INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Anke Ostertag

aus Münster

2009

Molekulare Charakterisierung der Regulation und Funktion der Pseudokinase Tribbles 1 im Fettgewebe

Gutachter: Prof. Dr. Ingrid Grummt

Dr. Stephan Herzig

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Die Adipositas ist eine sich pandemisch ausbreitende Krankheit. Als Ursache für die Adipositas gelten besonders der durch veränderte Lebensbedingungen hervorgerufene Bewegungsmangel und energiereiche Ernährung, aber auch genetische Faktoren. Die damit verbundenen Folgeerkrankungen wie Typ 2 Diabetes, Arteriosklerose und auch Krebs senken nicht nur die Lebenserwartung, sondern sind auch mit hohen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. Die genauen molekularen Vorgänge, die für die Entstehung der Adipositas und ihre Folgeerkrankungen verantwortlich sind, sind noch weitestgehend unbekannt. Eine Folge der Adipositas ist eine subakute Entzündungsreaktion im Fettgewebe. Sie wird durch die Expansion der Fettzellen hervorgerufen und durch die Einwanderung von Makrophagen in das Gewebe verstärkt. Dabei gelangen die von Makrophagen und Adipozyten vermehrt sekretierten Zytokine in die Blutbahn und wirken so auf andere Gewebe. In der Leber und der Skelettmuskulatur rufen sie eine Insulinresistenz hervor, die sich im Gesamtorganismus zum Typ 2 Diabetes entwickeln kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der durch Entzündungsmediatoren regulierten Tribbles-Pseudokinasen, insbesondere TRB1, im Fettgewebe analysiert. So war die Expression von TRB1 im Fettgewebe von diabetischen, adipösen db/db- und ob/ob-Tieren erhöht. Auch im Fettgewebe von Tieren, die nach einer LPS-Injektion an einer akuten systemischen Entzündungsreaktion litten, wurde TRB1 verstärkt exprimiert. Eine nähere Untersuchung ergab, dass die TRB1-Genexpression durch von Makrophagen sezernierte Faktoren und über den JNK-Signalweg sowie über die Aktivierung des NF-κB-Transkriptionsfaktors reguliert wird. Eine Funktionsanalyse von TRB1 in primären Adipozyten durch die Inhibition der TRB1-Expression via adenoviral vermittelter shRNA zeigte, dass TRB1 an der Regulation von proinflammatorischen Genen wie IL-6, IL-1β, IFN-β und TNF-α beteiligt ist. Dies geschieht durch die Rekrutierung von TRB1 an die NF-κB-Bindestelle in dem jeweiligen Promotor dieser Gene. Die positive Regulation der NF-κB abhängigen Transkription durch TRB1 erfolgte über die direkte Interaktion von TRB1 mit der TA-Domäne der p65 Untereinheit des p50/p65-Komplexes. Die Pseudokinase TRB1 wurde in dieser Arbeit als ein neuer Faktor identifiziert, der im Fettgewebe unter proinflammatorischen Bedingungen NF-κB abhängig verstärkt exprimiert wird und als Koaktivator von p65 die Expression proinflammatorischer Gene reguliert.

Abstract

Obesity is a pandemic disease affecting more and more people worldwide. The sedentary lifestyle and high energy intake as well as genetic factors contribute to the development of overweight and obesity. The subsequently developing diseases like Diabetes Type 2, atherosclerosis or cancer decrease life expectancy and life quality, as well as they contribute to the increase in healthcare costs. The molecular pathways and cellular events which are involved in these changes in metabolism and which may contribute to the development of the metabolic syndrome are still under investigation. One effect, caused by obesity, is the subacute systemic inflammation. During the expansion and growth of the adipose tissue, the cells secrete cytokines which activate resident macrophages and recruit more macrophages to the adipose tissue. The inflammatory response increases and cytokines are released into the bloodstream, thereby affecting other tissues, mainly the liver and skeletal muscles and causing insulin resistance, a prerequisite of Diabetes Type 2.

In this context, the Tribbles gene family, which is regulated by pro-inflammatory stimuli, was analyzed in adipose tissue. Interestingly, the expression of TRB1 was upregulated in epididymal fat pads of db/db and ob/ob mice as well as in adipose tissue of mice, suffering from an acute systemic inflammatory response after LPS injection. Further analysis showed, that the gene expression of TRB1 was regulated by factors secreted by macrophages and that the JNK pathway and the NF-κB transcription factor is involved in its regulation. The functional analysis of TRB1 in primary adipocytes by adenoviral induced TRB1-knockdown via a specific shRNA resulted in decreased expression of pro-inflammatory genes, mainly IL-6, IL-1β, IFN-β and TNF-α. Furthermore, TRB1 was recruited to NF-κB sites in the promoter region of these genes. TRB1 positively regulated the NF-κB dependent transcription by interacting with the transactivation domain of the p65 subunit of the p50/p65 dimer.

Summarized, this study identified the pseudokinase TRB1 as a new target of pro-inflammatory stimuli via JNK and NF-κB pathways. TRB1, in turn, serves as a co-activator of p65 by direct interaction and regulates the expression of pro-inflammatory genes in adipocytes. Therefore, the pseudokinase TRB1 was identified as a new molecular player in the sub-acute inflammatory process of adipose tissue during obesity.

Danksagung

Mein Dank gilt Dr. Stephan Herzig für die Bereitstellung der Thematik dieser Dissertation, für seine Unterstützung, Anregungen, Diskussionsbereitschaft und den Glauben an die p65 Interaktion sowie für die Möglichkeit an interessanten Kongressen teilzunehmen.

Desweiteren danke ich Frau Prof. Dr. Ingrid Grummt für die Übernahme der Funktion des Erstgutachters und die anregenden Diskussionen während meiner Vorträge vor dem „Thesis Advisory Committee“.

In diesem Sinne danke ich auch dem weiteren Mitglied des „Thesis Advisory Committee“, Prof. Dr. Andrew Cato, für die Diskussionsbereitschaft und Vorschläge.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Herzig danke ich herzlich für die kollegiale Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank geht an Allan, Adam, Maria und Stephan, die mit ihren Beiträgen zu den Ergebnissen dieser Dissertation beigetragen haben. Anja und Dany danke ich herzlich für ihre technische Hilfe bei Transfektionen, Virusherstellung, Mausexperimenten und Bestellungen. Alex und Mauricio danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung bei den Mausexperimenten sowie für die Bereitstellung von Gewebeproben. Dieser Dank geht auch an Prachiti, Evgeny und Inka. Anna und Ulli danke ich für ihre Kooperation und ihr Durchhaltevermögen im Lentivirusprojekt. Ein herzlicher Dank geht an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Zentgraf für ihre Unterstützung und Ausdauer bei der Antikörpergenerierung. Dr. Susen Becker und ihren Mitarbeiterinnen danke ich für die Möglichkeit den Milliplexassay in ihrem Labor zu messen und für ihre Unterstützung bei der Auswertung der Daten.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und Geschwister, die mich immer unterstützt und meinen Ausführungen über den Verlauf der Promotion interessiert zugehört haben sowie für die Beantwortung statistischer Fragen immer zur Verfügung standen.

Ein ganz lieber Dank geht an Mark für seine Unterstützung, Diskussionsbereitschaft, seine aufbauenden Worte und Motivation.

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	S. I
	Abstract	S. II
	Danksagung	S. III
	Inhaltsverzeichnis	S. IV
1	**Einleitung**	S. 1
1.1	Das metabolische Syndrom	S. 1
1.2	Das Fettgewebe	S. 2
1.2.1	Das Fettgewebe als endokrines Organ	S. 2
1.2.2	Adipositas	S. 3
1.2.3	Adipositas, Endotoxine und Sepsis	S. 4
1.3	Inflammatorische Signaltransduktion	S. 5
1.4	Die Tribbles-Pseudokinasen	S. 8
1.4.1	Pseudokinasen	S. 8
1.4.2	Tribbles-Genexpression und –Funktion in Drosophila melanogaster	S. 9
1.4.3	Tribbles 1	S. 9
1.4.3.1	Tribbles 1 ist ein Interaktionspartner von Transkriptionsfaktoren	S. 10
1.4.3.2	Bei verschiedenen Krankheiten tritt eine veränderteTRB1-Expression auf	S. 10
1.4.4	Tribbles 2	S. 11
1.4.4.1	TRB2 wird in Krebszellen überexprimiert und hat einen Einfluss auf Inflammation und Apoptose	S. 11
1.4.5	Tribbles 3	S. 12
1.4.5.1	Die Regulation der TRB3-Expression	S. 12
1.4.5.2	Die Rolle von TRB3 im Metabolismus	S. 13
1.4.5.3	TRB2 und TRB3 spielen eine Rolle in der Adipozytendifferenzierung	S. 14

1.4.5.4 TRB3 spielt eine Rolle bei ER-Stress und Apoptose S. 15

1.5 Ziel der Arbeit S. 16

2 Ergebnisse S. 17

2.1 Expression der Tribbles –Pseudokinasen in Geweben von Mäusen S. 17

2.1.1 Der Effekt von Hunger und Nahrung auf die Genexpression der Tribbles-Gene S. 17

2.1.2 Tiermodelle des metabolischen Syndroms S. 17

2.1.2.1 Die Expression der Tribbles-Pseudokinasen in peripheren, metabolisch aktiven Geweben ist gewebsspezifisch und abhängig vom metabolischen Zustand S. 18

2.1.2.2 TRB1 wird im Fettgewebe der monogenetischen Mausmodelle db/db und ob/ob verstärkt exprimiert S. 19

2.1.2.3 Die TRB1-Expression ist im Fettgewebe des polygenetischen Modells NZO nicht reguliert S. 20

2.1.2.4 Die TRB1-Expression wird unter Hochfettdiät im Fettgewebe nicht reguliert S. 21

2.1.2.5 Eine Leptinbehandlung von ob/ob-Mäusen führt zu keiner Veränderung der TRB1-Expression im Fettgewebe S. 22

2.1.3 Tiermodell der LPS induzierten Sepsis S. 23

2.1.3.1 TRB1 wird im Fettgewebe im Tiermodell der LPS-induzierten Sepsis verstärkt exprimiert S. 24

2.1.4 Tiermodell der Krebskachexie S. 24

2.1.4.1 TRB1 wird im Fettgewebe kachektischer Tiere verstärkt exprimiert S. 24

2.2 Die Regulation der TRB1-Pseudokinasen in Adipozyten S. 25

2.2.1 Die TRB1-Expression wird durch Insulin reguliert S. 26

2.2.2 Die TRB1-Expression wird durch von Makrophagen sezernierte Faktoren reguliert S. 27

2.2.2.1 LPS hat nur einen geringen Effekt auf die TRB1-Expression S. 29

2.2.2.2 Der Knockout von TLR4 hat keinen Effekt auf die TRB1-Expression S. 30

2.2.2.3 Erhitzen des CM führt zum Verlust der Induktion der TRB1-Expression S. 31

2.2.2.4 Das LPS konditionierte Makrophagenmedium enthält einen Cocktail verschiedener Zytokine und Chemokine S.32

2.2.2.5 TNF-α und IL-1β regulieren nicht alleine und nicht gemeinsam die TRB1-Expression S. 33

2.3 Die TRB1-Expression wird über JNK und NF-κB reguliert S. 34

2.3.1 JNK1 hat keinen Einfluss auf die TRB1-Expression S. 35

2.3.2 Die TRB1-Expression wird durch den JNK-Inhibitor SP600125 reduziert S. 35

2.3.3 p50-ko-Zellen zeigen eine verringerte Induktion der TRB1-Expression nach Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium S. 36

2.3.4 Der NF-κB-Inhibitor Parthenolide inhibiert die Expression von TRB1 nach der Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium S. 37

2.3.5 Die Inhibition von p38, Erk, PI-3K und PKA haben keinen signifikanten Einfluss auf die TRB1-Expression S. 38

2.4 Die Expression von TRB1 lässt sich durch eine lentiviral vermittelte MikroRNA nicht herunterregulieren S. 40

2.4.1 TRB1 spezifische MikroRNAs reduzieren die Expression von TRB1 im Luziferasereporter-Assay und auf Proteinebene S. 40

2.4.2 Herstellung von miRNA-exprimierenden Lentiviren S. 41

2.4.3 Durch die lentiviral vermittelte miRNA lässt sich kein stabiler Knockdown von TRB1 erzielen S. 41

2.5 Die shRNA vermittelte Inhibition der TRB1-Expression führt zu einer veränderten Genexpression von Zytokinen S. 43

2.5.1 Adenoviral vermittelter Knockdown von TRB1 S. 43

2.5.1.1 Die Expression von TRB1 lässt sich durch eine shRNA inhibieren S. 44

2.5.1.2 Die Expression von TRB1 in Adipozyten wird durch adenoviral vermittelte Expression einer spezifischen shRNA verringert S. 45

2.5.1.3 Der Knockdown von TRB1 führt zu einer veränderten Expression proinflammatorischer Gene S. 46

2.5.1.4 Der Knockdown von TRB1 führt zu einer veränderten Expression von am Stoffwechsel beteiligten Genen in Adipozyten S. 50

