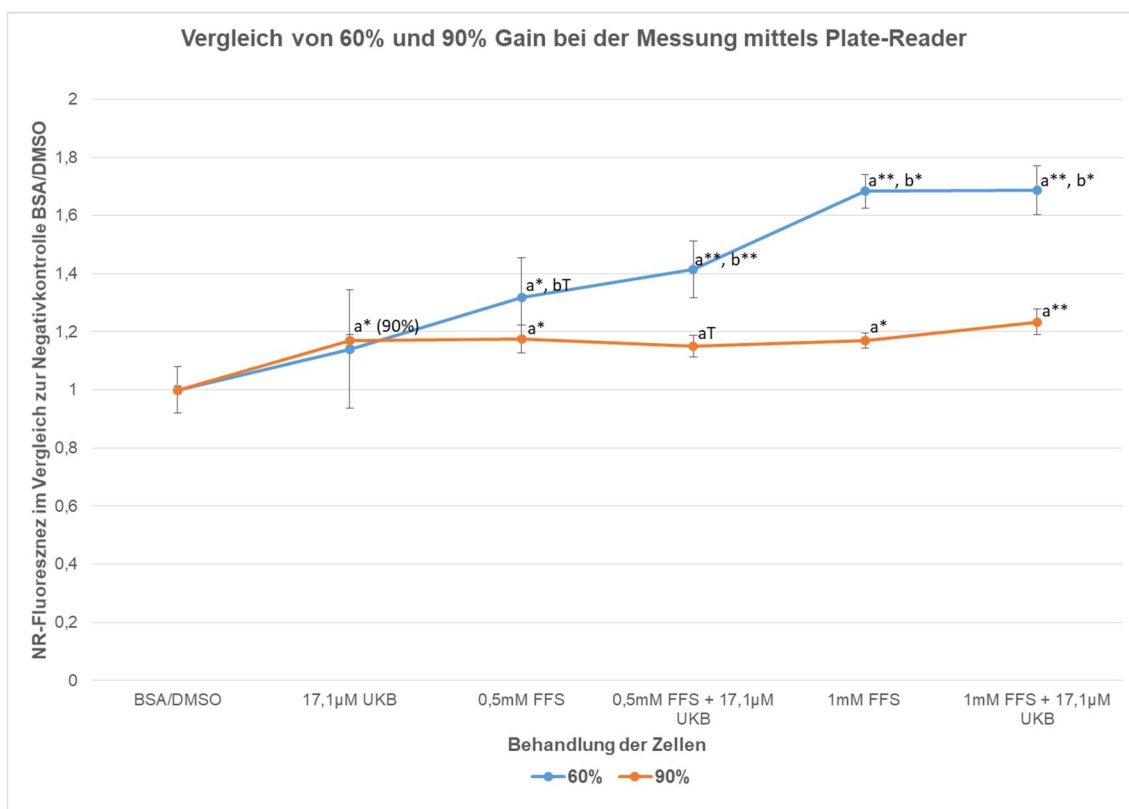


Abbildung 29: Vergleich der Messung bei 60% bzw. 90% Gain nach 24 Stunden Inkubation mit der Behandlung

Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 abhängigen Replikaten. Die Signifikanzen wurden mittels t-Test (bei normalverteilten Daten) bzw. Mann-Whitney-U-Test (bei nicht normalverteilten Daten) berechnet. a zeigt die Unterschiede zur Negativkontrolle: $a^{**}=p\leq 0,01$, $a^*=p\leq 0,05$, $aT=p\leq 0,1$. b zeigt die Unterschiede zwischen 60% und 90% Gain: $b^{**}=p\leq 0,01$, $b^*=p\leq 0,05$, $bT=p\leq 0,1$. Gemessen wurde die NR-Fluoreszenz mit den Wellenlängen Extinktion 485nm und Emission 590nm.

In Abbildung 29 wird der Unterschied der NR-Fluoreszenz-Messung mit 60% bzw. 90% Gain dargestellt.