2.5.1.5 Der Knockdown von TRB1 führt zu einer veränderten Expression von Adipokinen S. 52

2.6 TRB1 heterozygote Knockout-Mäuse zeigen kein verändertes Zytokinprofil nach LPS-Injektion S. 53

2.6.1 TRB1$^{+/-}$-Mäuse zeigen keinen Unterschied im Körperfettgehalt S. 54

2.6.2 TRB1$^{+/-}$-Mäuse mit LPS induzierte Sepsis zeigen keine veränderte Zytokinexpression S. 54

2.6.2.1 TRB1$^{+/-}$-Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Serumanalyse S. 56

2.7 TRB1 ist ein Kernprotein und ein Koaktivator von p65 S. 58

2.7.1 TRB1 ist ein Kernprotein S. 58

2.7.2 TRB1 wird über die NF-κB-Bindestelle an Promotoren von Zytokingenen rekrutiert S. 58

2.7.3 TRB1 hat einen direkten Effekt auf die NF-κB abhängige Transkription S. 60

2.7.4 TRB1 und p65 interagieren über die p65-Transaktivierungsdomäne S. 60

3 Diskussion S. 63

3.1 Die Expression der Pseudokinase Tribbles 1 wird im Fettgewebe durch proinflammatorische Moleküle induziert S. 63

3.2 TRB1 ist ein Koaktivator von p65 und ist an der Regulation von proinflammatorischen Genen beteiligt S. 71

3.3 Ausblick S. 74

4 Methoden S. 77

4.1 Molekularbiologische Methoden S. 77

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) S. 77

4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese S. 78

4.1.3 DNA-Gelextraktion S. 78

4.1.4 Restriktion von DNA S. 78

4.1.4.1 Ligation von DNA-Fragmenten S. 79

4.1.5 Transformation von Bakterien S. 79

4.1.5.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien S. 79
4.1.5.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien S. 79
4.1.6 Plasmid-DNA Minipräparation S. 80
4.1.6.1 QIAprep Spin Miniprep Kit S. 80
4.1.6.2 Plasmid-DNA Minipräparation S. 80
4.1.7 Plasmid-DNA Maxipräparation S. 80
4.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA S. 81
4.1.9 Sequenzierung S. 81
4.1.10 RNA-Isolation mit QIAzol S. 81
4.1.10.1 RNA-Isolation aus Gewebe S. 81
4.1.10.2 RNA-Isolation aus Zellen S. 82
4.1.10.2.1 mit QIAzol S. 82
4.1.10.2.2 mit dem RNeasy® Micro Kit S. 82
4.1.11 Überprüfung der RNA-Qualität und Quantität S. 82
4.1.12 cDNA-Synthese S. 83
4.1.12.1 First Strand cDNA Synthesis Kit S. 83
4.1.12.2 Superscript®II S. 83
4.1.13 Quantitative Real Time PCR S. 83
4.2 Zellbiologische Methoden S. 84
4.2.1 Zelllinien und Differenzierung S. 84
4.2.1.1 HEK 293, HEK 293A, HEK 293FT, HEK 293T S. 84
4.2.1.2 RAW264.7 S. 84
4.2.1.2.1 Herstellung von konditioniertem Makrophagenmedium S. 84
4.2.1.3 3T3-L1 S. 85
4.2.1.3.1 Kultivierung S. 85
4.2.1.3.2 Differenzierung S. 85
4.2.1.3.3 Öl-Rot-O Färbung S. 85

4.2.2 Gewinnung und Differenzierung primärer Mausadipozyten S. 86
4.2.2.1 Präparation S. 86
4.2.2.2 Differenzierung S. 86
4.3 Zellbasierte Assays S. 87
4.3.1 Transfektion S. 87
4.3.1.1 Transfektion mit Kalziumphosphat S. 87
4.3.1.2 Transfektion mit Lipofectamine S. 87
4.3.2 Luziferase Assay S. 87
4.3.2.1 Ernte der transfizierten Zellen S. 88
4.3.2.2 Lumineszenz-Messung S. 88
4.3.2.3 β-Galactosidase-Messung S. 88
4.3.3 Stimulation von Adipozyten S. 89
4.3.3.1 mit Insulin S. 89
4.3.3.2 mit konditioniertem Makrophagenmedium S. 89
4.3.3.3 mit proinflammatorischen Zytokinen S. 89
4.3.3.4 mit Inhibitoren von Signaltransduktionswegen S. 90
4.4 Virale Methoden S. 90
4.4.1 Herstellung von miRNA exprimierenden Lentiviren S. 90
4.4.1.1 Klonierung der pcDNA™6.2GW/EmGFP-miR-Konstrukte S. 90
4.4.1.2 Klonierung der pLenti6/V5-DEST-Konstrukte S. 91
4.4.1.3 Herstellung von Lentiviren S. 91
4.4.1.3.1 Lentivirusherstellung mit lentiviralen Verpackungsplasmiden S. 92
4.4.1.4 Titration von Lentiviren in 3T3-L1 Zellen S. 92
4.4.1.5 Transduktion von 3T3-L1 Zellen und Herstellung stabiler Klone S. 92
4.4.2 Herstellung von miRNA und shRNA exprimierenden Adenoviren S. 93
4.4.2.1 Klonierung von pENTR/U6-shRNA und pENTRmiR S. 93
4.4.2.2 Klonierung von pAd-miRNA- und pAd-shRNA-Vektoren S. 94

4.4.2.3 Herstellung und Ernte von Adenoviren S. 94
4.4.2.4 Aufreinigung von Adenoviren mittels CsCl-Gradient S. 95
4.4.2.5 Titration von Adenoviren S. 95
4.4.2.6 Transduktion von 3T3-L1 und primären Adipozyten mit Adenoviren S. 96
4.5 Biochemische Methoden S. 96
4.5.1 Herstellung von Proteinlysaten S. 96
4.5.1.1 mit 2x SDS-Puffer und 2x SDS-Urea-Puffer S. 96
4.5.1.2 mit modifiziertem Radioimmunopräzipitationspuffer (RIPA) S. 97
4.5.1.3 aus der QIAzolphase nach der RNA-Isolation S. 97
4.5.1.4 Herstellung von Kernextrakten S. 97
4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration S. 98
4.5.2.1 mittels 2D-Quant S. 98
4.5.2.2 mittels BCA™ Protein Assay Kit S. 98
4.5.2.3 mittels Bradford S. 98
4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese S. 99
4.5.4 Coomassiefärbung von SDS-Gelen S. 99
4.5.5 Immunoblot S. 99
4.5.6 GST-Pulldown-Assay S.101
4.5.6.1 Herstellung von GST-Fusionsproteinen S.101
4.5.6.2 Herstellung von TNT-Proteinen S.101
4.5.6.3 GST-Pulldown S.101
4.5.7 Flag-Immunopräzipitation S.102
4.5.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) S.103
4.5.8.1 Immunopräzipitation S.103
4.5.9 Analyse der Zellkulturüberstände – Milliplexassay S.105
4.5.10 Expression von rekombinantem TRB1-Protein zur Herstellung von TRB1 spezifischen Antikörpern S.105

4.5.10.2 Klonierung von TRB1-His Konstrukten S.105
4.5.10.2 Induktion der Expression S.106
4.5.10.3 Aufschluss der Bakterien S.106
4.5.10.4 Proteinaufreinigung über Ni-NTA S.106
4.5.10.5 Herstellung von TRB1 spezifischen Antikörpern S.107
4.5.10.5.1 In Mäusen mit einem TRB1-Peptid als Antigen S.107
4.5.10.5.2 In Kaninchen mit einem TRB1-Proteinfragment S.107
4.5.10.5.3 In Ratten mit einem TRB1-Proteinfragment S.107
4.5.10.5.4 In Meerschweinchen mit einem TRB1-Proteinfragment S.107
4.5.10.5.5 Analyse der Antikörper S.108
4.5.10.5.6 Ergebnis der TRB1 Antikörpergenerierung S.108
4.6 Tierexperimente S.110
4.6.1 Metabolisches Syndrom S.111
4.6.1.1 Monogenes Adipositas/Diabetes-Modell: C57BKS- und db/db-Mäuse S.111
4.6.1.2 Monogenes Adipositas/Diabetes-Modell: C57BL/6J und ob/ob-Mäuse S.111
4.6.1.3 Polygenes Adipositasmodell: NZO/NZB S.111
4.6.1.4 Hochfettdiät S.111
4.6.2 Sepsismodell S.112
4.6.3 Kachexiemodell Colon26 S.112
4.6.4 TRB1$^{+/-}$-Mäuse S.112
4.7 Analyse der metabolischen Parameter von Mäusen S.112
4.7.1 Körperfettmessung mit ECHO-MRI S.112
4.7.2 Blutwerte S.113
4.7.2.1 Blutzucker S.113
4.7.2.2 Insulin S.113
4.7.2.3 Cholesterin S.113

4.7.2.4	Triglyzeride	S.113
4.7.2.5	Nichtveresterte freie Fettsäuren	S.114
4.8	Statistik	S.114
5	**Material**	S.115
5.1	Software	S.115
5.2	Verbrauchsmaterial	S.115
5.3	Material	S.116
5.4	Instrumente	S.117
5.5	Mäuse	S.119
5.6	Accession numbers	S.119
6	**Appendix**	S.120
6.1	Literatur	S.120
6.2	Abbildungen	S.126
6.3	Tabellen	S.128
6.4	Abkürzungsverzeichnis	S.129

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

Der Begriff des metabolischen Syndroms, auch Syndrom X genannt, beschreibt das gemeinsame Auftreten von Adipositas, gestörtem Kohlenhydratstoffwechsel (Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes), Hypertriglyzeridämie und arterieller Hypertonie. Desweiteren kann die Kombination dieser Symptome zu Arteriosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen führen [1-3]. Besonders die Adipositas ist ein weltweit immer größer werdendes Gesundheitsproblem, das nicht nur die Lebensqualität und Lebenserwartung senkt, sondern auch die Gesundheitssysteme zunehmend belastet. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) legt der Bestimmung von Übergewicht und Adipositas den Body Mass Index (BMI; Gewicht (kg)/Körpergröße^2 (m)) zu Grunde. So wird bei einem BMI ≥ 25 von Übergewicht und bei einem BMI ≥ 30 von Adipositas gesprochen. Die letzte Studie der WHO von 2005 ergab, dass global zirka 1,6 Milliarden Menschen älter als 15 Jahre übergewichtig und ungefähr 400 Millionen Menschen adipös waren. Auch waren im Jahr 2005 mindestens 20 Millionen Kinder unter fünf Jahren übergewichtig. Hochrechnungen der WHO sagen für das Jahr 2015 2,6 Milliarden übergewichtige und 700 Millionen adipöse Menschen voraus [4].

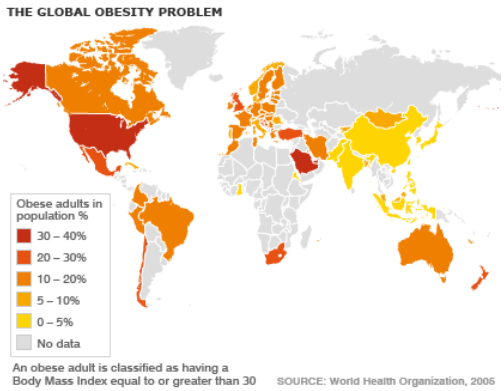


Abb. 1.1 Weltkarte der Prävalenz von Adipositas nach Erhebung der WHO 2005.

Gründe für diese Entwicklung sind vor allem die vorwiegend sitzende Lebensweise und die Aufnahme energiereicher Nahrung, die sehr viel Fett und Kohlenhydrate enthält. Dieses metabolische Ungleichgewicht von zu hoher Energieaufnahme und zu geringem Energieverbrauch führt zur Einlagerung der Energiereserven im Fettgewebe und in Organen wie Leber und Muskel. Die Folgen für den Organismus sind kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, Typ 2

Diabetes, Osteoarthritis und auch Krebs [5, 6]. Auch wenn die Änderung der Lebensweise schon einen positiven Einfluss auf das Körpergewicht haben kann, so zeigen die hohe Prävalenz von Übergewicht in der Weltbevölkerung (Abb.1.1) und die damit verbundenen Folgeerkrankungen die Notwendigkeit auf, die genauen Mechanismen der Krankheitsentstehung zu erforschen, um neue Therapien zu entwickeln.

1.2 Das Fettgewebe

In Säugetieren gibt es zwei unterschiedliche Arten von Fettgewebe. Zum einen das weiße Fettgewebe, das hauptsächlich für die Speicherung von Energie in Form von Triglyzeriden und für die Versorgung des Körpers mit Fettsäuren verantwortlich ist und zum anderen das braune Fettgewebe, das den basalen, sowie den induzierbaren Energieumsatz in Form von Thermogenese steuert [7]. Das während der Adipositas stark vergrößerte weiße Fettgewebe findet sich in Säugern subkutan sowie viszeral und besteht neben den Adipozyten aus Präadipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Leukozyten [8, 9]. Das viszerale Fettgewebe wird bisher als das metabolisch aktivere angesehen, da es seine Botenstoffe über das Pfortadersystem direkt an die Leber schicken kann und es wird für die negativen Auswirkungen der Adipositas auf den Metabolismus verantwortlich gemacht [10]. Die Menge an subkutanem Fett ist drei- bis viermal so groß wie die Menge an viszeralem Fett und es ist daher wahrscheinlich, dass diese beiden Gewebe kompensatorisch und kooperativ zusammenarbeiten und so beide Gewebe zu den durch Adipositas verursachten Symptomen beitragen [11, 12].

1.2.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe wurde lange Zeit als reines Speicherorgan für Triglyzeride angesehen. Die wichtige Rolle, die das Fettgewebe für den Metabolismus und die Gesundheit spielt, wurde in lipodystrophen Mäusen gezeigt. Diese Tiere haben so gut wie kein weißes Fettgewebe und zeigen alle Anzeichen des auch in lipodystrophen Menschen vorkommenden lipodystrophen Diabetes: Insulinresistenz, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und eine Fettleber (Steatose). Die Transplantation von weißen Fettzellen in die lipodystrophen Tiere konnte diesen Phänotyp wieder aufheben [14]. Mit der Entdeckung des von Adipozyten sezernierten Hormons Leptin

1994 [15] und weiteren Adipokinen, wie Adiponektin und Resistin, sowie den von Adipozyten sezernierten Zytokinen Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1β (IL-1β) [16] wurde die Funktion des Fettgewebes als endokrines Organ postuliert [9], das die Nahrungsaufnahme, Fettspeicherung und den systemischen Stoffwechsel beeinflusst.

1.2.2 Adipositas

Aus entwicklungsgeschichtlicher Sicht wurde die Evolution des Menschen in den letzten 2,5 Millionen Jahren primär über die Anpassung an und das Überleben von Hungerperioden gesteuert. Die Entwicklung des Fettgewebes als Speicherorgan trug zum Überleben bei, indem es erlaubte, Energie in Form von Fetten in nahrungsreichen Zeiten zu speichern um sie unter Nahrungsmangel abrufen zu können [17]. Heute trägt dieser evolutionär begründete Mechanismus durch die veränderte Lebensweise und die Dauerverfügbarkeit von Nahrung zu einer deutlichen Zunahme der übergewichtigen Menschen in der Weltbevölkerung bei.

Die Gewichtszunahme durch die Vergrößerung des Fettgewebes geht sowohl mit einer Hypertrophie (Vergrößerung) als auch mit einer Hyperplasie (Vermehrung) der Fettzellen einher [18]. Die Adipozyten verändern sich metabolisch und zellulär. Die Zellen sekretieren mehr freie Fettsäuren und Adipokine, Makrophagen wandern in das Fettgewebe ein und sekretieren zusätzlich Zytokine [19, 20]. Die veränderte Sekretion dieser Adipokine und Zytokine unter adipösen Bedingungen führt zu einem Zustand einer chronischen, leichten Entzündungsreaktion im Fettgewebe selbst als auch systemisch und trägt zur Entwicklung des Metabolischen Syndroms bei [21]. So haben die von Fettzellen und Makrophagen sekretierten Zytokine IL-6 und TNF-α eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten und führen auch zu einer Insulinresistenz der Fettzellen [22, 23]. In insulinresistentem Gewebe wird die durch Insulin ausgelöste Signaltransduktion zur Aufnahme von Glukose aus dem Blut blockiert. Es kommt zu einer Hyperglykämie. Desweiteren wird auch die blockierende Wirkung von Insulin auf die Lipolyse inhibiert und die Fettzellen sezernieren trotz Nahrungszufuhr Fette in die Blutbahn. Es kommt also neben der durch die Insulinresistenz ausgelösten Hyperglykämie auch zur Dyslipidämie im Blut, die beide Auswirkungen auf Leber, Muskeln und Gefäße haben (Abb.1.2) [24].

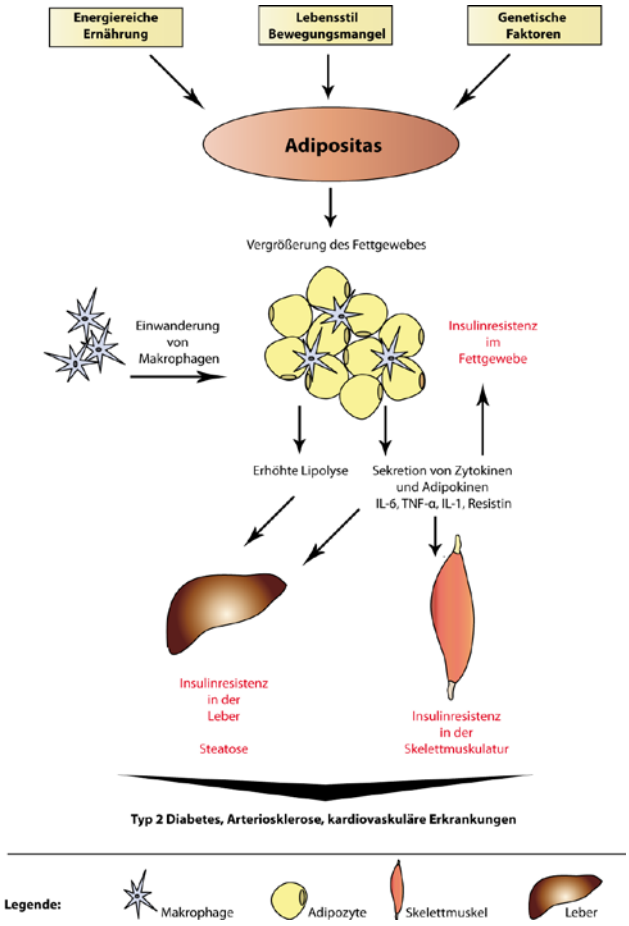


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Gründe für und Auswirkungen von Adipositas. Energiereiche Ernährung, Bewegungsmangel aber auch genetische Faktoren tragen zu einer Vergrößerung des Fettgewebes und zu der Entwicklung von Adipositas bei. Die Vergrößerung des Fettgewebes führt zur Rekrutierung von Makrophagen und zur Entwicklung einer subakuten Entzündungsreaktion. Die dadurch sezernierten Adipokine tragen wiederum zur Insulinresistenz im Fettgewebe, der Skelettmuskulatur und der Leber bei. Durch die Insulinresistenz wird die Lipolyse im Fettgewebe nicht abgeschaltet und die in die Blutbahn sezernierten Fettsäuren akkumulieren in der Leber und der Muskulatur. Es kommt zur Ausbildung einer Fettleber (Steatose). Die anhaltende Veränderung des Stoffwechsels kann letzten Endes zum Ausbruch von Typ 2 Diabetes, Arteriosklerose oder kardiovaskulären Erkrankungen führen.

1.2.3 Adipositas, Endotoxine und Sepsis

Nicht nur die Vergrößerung des Fettgewebes und die damit verbundene Sekretion von Adipokinen allein, sondern auch die veränderte Ernährung tragen zur chronischen subakuten Entzündung bei. Neue Untersuchungen zeigen, dass sich die Besiedlung des Darmes mit Mikroorganismen je nach Ernährungszustand ändert und dass die Menge an von diesen Mikroorganismen abgegebenen Endotoxinen im adipösen Zustand stark erhöht ist [25]. Eines der stark erhöhten bakteriellen Endotoxine, das bakterielle Molekül Lipopolysaccharid (LPS), wird kontinuierlich beim

Tod von gramnegativen Bakterien im Darm freigesetzt, gelangt über die Darmkapillaren in die Blutbahn und Gewebe und aktiviert über den Toll Like Rezeptor 4 (TLR4) die Immunantwort der dort residierenden Makrophagen [17, 26]. Diese Anreicherung mit Endotoxinen im Blut und den Geweben trägt vermutlich auch zur subakuten systemischen Entzündungsreaktion durch eine Adipositas bei [27].

Das von Bakterien stammende LPS ist vor allem bekannt als Auslöser einer Sepsis. Eine Sepsis ist eine starke systemische Entzündungsreaktion gegenüber einer durch Mikroorganismen, meist gramnegativen Bakterien, verursachten Infektion [1]. Die Aktivierung von Endothelzellen und Monozyten führt zu einer sehr starken Immunantwort des Wirtes gegenüber dem Pathogen. Die sezernierten Zytokine und das aktivierte Komplementsystem führen als Nebenwirkung zu einer starken Beeinträchtigung und Beschädigung von gesunden Geweben und oft zum Tod [28]. Die akute Entzündungsreaktion während einer Sepsis zeigt die gleichen metabolischen Auswirkungen wie die subakute Entzündungsreaktion im Fettgewebe: Hyperglykämie, teilweise Hyperinsulinämie, erhöhte Triglyzeride und nicht veresterte Fettsäuren im Blut [29]. Ausgelöst wird dieser Zustand unter anderem über die erhöhte Sekretion der Zytokine TNF-α, IL-6 und IL-1β [30]. Die akute Entzündung einer Sepsis mit der chronischen subakuten Entzündungsreaktion bei Adipositas gleichzusetzen, würde nicht alle Aspekte des Krankheitsverlaufs berücksichtigen. Dennoch könnten die ähnlichen Auswirkungen beider Reaktionen auf den Metabolismus einen Hinweis darauf geben, dass Immun- oder Entzündungsmediatoren der Grund für die Störung der Stoffwechselprozesse sind [29].

1.3 Inflammatorische Signaltransduktion

Die von Adipozyten oder Makrophagen sezernierten Zytokine binden an ihre spezifischen Rezeptoren in der Zellmembran und lösen damit eine Signaltransduktionskaskade aus, die über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression steuert und somit der Zelle die Möglichkeit gibt, auf die veränderten Bedingungen zu reagieren.

Von vielen Zytokinen wird der NF-κB (nuclear factor kappa B) Transkriptionsfaktor über ihre spezifischen Rezeptoren aktiviert [31]. Die zwei im Zusammenhang mit der chronischen Entzündungsreaktion im Fettgewebe beschriebenen Zytokine TNF-α und IL-1β sowie LPS aktivieren unter anderem über NF-κB die Gentranskription. Wenn TNF-α, IL-1β oder LPS an ihren jeweiligen Rezeptor binden, wird dieser aktiviert und rekrutiert weitere Kinasen, die wiederum den IKK-(Inhibitor κB Kinase) Komplex aktivieren. Die katalytische Haupteinheit IKK2 phosphoryliert den Inhibitor κB (IκB), dieser wird ubiquitinyliert und über das Proteasom degradiert. Der freigesetzte NF-κB Komplex kann in den Kern wandern, um dort die Transkription weiterer proinflammatorischer Gene zu aktivieren indem es an κB-Bindestellen in deren Promotoren bindet (Abb. 1.3) [32]. Die Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren besteht aus NF-κB1 (p50 und der Vorläufer p100), NF -κB2 (p52 und sein Vorläufer p105), sowie p65 (RelA), RelB und c-Rel. Diese Untereinheiten können sowohl Homodimere, mit der Ausnahme von RelB, als auch Heterodimere ausbilden. So bildet RelB mit p100 beziehungsweise mit dessen prozessierter Form p52 Heterodimere und RelA und c-Rel bilden primär mit p50 Heterodimere. So kann die Aktivierung der verschiedenen NF-κB-Transkriptionsfaktoren orts- und stimulusabhängig die Genexpression regulieren. [33, 34].

Neben dem NF-κB-Signalweg spielt auch der JNK-Signaltransduktionsweg eine Rolle in der Weiterleitung proinflammatorischer Signale. Die c-jun NH_2-terminale Kinase (JNK) ist ein Mitglied einer in der Evolution konservierten Untergruppe der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinasen, die primär durch Zytokine wie TNF-α und Umweltfaktoren aktiviert wird. Drei Gene kodieren für die verschiedenen JNK Proteine, JNK-1, JNK-2 und JNK-3. JNK-1 und JNK-2 werden in jedem Gewebe exprimiert und spielen eine Rolle in der Regulation des Immunsystems, in Krankheiten wie Adipositas und Autoimmunerkrankungen [35]. JNK3 hingegen spielt eine große Rolle in Nervenzellen, vor allem im Gehirn [36]. Daneben gibt es noch mindestens zehn Spleißvarianten der Proteine. Die Aktivierung von JNK erfolgt über die Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten über die MAPK-Kinasen (MAPKK) MEK4 und MEK7, die selbst über MAPKK-Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden. JNK kann durch diese Aktivierung vom Zytoplasma in den Kern wandern [37] und aktiviert dort den Transkriptionsfaktor AP-1 (activator protein-1), der sich aus dem Dimer c-fos und c-jun zusammensetzt. Die Aktivierung geschieht durch die

Phosphorylierung von c-jun an Serin 63 und Serin 73 [38]. AP-1 kontrolliert die Expression vieler Zytokingene, auch die, deren Produkte wiederum JNK aktivieren (Abb. 1.3) [39].

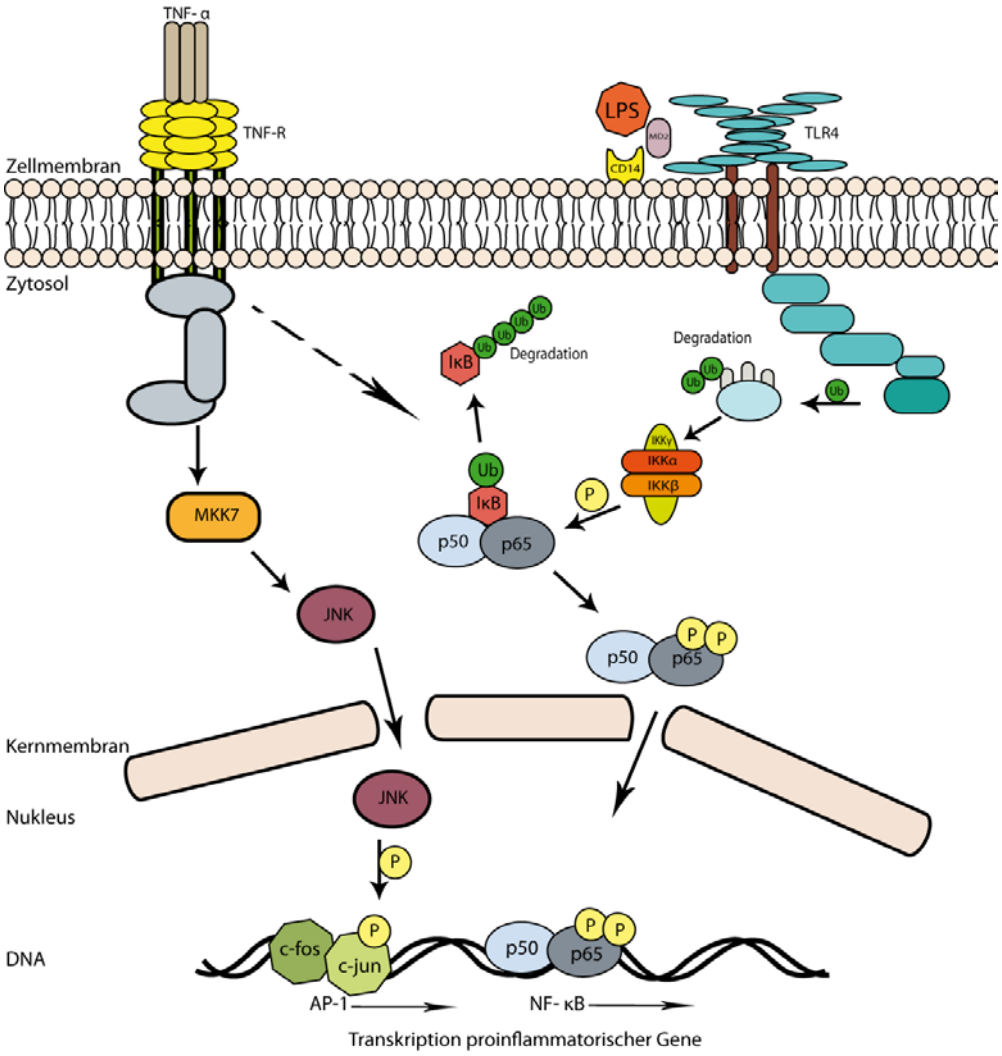


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über JNK und NF-κB. Die Bindung von TNF-α an den TNF-Rezeptor führt zur Aktivierung des Signalwegs (hellblaue Kästchen) und zur Aktivierung von JNK über MKK7 und auch zur Aktivierung von NF-κB (gestrichelter Pfeil). JNK wandert in den Kern, phosphoryliert (P) die Untereinheit c-jun des AP-1-Transkriptionsfaktors und aktiviert so die Transkription der AP-1 abhängigen Gene. LPS bindet über CD14 und MD2 an den TLR4. Durch die Bindung wird eine Signaltransduktionskaskade (blaue Kästchen) aktiviert, die in der Aktivierung des NF-κB –Transkriptionsfaktors endet. Der Inhibitor von κB (IκB) wird ubiquitinyliert (Ub) und über das Proteasom abgebaut. Der phosphorylierte p50/p65 Komplex wandert in den Kern, bindet an Promotoren proinflammatorischer Gene und aktiviert deren Transkription.