Sowohl bei 60% als auch bei 90% Gain ist eine Steigerung der Fluoreszenz mit steigender FFS-Konzentration in der Behandlung nach einer Inkubation von 24 Stunden erkennbar. Jedoch ist sichtbar, dass bei der Messung mit 60% Gain der Anstieg der Fluoreszenz mit steigender FFS-Konzentration eindeutiger zu erkennen ist als bei der Messung mit 90% Gain. Dies liegt daran, dass die gemessenen Absolutwerte der Fluoreszenz bei 90% Gain die Messgrenzen des Plate-Readers erreichten und somit die Sensitivität für Unterschiede zwischen den FFS-Konzentrationen nicht mehr gegeben ist. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Experimente mit der Gain-Einstellung von 60% (eingestellt bei Zellen welche mit 1mM FFS behandelt wurden, da hier die stärkste Fluoreszenz erwartet wurde) durchgeführt.

6. Diskussion und Schlussfolgerung

Im *in vitro* Versuch wurde an C2C12 Zellen getestet, ob UKB einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus hat. Hierfür wurde zuerst getestet, ob die metabolische Aktivität der Zellen durch die geplanten Behandlungen und Inkubationszeiten negativ beeinflusst wird. Dies wurde mittels MTT-Assay überprüft und dabei festgestellt, dass die metabolische Aktivität der Zellen nach der gewünschten maximalen Inkubationszeit weiterhin gegeben ist, und somit die eingesetzten Konzentrationen für diesen Versuch geeignet sind. Dieses Ergebnis trifft sowohl für die Behandlungen mit Glukose (4,5g/L) als auch für die normoglykämischen (0,9g/L) und glukosefreien Behandlungen zu. Lediglich bei der Behandlung BSA/DMSO + 0,5mM AICAR ohne Glukose liegt die Zellviabilität nach 5 Stunden Behandlung nur noch bei 79% im Vergleich zur Negativkontrolle und somit knapp an der Grenze von 80%.

Mittels NR-Assay wurde die Fettaufnahme in die Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten und mit verschiedenen FFS-Konzentrationen in Anwesenheit und Abwesenheit von UKB untersucht. Die Behandlungen dieser Zellen wurden wiederum sowohl mit Glukose (4,5g/L), ohne Glukose und unter normoglykämischen Bedingungen (0,9g/L) durchgeführt. Diese unterschiedlichen Glukosemengen in den Behandlungen waren notwendig um ausschließen bzw. festhalten zu können, ob bei FFS-Mangel Glukose als Lipidtröpfchen in den Zellen gespeichert wird.

Bei den Zellen welche mit Glukose, FFS und mit bzw. ohne UKB behandelt worden sind, hat sich gezeigt, dass über alle Inkubationszeiten das Muster zu erkennen ist, dass die NR-Fluoreszenz und somit die Lipidakkumulation in den Zellen nach der Behandlung mit UKB im Vergleich zur Fluoreszenz der Zellen, welche mit derselben Menge an FFS jedoch ohne UKB behandelt wurden, etwas erniedrigt ist. Nach 12 Stunden Behandlung ist bei der Behandlung mit 0,5mM FFS + 17,1µM UKB die Fluoreszenz im Vergleich zu den Zellen welche nur mit 0,5mM FFS behandelt wurden signifikant erniedrigt. Entgegen unserer Hypothese war die NR-Fluoreszenz welche mit 1mM FFS + 0,5mM AICAR behandelt wurden im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht.

Bei den Zellen welche ohne Glukose, mit FFS und mit bzw. ohne UKB behandelt worden sind, gibt es nach 5 Stunden Inkubation und der Konzentrationen 0,5mM FFS und 1mM FFS eine signifikante Reduktion der NR-Fluoreszenz bei den Behandlungen mit UKB. Folglich also eine geringere Anzahl an Fetttröpfchen in den Zellen. Bei den Behandlungen mit 0,5mM AICAR zeigen sich sehr starke Schwankungen in der NR-Fluoreszenz vor allem bei der Behandlung BSA/DMSO + 0,5mM AICAR. Bei dieser

Behandlung hat sich jedoch schon beim MTT-Test gezeigt, dass die metabolische Aktivität der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle abnimmt, was erklären könnte, warum diese Behandlung in unseren NR-Versuchen nicht funktioniert.

Es konnte festgestellt werden, dass die Zellviabilität von C2C12 Zellen ab 12 Stunden Glukoseentzug stark schwankt, was darauf hindeutet, dass die Zellen diese lange Zeitspanne ohne Glukose nicht unbeschadet überstehen und somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse abnimmt.

Bei der Behandlung unter normoglykämischen Bedingungen zeigt sich nach 30 Minuten und 5 Stunden Inkubation ein gegenläufiges Muster zu jenem, welches wir bei den Behandlungen mit bzw. ohne Glukose erkennen konnten. Hier ist die NR-Fluoreszenz bei den Behandlungen mit UKB leicht erhöht im Vergleich zur Fluoreszenz der ohne UKB behandelten Zellen. Erst ab einer Inkubationszeit von 12 Stunden ist wieder ein Muster erkennbar, dass die NR-Fluoreszenz bei den mit UKB behandelten Zellen leicht gesenkt ist im Vergleich zu den Zellen welche mit derselben Menge an FFS jedoch ohne UKB inkubiert wurden.

In der Studie von Hinds et al., 2017 wurde im Tierversuch an Mäusen gezeigt, dass trotz einer fettreichen Diät die Lipidakkumulation in der Leber bei den Mäusen mit erhöhten UKB-Konzentrationen im Plasma gesenkt ist (Hinds et al., 2017).

In den im Rahmen dieser Masterarbeit durchgeführten NR-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die NR-Fluoreszenz nach der Behandlung mit UKB leicht gesenkt bzw. zum Teil signifikant gesenkt ist im Vergleich zur NR-Fluoreszenz der Zellen welche mit derselben Menge an Fett und ohne UKB behandelt wurden.

Ebenfalls wurde im Review von Bulmer et al., 2013 aufgezeigt, dass bei Personen mit GS die Gesamt-Blutfettwerte im Vergleich zur Negativkontrolle (Personen ohne GS) niedriger sind (Bulmer et al., 2013). Wie unter Punkt 2.2 bereits erwähnt, konnte auch durch Mölzer et al., 2016 gezeigt werden, dass Personen mit GS gesenkte Triglyceridewerte im Vergleich zur Personen ohne GS aufweisen (Mölzer et al., 2016)

Diese Ergebnisse könnten von ähnlichen Effekten abgeleitet werden. Zwei mögliche Gründe können dafür in Betracht gezogen werden. Zum einen könnte das bedeuten, dass die Fettaufnahme in die Zellen bei Anwesenheit von UKB niedriger ist als bei Abwesenheit von UKB. Zum anderen könnte es bedeuten, dass durch UKB der Stoffwechsel angekurbelt wird und somit das aufgenommene Fett schneller wieder abgebaut wird.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Masterarbeit gezeigt werden, dass die Proteingehalte nach normoglykämischer Behandlung im Vergleich zu den Proteingehalten nach Behandlung mit Glukose niedriger sind. Bei einer Inkubationszeit von 12 Stunden sind die Proteingehalte nach Behandlung mit Glukose mit bzw. ohne FFS annähernd gleich. Hingegen gibt es nach dieser Inkubationszeit bei normoglykämischer Behandlung einen signifikanten Unterschied der Proteinmenge nach fettfreier Behandlung (BSA/DMSO) bzw. Behandlung mit 1mM FFS. Die Proteinmenge der mit FFS behandelten Zellen ist hier erhöht im Vergleich zu BSA/DMSO.

Dies deutet darauf hin, dass die normoglykämische Behandlung für die C2C12 Zelllinie bei Inkubationszeiten welche länger als 12 Stunden sind nicht geeignet ist. Vor allem bei der fettfreien und somit nährstoffärmeren Negativkontrolle BSA/DMSO.