1.4 Die Tribbles-Pseudokinasen

1.4.1 Pseudokinasen

Genomweite Analysen haben zu einer vollständigen Beschreibung der Proteinkinasen mehrerer eukaryotischer Organismen, wie Mensch [40], Maus [41], *Caenorhabditis elegans* [42], *Dictyostelium* [43] und Hefe [44] geführt. Proteinkinasen regulieren die Funktion von Proteinen, indem sie eine Phosphorylgruppe eines ATP-Moleküls kovalent an Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste übertragen. Die Analysen zeigten, dass 2-3% aller eukaryotischen Gene Proteine kodieren, die eine Kinasedomäne enthalten. Ungefähr 10% dieser Proteine haben keine der konservierten Aminosäuren in der Kinasedomäne, die für die katalytische Funktion notwendig sind. Diese Proteine werden als katalytisch inaktiv angesehen und werden daher Pseudokinasen genannt [45].

```
Q8K4K3|TRIB2      MNIH--------RSTP-----ITIARYGRSRNKTQDFEELSSIRSAEP--SQSFSPN--- 42
Q8K4K4|TRIB1      MRVGPVRFALSGASQPRGPGLLFPAARGTPAKRLLDTDDAGAVAAKCPRLSECSSPPDYL 60
Q8K4K2|TRIB3      -----------MRATP-----LAASADVSCRKKPLEFDDN--IDAKCPVLKRVRDEPE-P 41
                             : *     :  :      ::  : ::   : :  *  ..  .

Q8K4K3|TRIB2      --LGSPSPPETPNLSH-----CVSCIG-----KYLLLEPLEGDHVFRAVHLHSGEELVCK 90
Q8K4K4|TRIB1      SPPGSPCSPQPPPSTQGTGGSCVSSPGPSRIADYLLLPLAEREHVSRALCIHTGRELRCK 120
Q8K4K2|TRIB3      GPLPSLLPPSPPPASD----LSPAVAPATRLGPYILLEREQGSCSYRALHCPTGTEYTCK 97
                      *  .*..*  :.     . :         *:**   : .   **:   :* *  **

Q8K4K3|TRIB2      VFEISCYQESLAPCFCLSAHSNINQITEILLGETKAYVFFERSYGDMHSFVRTCKKLREE 150
Q8K4K4|TRIB1      EFPIKHYQDKIRPYIQLPSHSNITGIVEVLLGESKAYVFFEKDFGDMHSYVRSRKRLREE 180
Q8K4K2|TRIB3      VYPASEAQAVLAPYARLPTHQHVARPTEVLLGSRLLYIFFTKTHGDLHSLVRSRRGIPES 157
                   :  .  *  : *   *.:*.::   .*:***.   *:** : .**:** **: : : *.

Q8K4K3|TRIB2      EAARLFYQIASAVAHCHDGGLVLRDLKLRKFIFKDEERTRVKLESLEDAYILRGDDDSLS 210
Q8K4K4|TRIB1      EAARLFKQIVSAVAHCHQSAIVLGDLKLRKFVFSTEERTQLRLESLEDTHIIKGEDDALS 240
Q8K4K2|TRIB3      EAAGLFRQMASAVAHCHKHGLVLRDLKLRRFVFSNCERTKLVLENLEDACVMTGSDDSLW 217
                  *** ** *:.*******. .:** *****:*:*.  ***:: **.***: :: *.**:*

Q8K4K3|TRIB2      DKHGCPAYVSPEILNTSGSYSGKAADVWSLGVMLYTMLVGRYPFHDIEPSSLFSKIRRGQ 270
Q8K4K4|TRIB1      DKHGCPAYVSPEILNTTGTYSGKAADVWSLGVMLYTLLVGRYPFHDSDPSALFSKIRRGQ 300
Q8K4K2|TRIB3      DKHACPAYVGPEILSSRPSYSGKAADVWSLGVALFTMLAGRYPFHDSEPVLLFGKIRRGT 277
                  ***.*****.****.:  :************* *:*:*.******* :*  **.*****

Q8K4K3|TRIB2      FNIPETLSPKAKCLIRSILRREPSERLTSQEILDHPWFSTDFSVSNSGFGAKEACDQLVP 330
Q8K4K4|TRIB1      FCIPEHVSPKARCLIRSLLRREPSERLTAPQILLHPWFEYVLEPGYVDS-EIGTSDQIVP 359
Q8K4K2|TRIB3      FALPEGLSAPARCLIRCLLRKEPSERLVALGILLHPWLREDHGRVSPPQSDRREMDQVVP 337
                  * :** :*. *:****.:**:******.:  ** ***:                 **:**

Q8K4K3|TRIB2      DVNMEENLDP----FFN 343
Q8K4K4|TRIB1      EYQEDSDISS----FFC 372
Q8K4K2|TRIB3      DGPQLEEAEEGEVGLYG 354
                  :    .: .     ::
```

Abb. 1.4: Homologie der murinen Proteinsequenz von TRB1, TRB2 und TRB3. Das multiple Alignment wurde mit der ClustalW2 Software des Ebi (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) durchgeführt. „*“ = Identische AS in allen Sequenzen, „:“= konservierte Substitution nach Eigenschaften, „.“ = semi-konservierte Substitution.

Die Proteine der Tribbles-Familie gehören zu diesen Pseudokinasen. Sie haben eine einfache Struktur mit einer recht homologen Pseudokinasedomäne (Abb. 1.4) und Protein-Protein-Interaktionsdomänen in ihrem N- und C-Terminus und wurden als eine Proteinfamilie mit MAPK-Modulationsfunktion und Gerüstfunktion beschrieben [46]. Die Regulation der Tribbles-Genexpression ist abhängig vom Zelltyp und könnte somit zur zelltypspezifischen Regulation der MAPK-Signalnetzwerke beitragen [47]. Tribbles orthologe Gene finden sich in allen Tiergruppen, jedoch nicht in Pilzen, Pflanzen oder Protozoen. Invertebraten haben nur ein einzelnes Tribbles-Gen, wohingegen die TRB1-, TRB2- und TRB3-Unterfamilien sich in der Gruppe der Fische ausbildeten [48].

1.4.2 Tribbles-Genexpression und -Funktion in *Drosophila melanogaster*

Im Genom von *D. melanogaster* gibt es nur ein *tribbles*-Gen. In Entwicklungsstudien wurde gezeigt, dass *tribbles (trb)* ein Hauptregulator der Morphogenese von *D. melanogaster* ist. Es reguliert die Phosphatase *string* während der Morphogenese und Oogenese, welche wiederum die *cdk-1* (cyclin-dependent kinase-1) aktiviert [49, 50]. Tribbles interagiert mit *slbo (slow-borders)*, ein dem Säugetier C/EBP homologen bZIP-Transkriptionsfaktor in Fliegen, und stimulierte dessen Ubiquitinylierung und Abbau, was für eine genaue Regulation für die Morphogenese notwendig ist [51]. *Trb* reguliert die embryonale Entwicklung von *D. melanogaster* an mehreren Abschnitten, wobei die Regulation nur unter bestimmten Bedingungen wie Zelltyp und Entwicklungsstadium auftritt. Daher ist es einerseits möglich, dass *trb* selbst durch vorgeschaltete Signale reguliert wird. Andererseits ist es auch möglich, dass *trb* als Teil eines großen Proteinkomplexes wirkt [48].

1.4.3 Tribbles 1

Das humane Tribbles 1-Gen (TRB-1, Trib1, GIG-2, C8FW oder SKIP-1) wurde als Homolog von TRB2 basierend auf einer partiellen cDNA-Sequenz identifiziert [52]. Das humane Gen liegt auf Chromosom 8, q24.13. Die Lokalisation des TRB1-Proteins wurde bisher nur durch Überexpressionsanalysen beschrieben. Das überexprimierte TRB1-Protein befand sich dabei im Zellkern. Eine Sequenzanalyse des N-Terminus ergab eine prolinreiche Region, die für die Lokalisation im Kern notwendig ist [53].

1.4.3.1 Tribbles 1 ist ein Interaktionspartner von Transkriptionsfaktoren

Die TRB1-Genexpression wird durch proinflammatorische Stimuli reguliert, wobei der zeitliche Verlauf der Expression zelltypabhängig ist [47]. In Makrophagen ist TRB1 durch die Interaktion mit C/EBPβ (CCAAT/Enhancer binding protein β) an der Expression von einer Untergruppe von LPS induzierten Genen beteiligt, die unabhängig von der durch den Toll-like Rezeptor-4 (TLR4) aktivierten NF-κB oder der MAPK abhängigen Transkription sind [54].

Daneben ist TRB1 auch ein Regulator des Transkriptionsfaktors AP-1 [53] und reguliert durch die Interaktion mit MAPKKs, vor allem MEK1 und MKK4, die Aktivität der MAPKKs und auch die Expression von TRB1 selbst [46]. Die Interaktion von TRB1 mit MKK4 führt zu einer erhöhten Aktivität von MKK4 und kontrolliert dadurch die Proliferation und Chemotaxis von vaskulären Zellen der glatten Muskulatur [55].

1.4.3.2 Bei verschiedenen Krankheiten tritt eine veränderte TRB1-Expression auf

Die genaue Funktion von TRB1 bei der Entstehung von Krankheiten ist noch unbekannt, doch deuten verschiedene Befunde daraufhin, dass TRB1 eine Rolle bei Krebs, Immunantworten und dem Metabolischen Syndrom spielt. So scheint TRB1 einen Anteil an der Entstehung der akuten myeloische Leukämie (AML) zu haben. In ungefähr 1% der Krankheitsfälle wird eine Genomamplifikation der Region auf Chromosom 8q24 gefunden [56]. Dieser Abschnitt enthät das Protoonkogen Myc und auch das TRB1-Gen, wobei TRB1 in allen untersuchten Proben überexprimiert war und Myc in nur einer Studie [57].

Eine Rolle für TRB1 in der Transplantationsdiagnostik zeigten Ashton-Chess *et al.* auf. Sie stellten fest, dass sich der TRB1-Gehalt in peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten mit chronischer antikörpervermittelter Abstoßungsreaktion von denen mit anderen Abstoßungsreaktionen unterscheidet. Daher könnte TRB1 als ein neuer Biomarker für Transplantationen fungieren [58].

Neben diesen krebs- und transplantationsrelevanten Funktionen wurde auch eine Rolle für TRB1 im metabolischen Syndrom, vor allem bei Herzkranzgefäßerkrankungen (coronary artery disease (CAD)) postuliert. In genomweiten Assoziationsstudien wurde ein Polymorphismus (SNP (single

nucleotide polymorphism)) in der Sequenz vor dem TRB1-Gen entdeckt, das mit der Menge an Triglyzeriden im Blut assoziiert ist [59]. Dieser SNP wurde in weiteren Studien mit dem Auftreten von polygener Dyslipidämie in Verbindung gebracht [60]. In einer Untersuchung einer asiatisch malayischen Population konnte die Assoziation dieses SNPs mit erhöhtem Cholesterin, erhöhtem LDL-Cholesterin und mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bestätigt werden [61]. Auch wies die Analyse von humanen arteriosklerotischen Arterien eine erhöhte Expression von TRB1 im Vergleich zu nicht arteriosklerotischen Arterien auf [55].

1.4.4 Tribbles 2

Das humane Tribbles 2-Gen (TRB-2, C5FW, SKIP-2, GS3955) liegt auf Chromosom 2 an Position p24.3. Es wurde das erste Mal von Wilkin *et al.* beschrieben, die es zusammen mit TRB1 in mit Mitogenen behandelten Hundeschilddrüsenzellen fanden [52]. Auch konnten sie zeigen, dass TRB2 als phosphoryliertes Protein vorliegt. TRB2 kommt in verschiedenen Zelltypen im Zytosol vor und ist ein instabiles Protein [52, 53, 62]. Die Expression von TRB2 ist abhängig vom Zelltyp und die Regulation über Zytokine kann je nach Zelltyp gegenteilige Effekte erzielen [47].

TRB2 homozygote Knockout-Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Sie überleben bis in das Erwachsenenalter, sind fruchtbar und die Menge ihrer Nachkommen unterscheidet sich nicht von den Wildtypmäusen. TRB2 hat daher keine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung [63].

1.4.4.1 TRB2 wird in Krebszellen überexprimiert und hat einen Einfluss auf Inflammation und Apoptose

Wie auch TRB1 scheint TRB2 eine Rolle bei der Entstehung von Krebs und im Immunsystem zu spielen. So lässt sich eine Überexpression von TRB2 in einer Gruppe von AML-Patienten nachweisen [64, 65]. Vermutlich kommt die Überexpression dadurch zustande, dass MEIS1, ein Homöobox-Kofaktor an die regulatorischen Sequenzen des TRB2-Gens bindet [66]. Die Überexpression führt zur Inaktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBPα. Daneben kooperiert TRB2 auch mit dem Transkriptionsfaktor HoxA9 (Homöobox A9), was zu einem früheren

Ausbruch von AML führt [66]. Auch ist eine erhöhte Expression von TRB2 in Prostatakrebszellen beschrieben [62]

Neben einer Rolle bei Krebserkrankungen hat TRB2 auch eine Funktion in Entzündungsprozessen. So wurden in Patienten mit autoimmuner Uveitis, einer chronischen Entzündungskrankheit, Autoantikörper gegen TRB2 nachgewiesen [67]. Auch ist TRB2 ein Faktor, der bei der Regulierung der inflammatorischen Aktivierung von Monozyten eine Rolle spielt. In Monozyten wird die Expression von TRB2 durch acetyliertes Lipoprotein niedriger Dichte (AcLDL) oder LPS herunterreguliert. TRB2 inhibiert die Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK) und JNK, indem es mit der Kinasedomäne an die vorgeschalteten MAPKK-Komplexe (MKK7 und MEK1) bindet. Die verringerte Expression von TRB2 führt zu einer Aktivierung der Transkription von Interleukin-8 (IL-8) [68].

TRB2 wird daneben auch als ein proapoptotisches Molekül beschrieben, dass Apoptose hauptsächlich in Zellen mit hämatopoetischem Ursprung induziert, indem es die Spaltung und Degradation des in seiner langen From antiapoptotischen Proteins Mcl-1(Myeloid cell leukemia sequence 1) über den Caspase-abhängigen Mechanismus steuert [69].

1.4.5 Tribbles 3

TRB3 (NIPK (neuronal cell death inducible putative kinase); SINK, SKIP3) ist das bisher am besten untersuchte Mitglied der Tribbles-Genfamilie. Das humane Gen liegt auf Chromosom 20, p13-p12.2. TRB3 wurde 1999 von Mayumi-Matsuda *et al*. als ein Gen identifiziert, das durch den Entzug von NGF (Nerve growth factor) induzierter Apoptose in neuronalen Zellen vermehrt exprimiert wird [70]. Im selben Jahr wurde TRB3 in der Leber von neugeborenen Mäusen mit Fettleberdystrophie (fatty liver dystrophy (fld)) beschrieben [71]. Eine TRB3-Überexpression resultierte in einer Lokalisation des Proteins im Zellkern [72] und je nach Zelltyp und Kontext scheint TRB3 unterschiedliche Funktionen in der Zelle zu erfüllen.

1.4.5.1 Die Regulation der TRB3-Genexpression

Die Expression von TRB3 wird in der Leber und im Fettgewebe, jedoch nicht in Muskel- oder Betazellen, durch einen Mangel an Nährstoffen wie Glukose und

Aminosäuren über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) induziert [73; 74; 75]. Neben der PI-3K spielen auch C/EBPβ und CHOP (C/EBP homologue protein), die durch die Aktivierung von PPAR-α (Peroxisome proliferator activated receptor alpha), verstärkt exprimiert werden, eine Rolle in der Aktivierung der TRB3-Expression. Die erhöhte Expression von TRB3 führt zu einer Verzögerung des Zellzyklus in der G2-Phase und zur Verringerung der Zellzahl [74], denn TRB3 interagiert mit CtIP (CtBP-interacting protein) [72], einem wichtigen Faktor im G1/S Übergang währen des Zellzyklus [75].

1.4.5.2 Die Rolle von TRB3 im Metabolismus

In der Leber von Mäusen wird die TRB3-Expression durch Hungern induziert und spielt eine Rolle im Glukosestoffwechsel. Die Aufnahme von Nahrung führt zur Ausschüttung von Insulin. Insulin bindet in der Leber an den Insulinrezeptor und löst dadurch eine Signalkaskade aus, die über die Aktivierung von Akt zur Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT4) an die Zellmembran führt und Glukose wird aus dem Blut in das Gewebe aufgenommen [76]. Die Expression des TRB3-Gens wird durch den durch Hunger induzierten Transkriptionsfaktor PPAR-α aktiviert [77]. TRB3 interagiert mit Akt und inhibiert die Phosphorylierung an Thr^{308} und somit die Insulinsignaltransduktion und Aufnahme von Glukose in die Zelle [78]. Einen weiteren Mechanismus, wie TRB3 die Insulinsignaltransduktion in der Leber beeinflusst, schlugen Matsushima *et al*. vor. Sie zeigten, dass TRB3 in hyperphagen, hyperinsulinämischen, diabetischen db/db- Mäusen stärker exprimiert wird als in schlanken Kontrollmäusen und dass die insulinstimulierte Aktivierung der hepatischen p70 ribosomalen Protein S6 Kinase 1 (S6K1) in diabetischen Tieren inhibiert wird, die durch Nahrung stimulierte Aktivierung jedoch nicht [79]. So kann die Kombination aus erhöhter TRB3-Expression und konstitutiver S6K1 Aktivität zur verringerten Insulinsignaltransduktion beitragen.

Neben dem Hungern hatte auch Alkohol einen Einfluss auf die TRB3-Expression und dies führte zur Entstehung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes durch chronischen Alkoholmissbrauch [80, 81]. Auch unter diesen Bedingungen blockierte TRB3 die Aktivierung von Akt und die damit verbundene Translokation von GLUT4 an die Zellmembran in der Leber [82]. Koh *et al*. zeigten, dass die Funktion von TRB3

die Phosphorylierung von Akt zu inhibieren nicht auf die Leber beschränkt ist. Sie konnten durch das selektive Ausschalten des Tumorsuppressors LKB1 (SKT11; Serin/Threonin Kinase 11) im Skelettmuskel die Insulinsensitivität und die Glukosehomöostase in Mäusen verbessern. Die Expression von TRB3 im Muskel wurde durch das Fehlen von LKB1 stark reduziert und die Überexpression von TRB3 führte wiederum zur Reduktion der Akt-Phosphorylierung [83].

Auch humane Studien über den Q48R Polymorphismus im TRB3-Gen zeigten, dass TRB3 eine Rolle in der Entwicklung von Insulinresistenz spielt. Dieser Polymorphismus steigerte die Aktivität von TRB3 und hatte einen negativen Einfluss auf die Aktivierung von Akt in HepG2 Zellen und wurde mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz und kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert [84, 85]. Desweiteren wurde von Andreozzi *et al*. gezeigt, dass die Substitution des Glutaminrestes (Q) gegen Arginin (R) in humanen Endothelzellen die Insulinsignaltransduktion und NO-Produktion beeinträchtigt. Dieser Befund könnte eine Erklärung abgeben, wie diese Genvariante zur Prädisposition für koronare Herzerkrankungen beiträgt [86]. Interessanterweise zeigte die TRB3 Knockout-Maus keinerlei Phänotyp und hatte eine normale Glukosehomöostase sowie keinen Defekt in der Insulinsignaltransduktion der Leber [87].

Durch Hungern wird TRB3 auch in Fettzellen verstärkt exprimiert. Die Funktion von TRB3 in diesem Gewebe ist aber eine andere als in der Leber. TRB3 stimulierte hier die Lipolyse in dem es den proteasomalen Abbau der Acetyl-Coenzym Carboxylase (ACC) steuerte. Es vermittelte die Assoziation der E3 Ubiquitinligase COP1 (constitutive photomorphogenic protein 1) an ACC, das daraufhin proteasomal abgebaut wurde. Mäuse, die TRB3 in Fettzellen transgen exprimierten waren vor ernährungsbedingter Adipositas geschützt, indem sie eine erhöhte Lipolyserate im Fettgewebe aufwiesen [88].

1.4.5.3 TRB2 und TRB3 spielen eine Rolle in der Adipozyten-differenzierung

TRB2 und TRB3 sind negative Regulatoren der Adipozytendifferenzierung. So wird die Expression von TRB2 in den ersten 48 h und von TRB3 in den ersten Tagen der *in vitro* Differenzierung herunterreguliert. TRB2 reduzierte die Menge des für die ersten Schritte der Adipozytendifferenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor C/EBPβ

durch einen proteasomabhängigen Mechanismus. Durch die Verminderung der TRB2-Proteinmenge wurde C/EBPβ nicht abgebaut und C/EBPβ regulierte Gene, z.B. C/EBP-α, die für den Beginn der Differenzierung wichtig sind [89]. Nach den ersten Tagen der Induktion wurde TRB3 wieder verstärkt exprimiert und TRB3 inhibierte die Kinaseaktivität von ERK und somit die Phosphorylierung von C/EBPβ und damit die Transaktivierung der Promotoren von C/EBPα und a-FABP (fatty acid binding protein) [90]. Einen etwas anderen Mechanismus stellten Takahashi *et al*. vor, die zeigten, dass TRB3 die transkriptionelle Aktivität von PPARγ durch Protein-Protein-Interaktion inhibiert [91].

1.4.5.4 TRB3 spielt eine Rolle bei ER-Stress und Apoptose

Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) hat einen Einfluss auf neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson [92, 93]. Er kann durch Sauerstoffmangel (Hypoxia) oder Mangel an neurotrophen Faktoren ausgelöst werden. Dadurch kommt es zur Expression von ER-Stressantwortgenen wie ATF4 (activating transcription factor 4) oder CHOP und zur Apoptose der Nervenzellen [94-97]. ER-Stress induziert die Expression von TRB3 in neuronalen Zellen und blockiert die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von Akt und die Transduktion von Überlebenssignalen. TRB3 interagiert mit ATF4 und CHOP wodurch die ATF4 und CHOP abhängige Genexpression inhibiert wird [98, 99]. ATF4 und CHOP sind wiederum selbst an der positiven Regulation von TRB3 unter Stressbedingungen beteiligt [100]. Allerdings haben Corcoran *et al.* gezeigt, dass zellulärer Stress die TRB3-Expression sowohl induzieren als auch inhibieren kann [101]. Der Einfluss von TRB3 auf die Apoptose kann aber auch über einen weiteren Mechanismus ablaufen. So interagierte TRB3 nach TNF-α-(Tumor Nekrose Faktor alpha) Stimulation mit p65/RelA und inhibierte dessen Aktivierung durch die Phosphorylierung durch die PKAc (Proteinkinase A c). Dadurch wurde die NF-κB abhängige Gentranskription, die für das Überleben der Zelle wichtig ist, inhibiert [102].

Der Abbau von TRB3 erfolgt über das Proteasom. Die E3 Ubiquitinligase SIAH1 (Seven in absentia homolog 1) vermittelt die Ubiquitinylierung und Degradation von TRB3 und blockiert dadurch die Verstärkung der TGF-β-Signaltransduktion durch TRB3 [103].

1.5 Ziel der Arbeit

Adipositas und die Folgekrankheiten wie Typ 2 Diabetes und Arteriosklerose verbreiten sich in der Weltbevölkerung immer mehr. Die molekularen Ursachen sind bisher noch nicht vollständig bekannt. Basierend auf ihrer beschriebenen Funktion im Metabolismus und der Inflammation, soll in dieser Arbeit die Rolle der Tribbles-Pseudokinasen untersucht werden. Die Funktionen der drei Tribbles-Gene sind sehr unterschiedlich und doch überlappen sie in verschiedenen Gebieten, wie z.B. die Regulation ihrer Expression durch Zytokine und ihr Einfluss auf die Inflammationsreaktion, ihrer Rolle in der Zelldifferenzierung und in der Tumorentstehung sowie ihre Interaktion mit und der daraus resultierenden Regulation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Diese Eigenschaften machen die Gruppe der Tribbles-Gene zu einem interessanten Studienobjekt. Dazu soll in dieser Arbeit die Expression der Gene TRB1, TRB2 und TRB3 im Fettgewebe von Mäusen untersucht werden, die unter Adipositas, Sepsis und Krebskachexie leiden. Ausgehend davon soll die Regulation und Funktion der am stärksten regulierten Pseudokinase im Fettgewebe näher charakterisiert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Expression der Tribbles-Pseudokinasen in Geweben von Mäusen

2.1.1 Der Effekt von Hunger und Nahrung auf die Expression der Tribbles-Gene

Die Zufuhr von Nahrung oder dessen Mangel führt zu einer veränderten Genexpression vor allem in der Leber, im Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur. Adipositas als Zustand des Nahrungsüberflusses oder Anorexie als Zustand des Hungerns sind die jeweiligen Extremzustände, auf die der Stoffwechsel mit einer stark veränderten Genexpression reagiert. Als eine Gengruppe, die unter diesen metabolischen Bedingungen reguliert wird, wurden die Tribbles-Pseudokinasen beschrieben. Die Expression dieser Gene ist zelltypspezifisch und wird unter inflammatorischen Bedingungen reguliert [47]. Auch im Stoffwechsel spielen die Tribbles-Pseudokinasen eine Rolle. So wird TRB3 in der Leber unter Hunger verstärkt exprimiert und auch in diabetischen, adipösen db/db-Mäusen kann man diesen Effekt beobachten. TRB3 blockiert die Insulinsignaltransduktion in der Leber indem es die Phosphorylierung von Akt verhindert [78].

Für die nähere Analyse der Tribbles-Genexpression im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA aus verschiedenen Geweben diverser Mausmodelle des metabolischen Syndroms, von Sepsis und Krebskachexie isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression via quantitativer Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt.

2.1.2 Tiermodelle des metabolischen Syndroms

Mausmodelle des metabolischen Syndroms, die vor allem Adipositas und Insulinresistenz zeigen, sind die monogenetischen leptindefizienten ob/ob- und die leptinrezeptordefizienten db/db-Mäuse. Als polygenetisches Modell der Adipositas dienen die NZO- (New Zealand Obese) Mäuse und als Modell der durch Nahrungsaufnahme induzierten Adipositas dienten mit einer Hochfettdiät gefütterte Mäuse.

2.1.2.1 Die Expression der Tribbles-Pseudokinasen in peripheren, metabolisch aktiven Geweben ist gewebsspezifisch und abhängig vom metabolischen Zustand

Die Expression der Tribbles-Pseudokinasen wurde in metabolisch stark aktiven peripheren Geweben wie der Leber, der Skelettmuskulatur und des epididymalen Fettgewebes unter 48 h Hunger und anschließender 24 h Futtergabe in 8 Wochen alten C57BLKS Mäusen analysiert. Dabei zeigten die drei homologen Tribbles-Gene ein gewebsspezifisches und ein vom Metabolismus abhängiges Expressionsprofil. Im Fettgewebe wurde die TRB1-Expression nach Futtergabe signifikant erhöht, wohingegen die Expression von TRB3 signifikant reduziert wurde und die Expression von TRB2 sich nicht signifikant veränderte (Abb. 2.1 A). In der Leber wurde die Expression von TRB1 und TRB2 nicht reguliert, wohingegen die Expression von TRB3 wie im Fettgewebe unter Nahrungsaufnahme reduziert war (Abb. 2.1 B, $p< 0,06$). Die Expression der Tribbles-Gene in der Skelettmuskulatur wurde unter diesen Bedingungen nicht signifikant reguliert (Abb. 2.1 C). Die Regulation der Expression von TRB1 war unter den gegebenen Bedingungen im Fettgewebe am stärksten, daher wurde in den weiteren Versuchen die Expression der Tribbles-Gene nur noch im Fettgewebe analysiert.

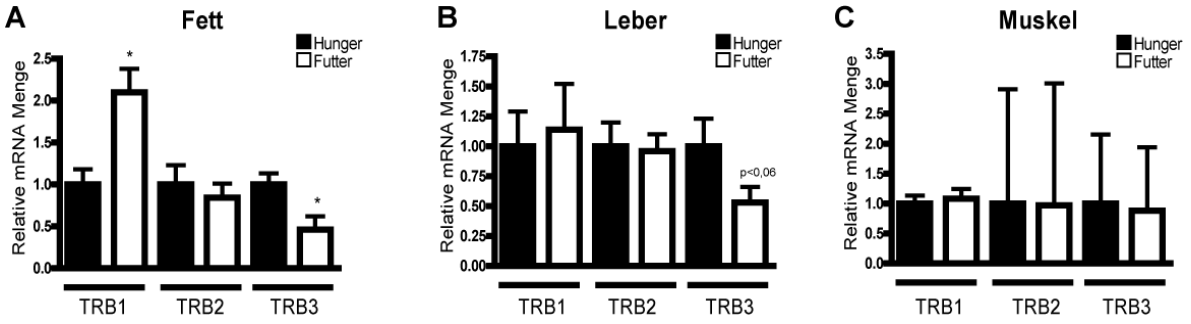


Abb. 2.1: Tribbles-Genexpression in peripheren Geweben von C57BLKS Mäusen. Die Tiere wurden 48 h gehungert und anschließend 24 h gefüttert. Die RNA wurde aus epididymalem Fettgewebe, der Leber und der Skelettmuskulatur isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression von TRB1 (**A**), TRB2 (**B**) und TRB3 (**C**) mit quantitativer Real Time PCR bestimmt. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und die gemittelten relativen mRNA Mengen ± SEM (n= 3-4) gegen die Menge im Hungerzustand (=1) aufgetragen. *$p<0,05$ (Student‘s T-Test).