6.1. Weiterer Forschungsbedarf

Um die Hypothese, dass die UKB einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat, besser stützen zu können, müssen in Zukunft noch einige Versuche durchgeführt werden. Zum einen könnte der NR-Versuch noch mit einer anderen Zelllinie durchgeführt werden um überprüfen zu können, ob sich der Effekt der gesenkten Fluoreszenz und somit der geringeren Lipidakkumulation nach Behandlung mit UKB auch bei anderen Zellen zeigt.

Weiters muss untersucht werden, ob durch UKB die Fettaufnahme in die Zelle reduziert wird bzw. ob dieselbe Menge an FFS in die Zellen aufgenommen wird, durch UKB jedoch der intrazelluläre Fettabbau beschleunigt wird.

Ein weiterer Aspekt welcher für zukünftige Forschungsarbeiten interessant sein könnte ist festzustellen in welcher Menge UKB in die Zellen aufgenommen werden kann.

7. Zusammenfassung

An C2C12 Zellen wurde im *in vitro* Versuch die Hypothese getestet, dass UKB einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat. Dazu wurden für die Behandlung der Zellen zwei FFS Konzentrationen (0,5mM und 1mM) und eine UKB Konzentration (17,1µM) gewählt. Weiters wurden die Behandlungen mit Glukose (4,5g/L), mit normoglykämischen Glukosegehalt (0,09g/100mL) und ohne Glukose getestet.

Nachdem mittels MTT festgestellt wurde, dass die gewählten Behandlungen die metabolische Aktivität der Zellen nicht negativ beeinflussen, wurde die Fettakkumulation in den Zellen mittels NR Fluoreszenzfärbung gemessen und getestet.

Nach der Behandlung der Zellen mit Glukose, FFS (0,5mM und 1mM) und mit bzw. ohne UKB (17,1µM) konnte gezeigt werden, dass die NR-Fluoreszenz mit zunehmender Inkubationsdauer und zunehmender FFS-Konzentration in der Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO ansteigt. Im Vergleich zur Negativkontrolle tritt dieser Anstieg sowohl bei der Anwesenheit als auch bei der Abwesenheit von UKB auf. Vergleicht man allerdings die Behandlungen mit gleichbleibender FFS-Konzentration (0,5mM bzw. 1mM FFS) so ist erkennbar, dass bei Anwesenheit von 17,1 µM UKB die NR-Fluoreszenz im Vergleich zur Behandlung ohne UKB und derselben FFS-Konzentration gesenkt ist.

Bei der Behandlung ohne Glukose konnte gezeigt werden, dass die Zellviabilität der C2C12 Zellen ab einer Inkubationsdauer von 12 Stunden stark schwankt. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen einen Glukoseentzug dieser Dauer nicht unbeschadet überstehen. Wieder konnte gezeigt werden, dass die NR-Fluoreszenz nach Behandlung mit UKB gleich bleibt oder sinkt im Vergleich zur selben FFS-Konzentration ohne UKB. Jedoch ist das Muster nach einer Behandlung ohne Glukose nicht so eindeutig wie im Vergleich zu den Ergebnissen nach Behandlung mit Glukose.

Nach einer Inkubation unter normoglykämischen Bedingungen zeigt sich nach 0,5 Stunden und 5 Stunden entgegen den Erwartungen, dass die Fluoreszenz nach Behandlung mit UKB im Vergleich zur Behandlung ohne UKB ansteigt. Erst ab einer Inkubationszeit von 12 Stunden ist wieder das erwartete Muster zu beobachten. Die NR-Fluoreszenz bei den mit UKB behandelten Zellen fällt geringer aus. Es wurde allerdings auch festgestellt, dass die Proteingehalte nach dem normoglykämischen Treatment stärker schwanken als nach den Behandlungen mit bzw. ohne Glukose und somit

anzunehmen ist, dass die normoglykämischen Bedingungen für diese Zelllinie nicht geeignet sind.