2.1.2.2 TRB1 wird im Fettgewebe der monogenetischen Mausmodelle db/db und ob/ob verstärkt exprimiert

Für die Untersuchung der Tribbles-Genexpression im Fettgewebe unter Bedingungen des metabolischen Syndroms wurden zwei Mausmodelle mit einem jeweiligen Defekt in der Leptinsignaltransduktion, db/db- und ob/ob-Mäuse, verwendet. Die Tiere leiden unter Adipositas und Insulinresistenz. Die ob/ob-Tiere und der entsprechende Wildtyp (Wt) C57BL/6J wurden 24 h gehungert und danach 12 h wiedergefüttert, während die db/db-Tiere und der korrespondierende Wt 48 h gehungert und anschließend 24 h lang Futter erhielten. Die Expression der Tribbles-Gene wurde im epididymalen Fettgewebe per quantitativer Real Time PCR untersucht.

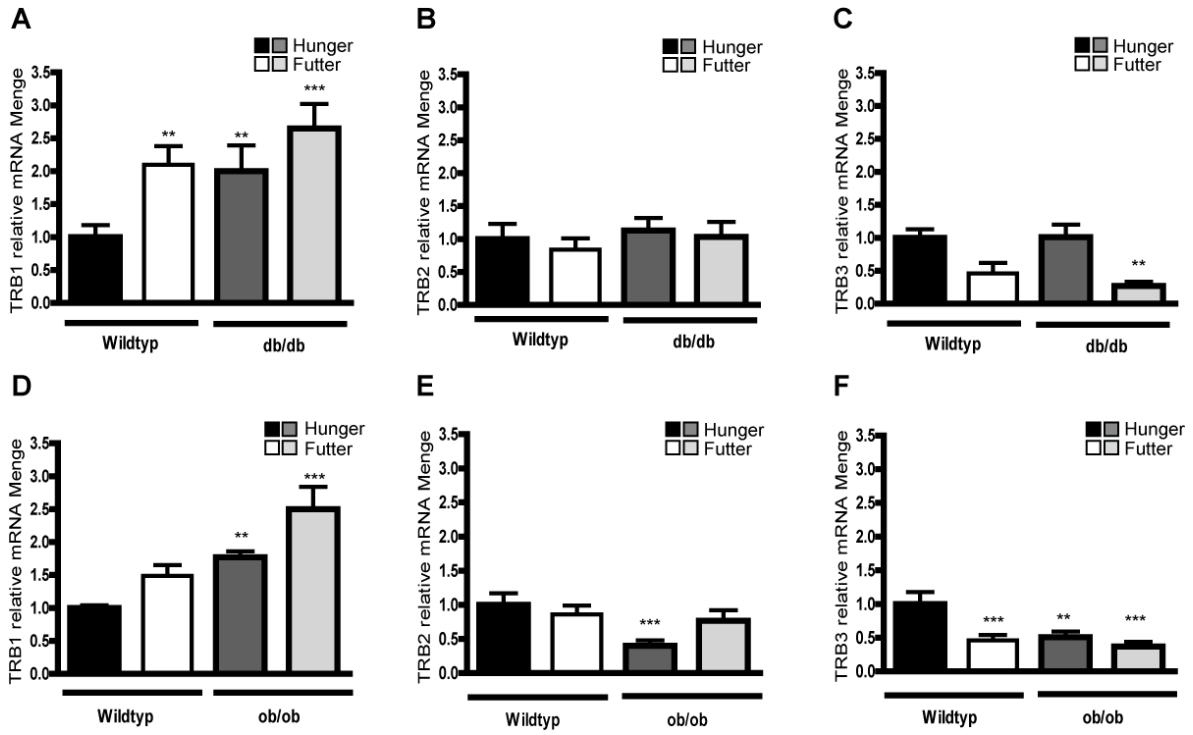


Abb. 2.2: Tribbles-Genexpression in Wildtyp- (Wt), db/db- und ob/ob-Mäusen unter Hunger und Futter. Die 8 Wochen alten Wt- und db/db-Tiere wurden 48 h gehungert und danach 24 h gefüttert; die Wt- und ob/ob-Mäuse wurden 24 h gehungert und anschließend 12 h gefüttert. Die RNA wurde aus epididymalem Fettgewebe isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression von TRB1 (**A**), TRB2 (**B**) und TRB3 (**C**) per quantitativer Real Time PCR bestimmt. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und die relativen mRNA Mengen ± SEM (n= 3-4) gegen die Menge unter Hunger (=1) der Wt-Mäuse aufgetragen. **p<0,01, ***p<0,001 (One-Way ANOVA).

Die Expression von TRB1 war in db/db- (Abb. 2.2 A) sowie in ob/ob-Mäusen (Abb. 2.2 D) unter Hunger wie auch unter Futtergabe signifikant erhöht. Die TRB2 Expression war im Fettgewebe von Wt- und db/db-Tieren (Abb. 2.2 B) unter diesen Bedingungen nicht reguliert, während sie in gehungerten ob/ob-Tieren (Abb. 2.2 E)

reduziert war. Die Expression von TRB3 wurde in Wt- wie in db/db-Tieren (Abb.2.2 C) unter Futtergabe reduziert. Die Expression in ob/ob-Tieren (Abb. 2.2 F) war im Vergleich zum Wt unter beiden metabolischen Zuständen reduziert.

So hatte nicht nur die Zufuhr von Nahrung, sondern auch der veränderte Stoffwechsel unter adipösen Bedingungen, ausgelöst durch das Fehlen des Leptinsignals, einen Einfluss auf die Expression der Tribbles-Gene.

2.1.2.3 Die TRB1-Expression ist im Fettgewebe des polygenetischen Modells NZO nicht reguliert

Die NZO- (New Zealand Obese) Mäuse sind ein polygenetisches Modell der Adipositas. Für die Untersuchung der Tribbles-Genexpression wurden die NZO-Mäuse und die entsprechenden Wt- (NZB (New Zealand Black) Mäuse für 24 h gehungert und für 12 h wieder gefüttert. Die RNA wurde aus den epididymalen Fettdepots isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression der Tribbles-Gene per quantitativer Real Time PCR analysiert.

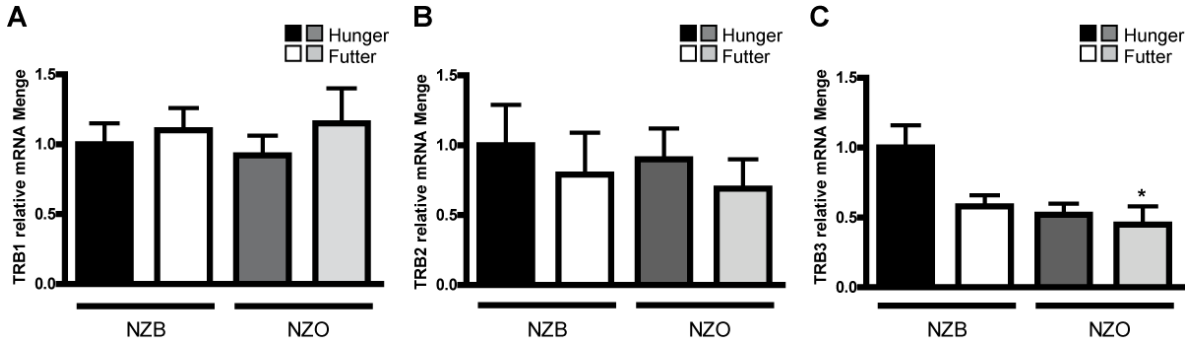


Abb. 2.3: Tribbles-Genexpression im polygenetischen Adipositas-Mausmodell NZO. Die NZB- und NZO-Tiere wurden 24 h gehungert und 12 h gefüttert. Die RNA wurde aus epididymalem Fettgewebe isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression von TRB1 (**A**), TRB2 (**B**) und TRB3 (**C**) per quantitativer Real Time PCR bestimmt. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und die relativen mRNA Mengen ± SEM (n= 4) gegen die Menge im Hungerzustand (=1) der NZB-Mäuse aufgetragen. *p<0,05 (One-Way ANOVA).

Die Expression von TRB1 und TRB2 war in den NZO- und den NZB-Tieren unter den gegebenen Bedingungen nicht reguliert (Abb. 2.3 A, B). Im Gegensatz dazu war die Expression von TRB3 in den NZO-Tieren reduziert, sowie auch in den NZB-Tieren nach Futtergabe, wenn auch nicht signifikant (Abb. 2.3 C). Die genetische Prädisposition dieser Tiere hatte keinen Einfluss auf die Expression von TRB1 und TRB2, aber auf TRB3.

2.1.2.4 Die TRB1-Expression wird unter Hochfettdiät im Fettgewebe nicht reguliert

Da Hyperphagie ein Merkmal der db/db- und ob/ob-Mäuse ist, wurde der Einfluss der erhöhten Nahrungsaufnahme auf die Tribbles-Genexpression im Fettgewebe von Mäusen nach einer Hochfettdiät analysiert. Für die Induktion einer nahrungsbedingten Adipositas wurden C57BL/6-Mäuse 12 Wochen lang mit einer Diät gefüttert, die 60% Fett enthielt, (S. Kersten, Wageningen). Die Kontrollgruppe wurde mit dem normalen Futter (10% Fett) gefüttert. Die Tiere nahmen durch die HFD mehr zu als durch die Normafettdiät (NFD) (Daten nicht gezeigt; S. Kersten, persönliche Mitteilung). Die RNA wurde aus den epididymalen Fettdepots isoliert, cDNA synthetisiert und die Tribbles-Genexpression per quantitativer Real Time PCR analysiert. Das Füttern der Mäuse mit der Hochfettdiät führte zu einer Gewichtszunahme (persönliche Mitteilung, S.Kersten), dennoch veränderte sich die Expression der Tribbles-Gene nicht signifikant (Abb. 2.4). Die Futteraufnahme allein konnte somit nicht für die erhöhte Expression von TRB1 im Fettgewebe von db/db- und ob/ob-Mäusen verantwortlich sein.

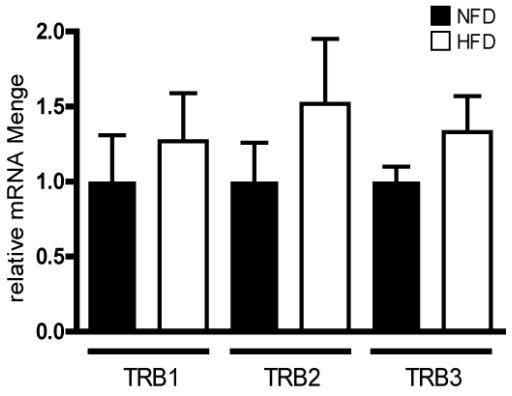


Abb. 2.4: Tribbles-Genexpression in epididymalem Fettgewebe von C57BL/6 Mäusen nach 12 Wochen Hochfettdiät (HFD) und normaler Diät (NFD). Die Tiere wurden für 12 Wochen mit einer Hochfettdiät (60% Fett) oder einer Diät mit normalem Fettgehalt (10% Fett) gefüttert. Die RNA wurde aus epididymalem Fettgewebe isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression von TRB1, TRB2 und TRB3 per quantitativer Real Time PCR bestimmt. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und die relativen mRNA Mengen ± SEM (n= 7-8) gegen die Menge der Mäuse, die mit Normalfettfutter (=1) gefüttert wurden, aufgetragen.

2.1.2.5 Eine Leptinbehandlung von ob/ob-Mäusen führt zu keiner Veränderung der TRB1-Expression im Fettgewebe

Wie in Abb. 2.2 D dargestellt, zeigten die ob/ob-Mäuse eine erhöhte TRB1-Expression im Fettgewebe. Da den Mäusen das Gen für Leptin fehlt, kann der damit verbundene adipöse und insulinresistente Phänotyp durch die tägliche Gabe von Leptin über die Dauer von drei Wochen verbessert werden. Die Tiere verlieren in diesem Zeitraum deutlich an Gewicht (P. Narvekar, Dissertation [104]). Den ob/ob-Tieren sowie den Kontrolltieren wurden 21 Tage lang täglich entweder eine isotonische Salzlösung oder 5 µg/g Körpergewicht Leptin subkutan injiziert. Die Expression von TRB1 wurde in den epididymalen Fettdepots untersucht. Unabhängig von der Leptinbehandlung war die Expression von TRB1 im Fettgewebe der ob/ob-Tiere erhöht (Abb. 2.5 A). Auch die Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten mit 10 ng/ml Leptin führte nicht zu einer signifikanten Änderung der TRB1-Expression (Abb. 2.5 B). Daher konnte der Einfluss von Leptin als Ursache für die Regulation der TRB1-Expression ausgeschlossen werden.

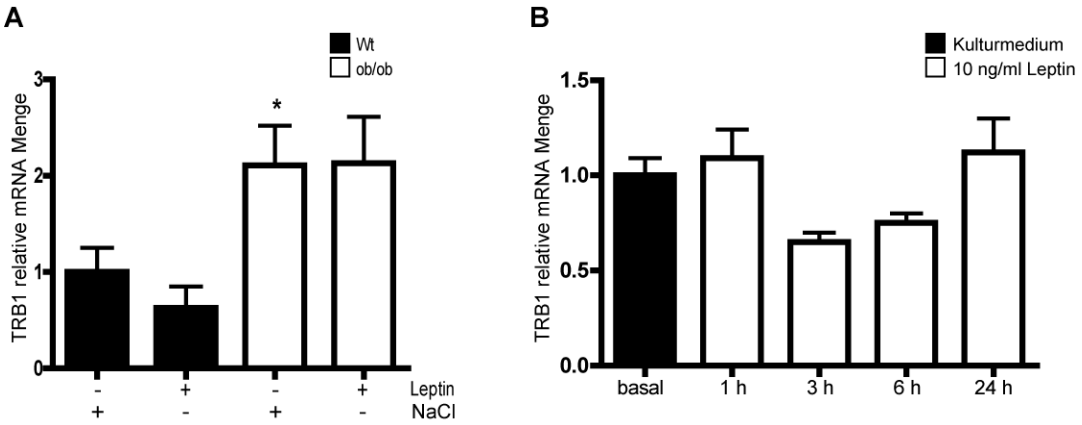


Abb. 2.5: Einfluss von Leptin auf die TRB1-Expression in Wt- und ob/ob-Tieren und 3T3-L1 Adipozyten. A: Wt- und ob/ob-Mäuse wurden 21 Tage lang mit 5 µg/g Körpergewicht Leptin behandelt. Die TRB1-Expression wurde per quantitativer Real time PCR analysiert. Die Werte wurden gegen die Expression von TBP normalisiert und auf die Expression in Wt-Mäusen unter NaCl Behandlung (= 1) bezogen. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM, (n= 4-5)). *p < 0,05, One-Way ANOVA. **B:** 3T3-L1 Adipozyten wurden über den angegebenen Zeitraum mit 10 ng/ml Leptin behandelt und anschließend die TRB1-Expression per qPCR bestimmt Die Werte wurden gegen die Expression von TBP normalisiert und auf die basale Expression von TRB1 bezogen. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3).

2.1.3 Tiermodell der LPS induzierten Sepsis

Die Hyperphagie und Leptin konnten als Ursache für die erhöhte TRB1-Expression ausgeschlossen werden. Da die Expression der Tribbles-Gene durch proinflammatorische Signale reguliert wird und im Fettgewebe adipöser Mäuse eine subakute Entzündungsreaktion abläuft, wurde als nächstes der Einfluss einer systemischen Entzündungsreaktion auf die Expression der Tribbles-Gene im Fettgewebe analysiert. Dazu wurden acht Wochen alte C57BL/6-Mäuse über Nacht gehungert, mit 20 mg/kg Körpergewicht LPS bzw. die Kontrolltiere mit PBS injiziert. Die LPS induzierte Sepsis in Mäusen geht neben der starken Inflammation einher mit Anorexie, und verstärkter Lipolyse. Die mit LPS injizierten Tiere leiden daher unter Anorexie. Um den Effekt auf die Genexpression durch die Nahrungsaufnahme auszuschließen, wurden auch die mit PBS injizierten Tiere über den Zeitraum des Versuchs gehungert (E. Chichelnitsky, Dissertation [105]).

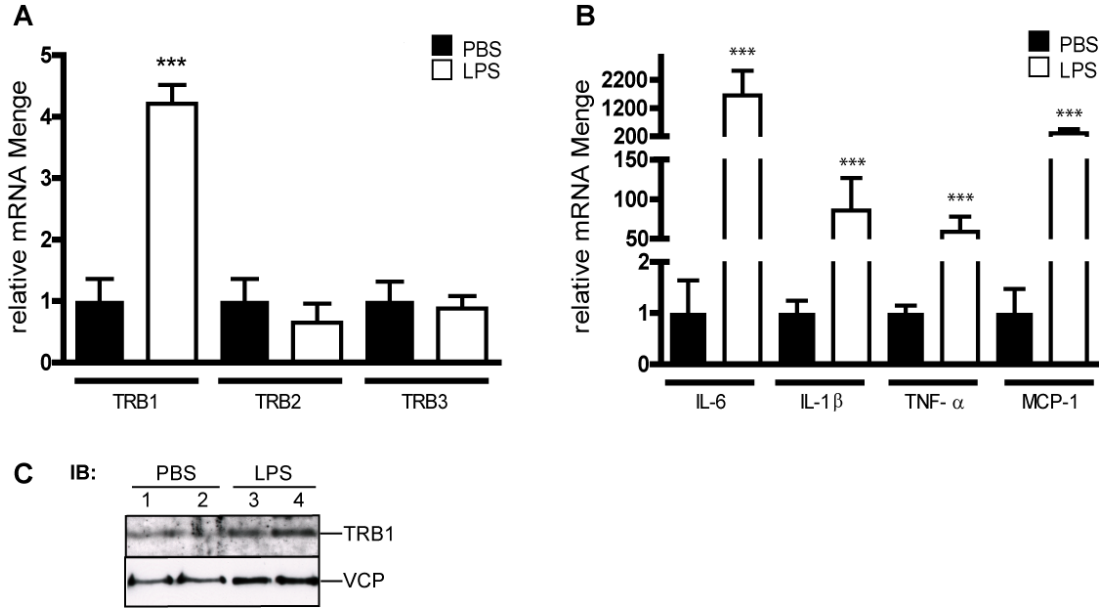


Abb. 2.6: Tribbles-Genexpression im epdidymalen Fettgewebe unter septischen Bedingungen. C57BL/6 Mäuse wurden für 8 h mit 20 mg/kg Körpergewicht LPS oder PBS behandelt. **A:** Die TRB1-, TRB2- und TRB3-Genexpression wurde per quantitativer Real time PCR analysiert. **B:** Der Zustand der Inflammation im Fettgewebe wurde über die Analyse der Genexpression von proinflammatorischen Genen (IL-6, IL-1β, TNF-α und MCP-1) festgestellt. Alle Werte wurden gegen die Expression von TBP normalisiert und auf die Expression in PBS behandelten Wt-Mäusen (= 1) bezogen. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n= 5-6). ***p < 0,001, Student‘s T-Test. **C:** Immunodetektion von TRB1 im epididymalen Fettgewebe von mit PBS (1;2) bzw. LPS (3;4) behandelten Tieren. Das Gewebe wurde in 2x SDS-Urea-Puffer homogenisiert und das Lysat über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. TRB1 und VCP wurden per Immunoblot (IB) detektiert.

2.1.3.1 TRB1 wird im Fettgewebe im Tiermodell der LPS-induzierten Sepsis verstärkt exprimiert

Die Expression der Tribbles-Gene unter induzierten inflammatorischen Bedingungen, wie während einer Sepsis, wurde im epididymalen Fettgewebe von Tieren 8 h nach der LPS Behandlung, analysiert.

Die Expression von TRB1 wurde unter inflammatorischen Bedingungen im Fettgewebe signifikant erhöht, wohingegen die Expression von TRB2 und TRB3 sich nicht signifikant änderte (Abb. 2.6 A). Auch die TRB1-Proteinmenge nahm durch die Stimulation mit LPS zu (Abb. 2.8 C). Als Marker für das Vorhandensein einer starken inflammatorischen Reaktion im Fettgewebe wurde die Expression der Zytokine und Chemokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1β (IL-1β), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) sowie des Monocyte chemotatic protein-1 (MCP-1) analysiert. Alle zeigten eine signifikant stark erhöhte Expression nach der LPS Injektion (Abb. 2.6 B).

Das Vorhandensein einer Entzündungsreaktion und/oder deren Folgen, wie Lipolyse oder ein erhöhter Insulinspiegel, könnten die Ursache für die erhöhte Expression von TRB1 im Fettgewebe sein. Daher sollte in einem anderen Krankheitsmodell, der Tumorkachexie, dass auch durch erhöhte Enzündungsmediatoren charakterisiert ist, die Expression der Tribbles-Gene analysiert werden.

2.1.4 Tiermodell der Krebskachexie

Die Krebskachexie, auch als „Wasting syndrome“ bekannt, zeichnet sich durch einen starken katabolen Zustand aus. Vermutlich treiben bestimmte Signalstoffe, wahrscheinlich Zytokine, die vom Tumor sezerniert werden, den Körper in den katabolen Zustand. Damit einher geht auch eine Anorexie, die den katabolen Zustand noch verstärkt. In Mäusen kann dieser Zustand durch die Injektion von Darmtumorzellen vom Typ Colon26 hervorgerufen werden. 8-10 Tage nach der Injektion eintwickeln die Tiere einen Tumor und zeigen einen kachektischen Phänotyp.

2.1.4.1 TRB1 wird im Fettgewebe kachektischer Tiere verstärkt exprimiert

Die Analyse des epididymalen Fettgewebes kachektischer Mäuse zeigte eine signifikante Erhöhung der TRB1-Expression ($p < 0,05$), wohingegen die Expression von TRB3 keine signifikante Veränderung zeigte (Abb. 2.7). Die Expression von

TRB2 wurde in diesem Versuch nicht bestimmt. Die erhöhte Expression von TRB1 im Fettgewebe könnte auch in diesem Modell durch proinflammatorische Signale ausgelöst worden sein, da Hungern zu einer Reduktion der TRB1-Expression führte.

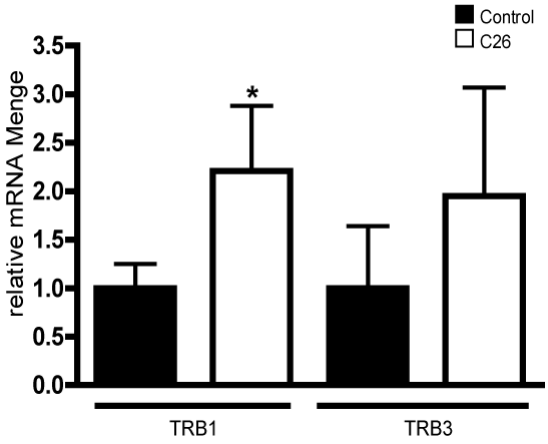


Abb. 2.7: Expression von TRB1 unter kachektischen Bedingungen im Fettgewebe. C26 Zellen wurden subkutan in Mäuse injiziert und diese entwickelten nach 8-10 Tagen einen Tumor und einen kachektischen Phänotyp. Die TRB-Expression wurde per quantitativer Real time PCR analysiert. Die Werte wurden gegen die Expression von TBP normalisiert und auf die Expression in Mäusen mit PBS-Behandlung (= 1) bezogen. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM, (n=3-4). *p < 0,05, Student‘s T-Test

Die Analysen der verschiedenen Mausmodelle zeigten, dass nicht nur der Ernährungszustand der Tiere, sondern besonders das Vorhandensein einer Entzündungsreaktion einen Einfluss auf die TRB1-Expression im epididymalen Fettgewebe hatte. Um herauszufinden wie bzw. durch was die TRB1-Expression reguliert wird, und welche Funktion TRB1 im Fettgewebe ausübt, wurden die folgenden Experimente in 3T3-L1 und primären Adipozyten durchgeführt.

2.2 Die Regulation der TRB1-Pseudokinase in Adipozyten

Das Fettgewebe in den unter 2.1 analysierten Mäusen besteht zum größten Teil aus differenzierten Fettzellen, aber auch aus Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen, vor allem Makrophagen [9]. Für die nähere Untersuchung der Regulation des TRB1-Gens in Adipozyten wurde zum einen die Mäusefibroblastenzelllinie 3T3-L1 verwendet, zum anderen die stromale vaskuläre Fraktion (SVF) des inguinalen Fettgewebes. Beide Zelltypen können unter Verwendung verschiedener Stimulantien (IBMX, Insulin, Dexamethason, Aprotinin,

Biotin, Pantothensäure, sowie Rosiglitazon und T3) in weiße Fettzellen differenziert werden [106-108].

Die Differenzierung dauerte 10-12 Tage. Anschließend wurden die Zellen für die Versuche verwendet. Die Öl-Rot-O-Färbung der differenzierten Adipozyten färbte die Lipidtröpfchen in den Zellen rot und war ein Nachweis für die Differenzierung der 3T3-L1 (Abb. 2.8. A) und der SVF (Abb. 2.8 B) zu Adipozyten.

Für die Genexpressionsanalysen wurde die RNA aus den Zellen isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression per quantitativer Real Time PCR analysiert.

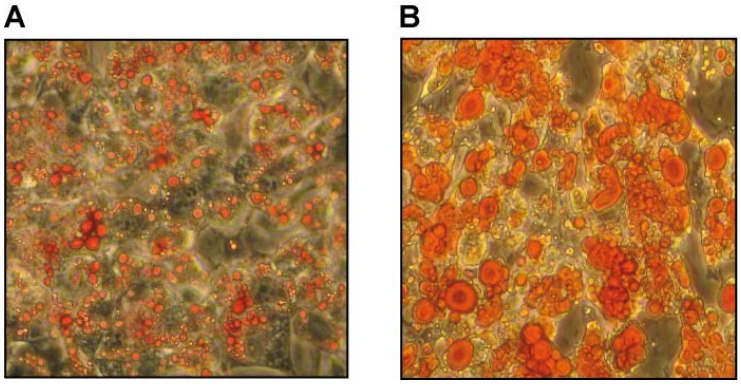


Abb. 2.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von differenzierten 3T3-L1 und primären inguinalen Adipozyten nach Öl-Rot-O Färbung. Die 3T3-L1 (**A**) bzw die SVF (**B**) des inguinalen Fettgewebes wurden differenziert und 10 Tage (**A**), bzw 12 Tage (**B**) später mit Formaldehyd fixiert, mit Öl-Rot-O gefärbt und bei einer 20x Vergrößerung fotografiert.

2.2.1 Die TRB1-Expression wird durch Insulin reguliert

Die db/db- und ob/ob-Mäuse zeigen schon früh in ihrer Entwicklung als Zeichen der Insulinresistenz einen erhöhten Insulinspiegel im Serum [109, 110]. Um den Effekt von Insulin auf die TRB1-Expression zu untersuchen, wurden differenzierte 3T3-L1 Zellen über Nacht ohne Serum kultiviert und die Zellen in Niedrigglukosemedium (DMEM mit 1 g/l Glukose) mit 10 nMol/l Insulin für 10 min, 30 min, 60 min und 5 h stimuliert. Die TRB1-Expression wurde per qPCR analysiert. Die TRB1-Expression erhöhte sich signifikant nach einer Stunde Insulinbehandlung (3,99 ± 1,05; $p < 0,01$) (Abb. 2.9). Auch nach 5 h war die Expression noch signifikant erhöht (2,29 ± 0,65; $p < 0,01$). Insulin kann auch den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren und so pro- und antiinflammatorische Effekte ausüben [111, 112]. Um zu untersuchen, ob die Wirkung von Insulin auf die TRB1-Expression vom Transkriptionsfaktor NF-κB

abängig ist, wurden 3T3-L1 Adipozyten mit 50 µMol/l Parthenolide 30 min vorinkubiert und danach mit 10 nMol/l Insulin für 1 h stimuliert und die Expression von TRB1 mittels qPCR analysiert. Die Induktion der TRB1-Expression wurde durch die Inhibition des NF-kB-Transkriptionsfaktors blockiert (Abb. 2.9 B). Die Expression von TRB1 konnte daher durch Insulin über die Aktiverung von NF-κB positiv beeinflusst werden.