Diese Ergebnisse der erniedrigten NR-Fluoreszenz nach Behandlung mit UKB im Vergleich zur selben FFS Konzentration ohne UKB könnte zwei Gründe haben. Erstens könnte durch die Anwesenheit von UKB die Fettaufnahme in die Zellen reduziert sein und zweitens wäre es möglich, dass das aufgenommene Fett durch die Anwesenheit von UKB schneller wieder abgebaut wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass UKB einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat. Die Klärung der Frage, ob UKB nun die Fettaufnahme in die Zelle, oder aber den Fettabbau in der Zelle beeinflusst, bedarf weiterer über den Rahmen dieser Masterarbeit hinausgehender Forschungsarbeit.

8. Abstract

With the cell line C2C12 it was tested *in vitro* whether the hypothesis that UCB has an influence on the lipid metabolism is correct. For the experiment we chose two different concentration of free fatty acids (FFA) (0.5mM and 1mM) and 17.1µM UCB. Furthermore, the treatments were tested with glucose (4.5g/mL), normoglycemic (0.09g/mL) and without glucose.

After we found out by MTT that the chosen treatments did not influence the cell viability in a negative way the lipid accumulation in the cells was tested with NR fluorescence staining.

After treatment of cells with glucose, FFA (0.5mM and 1mM) and with or without 17.1µM UCB it was shown that the NR fluorescence increases with increasing incubation time and increasing FFA concentration in the treatment, compared to the negative control BSA/DMSO. This pattern occurs regardless of the presence of UCB. Furthermore, it was shown that the NR fluorescence is reduced after treatment with UCB and a constant FFA concentration in comparison with the fluorescence after treatment without UCB.

For the treatment without glucose the cell viability of the C2C12 cells shows a wide variation after an incubation of 12 hours. This indicates that the cells do not survive such a long time without glucose. Again it was shown that the NR fluorescence remains the same or decreases after treatment with UCB compared to the same FFA concentration without UCB. However, the pattern after treatment without glucose is not as clear as compared to the results after treatment with glucose.

After normoglycemic treatment we found a contrary pattern after 0.5 hours and 5 hours of incubation. The fluorescence after treatment with UCB increases in comparison to the treatment without UCB. Only after 12 hours of incubation the usual pattern of decreased NR fluorescence after treatment with UCB in comparison with treatment without UCB was shown.

Additionally, we figured out that levels of protein after normoglycemic treatment vary more than after treatments with or without glucose. So we assume that normoglycemic conditions are not appropriate for this cell line.

These results of decreased NR fluorescence after treatment with UCB compared to the same FFA concentration without UCB may have two causes. The presence of UCB could

either decrease the absorption of fat into cells, or increases reduction of the absorbed fat in cells.

In conclusion, it could be shown that UCB has an influence on lipid metabolism. Future work should now determine whether UCB affects the fat absorption or the fat reduction in cells.

9. Referenzen

- Berridge, Michael V., Herst, Patries M., Tan, An S. „Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.“ *Biotechnology annual review* 2005: 127-152. 11.
- Bonnett, R., Davies, J.E., Hursthouse, M. B. Sheldrick, G.M. „The structure of bilirubin.“ *Proceeding of the Royal Society of London B*. 1978: 249-268. 202.1147.
- Bradford, Marion M. „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding.“ *Analytical biochemistry* 1976: 248-254. 72.1-2.
- Bulmer, A.C., Verkade, H.J., Wagner, K.-H. „Bilirubin and beyond: a review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection.“ *Progress in Lipid Research* 2013: 193-205. 52.2.
- „C2C12 (ATCC® CRL-1772™) .“ 18. Dezember 2017. *Product Sheet*.
<https://www.lgcstandards-atcc.org/~ps/CRL-1772.ashx>. 05. März 2018.
- Chowdhury, Namita Roy, Chowdhury, Jayanta Roy. „Disorders of bilirubin metabolism.“ *The Liver: Biology and Pathobiology, Fifth Edition* 2009: 251-256.
- De Almeida, I. Tavares, Cortez-Pinto, H., Fidalgo, G., Rodrigues, D., Camilo, M.E. „Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis.“ *Clinical nutrition* 2002: 219-223. 21.3.
- Feoktistova, Maria, Peter Geserick und Martin Leverkus. „Crystal violet assay for determining viability of cultured cells.“ *Cold Spring Harbor Protocols* 2016. 4.
- Greenspan, Phillip, Mayer, Eugene P., Fowler, Stanley D. „Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.“ *The Journal of cell biology* 1985: 965-973. 100.3.
- Heirwegh, Karel PM., Fevery, Johan, Blanckaert, Norbert. „Chromatographic analysis and structure determination of biliverdins and bilirubins.“ *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1989: 1-26. 496.

- Hinds, Terry D., Hosick, Peter A., Chen, Shujuan, Tukey, Robert H., Hankins, Michael W., Nestor-Kalinowski, Andrea, Stec, David E. „Mice with hyperbilirubinemia due to Gilbert's syndrome polymorphism are resistant to hepatic steatosis by decreased serine 73 phosphorylation of PPAR α .“ *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2017: E244-E252. 312.4.
- Hirabara, Sandro M., Curi, Rui, Maechler, Pierre. „Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells.“ *Journal of cellular physiology* 2010: 187-194. 222.1.
- Hodson, Leanne, Skeaff, C. Murray, Fielding, Barbara A. „Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake.“ *Progress in lipid research* 2008: 348-380. 47.5.
- Horn, Florian. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2009.
- Khoei, Nazlisadat Seyed, Grindel, Anne, Wallner, Marlies, Mölzer, Christine, Doberer, Daniel, Marculescu, Rodrig, Bulmer, Andrew, Wagner, Karl-Heinz. „Mild hyperbilirubinaemia as an endogenous mitigator of overweight and obesity: Implications for improved metabolic health.“ *Atherosclerosis* 2017: 306-311. 269.
- Latt, Samuel A., Stetten, Gail, Juergens, Lois A., Willard, Huntington F., Scher, Charles D. „Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence.“ *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1975: 493-505. 23.7.
- Liu, Yuanbin, Peterson, Daniel A., Kimura, Hideo, Schubert, David. „Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction.“ *Journal of neurochemistry* 1997: 581-593. 69.2.
- McMahon, Debra K., Anderson, Page A.W., Nassar, Rashid, Bunting, J. Blair, Saba, Ziad, Oakeley, Annette E., Malouf, Nadia N. „C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties.“ *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1994: 1795-1802. 266.6.
- Mölzer, Christine, Wallner, Marlies, Kern, Carina, Tosevska, Anela, Schwarz, Ursula, Zadnikar, Rene, Doberer, Daniel, Marculescu, Rodrig, Wagner, Karl-Heinz. „Features of an altered AMPK metabolic pathway in Gilbert's Syndrome, and its role in metabolic health.“ *Scientific reports* 2016. 6.

- Morales, Pablo Esteban, Bucarey, Jose Luis, Espinosa, Alejandra. „Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins.“ *Journal of diabetes research* 2017.
- Slater, T.F., Swayer, Barbara, Sträuli, Ursula. „Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts.“ *Biochimica et biophysica acta* 1963: 383-393. 77.
- Stockert, Juan C., Blázquez-Castro, Alfonso. Canete, Magdalena, Horobin, Richard W., Villanueva, Ángeles. „MTT assay for cell viability, Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets.“ *Acta histochemica* 2012: 785-796. 114.8.
- Vitek, Libor, Ostrow, J. Donald. „Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects.“ *Current pharmaceutical design* 2009: 2869-2883. 15.25.
- Wagner, Karl-Heinz, Wallner, Marlies, Mölzer, Christine, Gazzin, Silvia, Bulmer, Andrew Cameron, Tiribelli, Claudio. „Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases.“ *Clinical science* 2015: 1-25. 129.1.
- Wang, Xia, Chowdhury, Jayanta Roy, Chowdhury, Namita Roy. „Bilirubin metabolism: applied physiology.“ *Current Paediatrics* 2006: 70-74. 16.1.
- Yaffee, David, Saxel, Ora. „Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle.“ *Nature* 1997: 725. 270.5639.
- Zyriax, Birgit-Christiane, Windler Eberhard. „Lipid disorders and prevention of coronary heart disease.“ *Ernährungs Umschau* 2010: 656-666. 57.12.