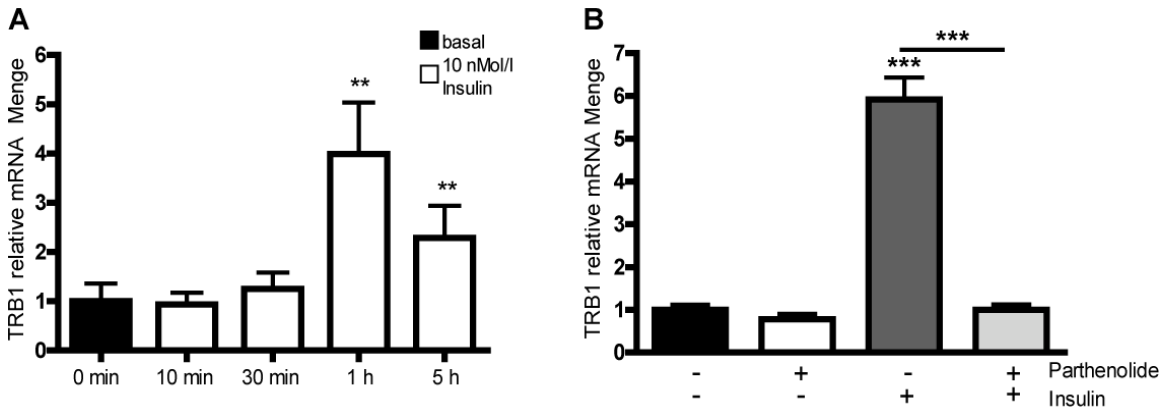


Abb. 2.9: TRB1-Expression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit Insulin. A: 3T3-L1 Adipozyten wurden über Nacht ohne FCS kultiviert und mit 10 nMol/l Insulin in DMEM (1g/l Glukose) über die angegebene Zeit stimuliert. **B**: 3T3-L1 Adipozyten wurden mit 50 µMol/l Parthenolide, mit 10 nMol/l Insulin oder beiden Stimulantien zusammen 1 h inkubiert. Die RNA wurde isoliert, cDNA synthetisiert und die TRB1-Expression mittel qPCR analysiert. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3), **p < 0,01, One-way ANOVA, Dunnetts Post Test.

2.2.2 Die TRB1-Expression wird durch von Makrophagen sezernierte Faktoren reguliert

Nicht nur die Menge an Insulin im Serum ist in den db/db- und ob/ob-Mäusen erhöht, durch die Expansion des Fettgewebes kommt es auch zu einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen in das Fettgewebe und zu einer chronischen Entzündungsreaktion [29, 113].

Um auszuschließen, dass die erhöhte Expression von TRB1 im Fettgewebe auf die aktivierten und eingewanderten Makrophagen zurückzuführen ist, wurden primäre Knochenmarksmakrophagen aus den Oberschenkelknochen von C57BL/6J-Mäusen präpariert, kultiviert, differenziert und mit 100 ng/ml LPS für 2 h, 6 h, 8 h und 24 h behandelt. Die TRB1-Expression wurde per qPCR analysiert. Die Expression von TRB1 in den analysierten Makrophagen wurde durch die Stimulation mit LPS

herunterreguliert (Abb. 2.10 A). Daher kann man von einem fettzellspezifischen Expressionsprofil für TRB1 in den zuvor gezeigten Experimenten ausgehen (Abb. 2.1 A; Abb. 2.2 A, D; Abb. 2.6 A)

Da TRB1 im Fettgewebe der septischen Mäuse verstärkt exprimiert wurde (Abb. 2.6 A), wurde der Effekt von proinflammatorischen Zytokinen, die von Makrophagen sezerniert werden, auf die TRB1-Expression untersucht. RAW264.7 Makrophagen wurden mit Kulturmedium mit 100 ng/ml LPS für 3,5 h bei 37°C stimuliert („conditioned medium“ (CM)) oder nur in Kulturmedium (M) gehalten. Anschließend wurde das Medium abgenommen, filtriert und auf die differenzierten Adipozyten, 3T3-L1 und primäre, für 3 h, 6 h und 24 h gegeben. Die Expression der Tribbles-Gene wurde per qPCR analysiert.

In den 3T3-L1 Adipozyten wie auch in den primären inguinalen Adipozyten wurde die TRB1-Expression durch LPS erhöht, wenn auch nur signifikant nach 6 h in 3T3-L1 Zellen. Die Expression wurde signifikant in der Zelllinie sowie in den primären Zellen durch das konditionierte Makrophagenmedium erhöht. Die Expression von TRB1 erhöhte sich durch die Stimulation mit CM nach 3 h, steigert sich nach 6 h und lag nach 24 h wieder auf dem Ausgangsniveau (Abb. 2.10 B, E). Das ohne LPS konditionierte Makrophagenmedium (M) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die TRB1-Expression. Die Expression von TRB2 wurde durch die Behandlung mit CM nach 3 h und 6 h reduziert, wohingegen die Expression nach 24 h stark erhöht war (Abb. 2.10 C, F). Auch die Expression von TRB3 wurde nach 3 h durch CM reduziert. LPS, M und CM führten nach 24 h zu einer erhöhten TRB3-Expression (Abb.2.10. D, G).

Die Expression aller drei Tribbles-Gene wurde durch das LPS-konditionierte Medium beeinflusst und die Expression von TRB1 wurde, wie auch im Fettgewebe von mit LPS behandelten Tieren, verstärkt exprimiert. Die Expression von TRB1 scheint daher durch von aktivierten Makrophagen sezernierten Faktoren beeinflußt zu werden.

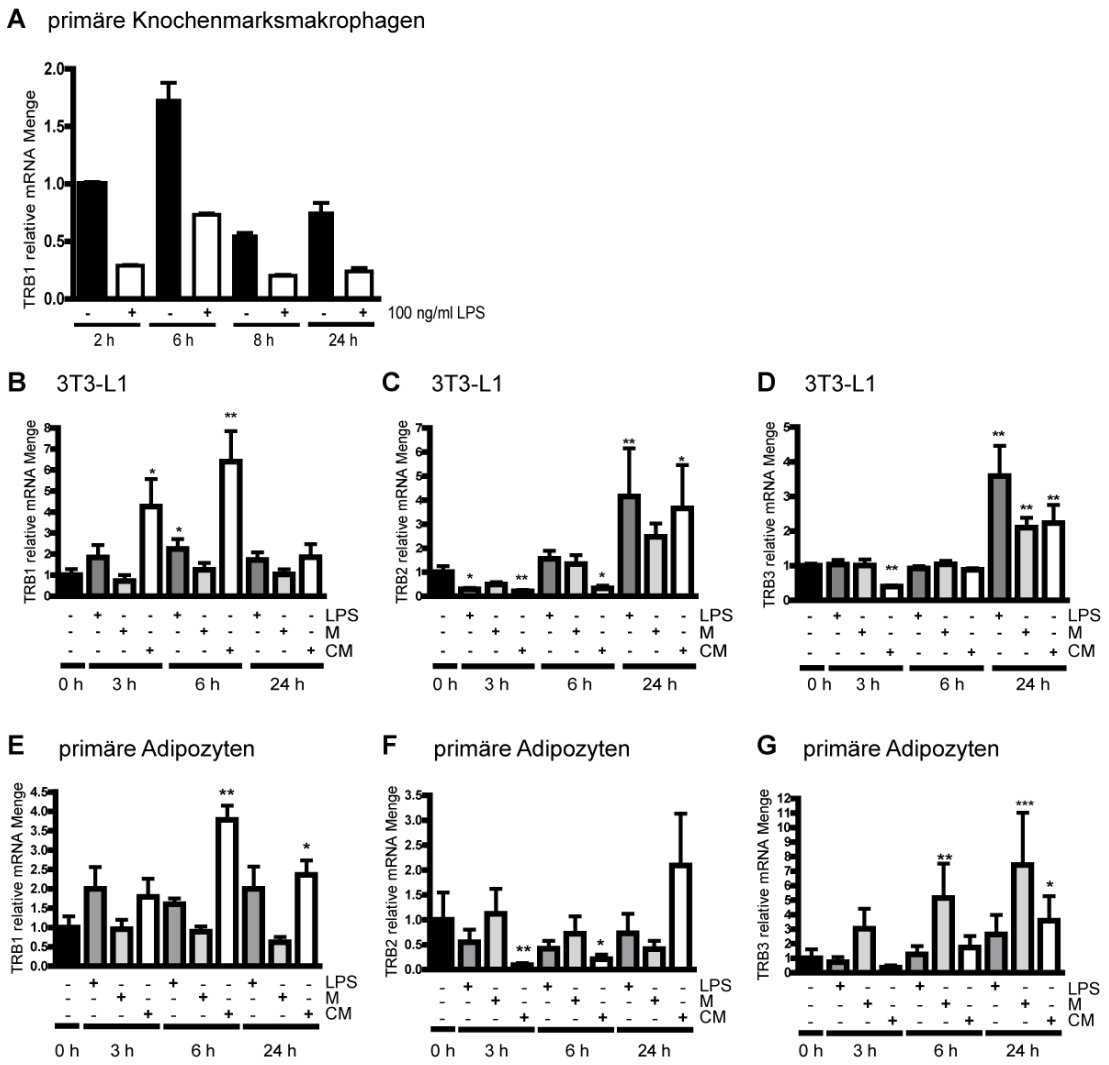


Abb. 2.10: Expression der Tribbles-Gene in Makrophagen und Adipozyten nach proinflammatorischer Stimulation. A: Die Knochenmarksmakrophagen wurden mit 100 ng/ml LPS für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert Die Tribbles-Genexpression wurde per qPCR analysiert Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=2). **B-G**: 3T3-L1 und primäre Fibroblasten wurden differenziert und mit 100 ng/ml LPS, CM oder M für 3 h, 6 h oder 24 h stimuliert. Die Tribbles-Genexpression wurde per qPCR analysiert. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). *p >0,05, **p < 0,01, One-way ANOVA, Bonferroni Multicomparison Post Test.

2.2.2.1 LPS hat nur einen geringen Effekt auf die TRB1-Expression

Um zu analysieren, ob der Effekt auf die TRB1-Expression durch LPS direkt hervorgerufen wurde, wurden primäre und 3T3-L1 Adipozyten mit 100 ng/ml LPS behandelt und die Expression von TRB1 per qPCR analysiert. LPS selbst hatte nur einen geringen Effekt auf die Expression von TRB1 (Abb. 2.10 (6 h-Werte) A: 2,24 ± 0,47, D: 1,6 ± 0,15), sodass die erhöhte Expression durch das CM nicht allein durch das Vorhandensein von LPS im Medium hervorgerufen wurde. Auch der Effekt auf die TRB1-Expression im Fettgewebe der mit LPS behandelten Mäuse scheint nicht

direkt durch LPS ausgelöst worden sein. Um den Effekt von LPS auszuschließen, wurden primäre Adipozyten aus TLR4-ko-Mäusen isoliert und analysiert.

2.2.2.2 Der Knockout von TLR4 hat keinen Effekt auf die TRB1-Expression

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Signaltransduktion von LPS über den TLR4 läuft [114]. Um den Einfluss des TLR4-Signalweges zu untersuchen, wurde die SVF aus den inguinalen Fettgeweben von TLR4-ko-Mäusen isoliert, differenziert und mit LPS, CM und M für 6 h stimuliert.

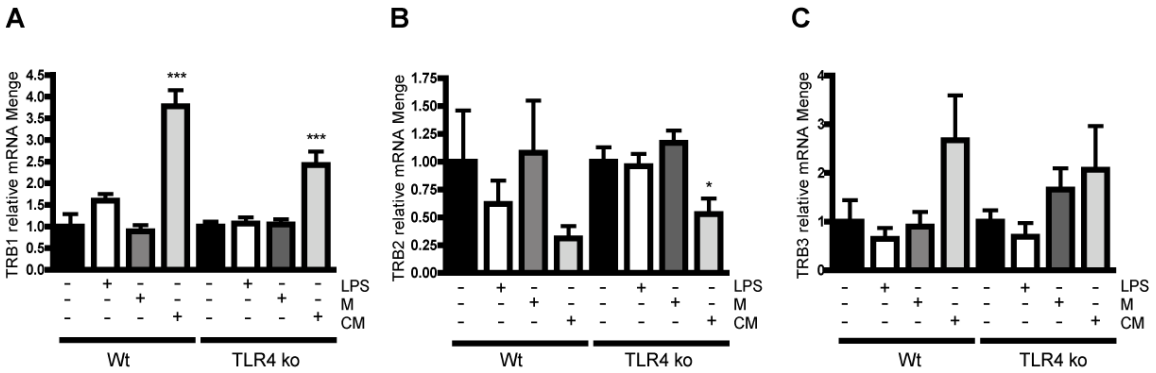


Abb. 2.11: Tribbles-Genexpression in primären Wt- und TLR4-ko-Adipozyten nach Stimulation mit LPS, M und CM. Primäre inguinale Wt- und TLR4-ko-Adipozyten wurden mit LPS, M und CM für 6 h stimuliert. Die Tribbles-Genexpression wurde per qPCR analysiert (**A**: TRB1, **B**: TRB2, **C**: TRB3). Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und sind Mittelwerte SEM, (n=3). *p >0,05, ***p < 0,001, One-way ANOVA, Bonferroni Multicomparison Post Test. Die unstimulierten Zellen dienten als Referenzwert (=1).

Das Fehlen des TLR4 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die erhöhte Expression von TRB1 durch CM (Abb. 2.11 A), denn LPS hatte durch das Fehlen des TLR4 keinen Effekt mehr auf die TRB1-Expression. Auch die Regulation der Expression von TRB3 wurde in den TLR4-ko-Zellen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 2.11 B, C). Die durch LPS induzierte Reduktion der TRB2-Expression konnte in den TLR4-ko-Zellen nicht mehr gemessen werden (Abb. 2.11 B).

So lässt sich ein Einfluss von LPS und dem TLR4-Signalweg auf die Expression von TRB1 ausschließen. Die Expression von TRB1 im Fettgewebe von Tieren mit einer systemischen Entzündungsreaktion wird daher durch andere Faktoren beeinflusst. LPS hat aber dennoch einen Einfluss auf die Expression von TRB2.

2.2.2.3 Erhitzen des CM führt zum Verlust der Induktion der TRB1-Expression

Um festzustellen, ob die Induktion der Expression durch das LPS konditionierte Makrophagenmedium von einem oder mehrerer Faktoren in diesem Medium ausgelöst wird, wurde das CM- und M-Medium für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und 3T3-L1 Adipozyten mit dem denaturierten wie dem nicht behandelten Medium für 3 h, 6 h und 24 h stimuliert.

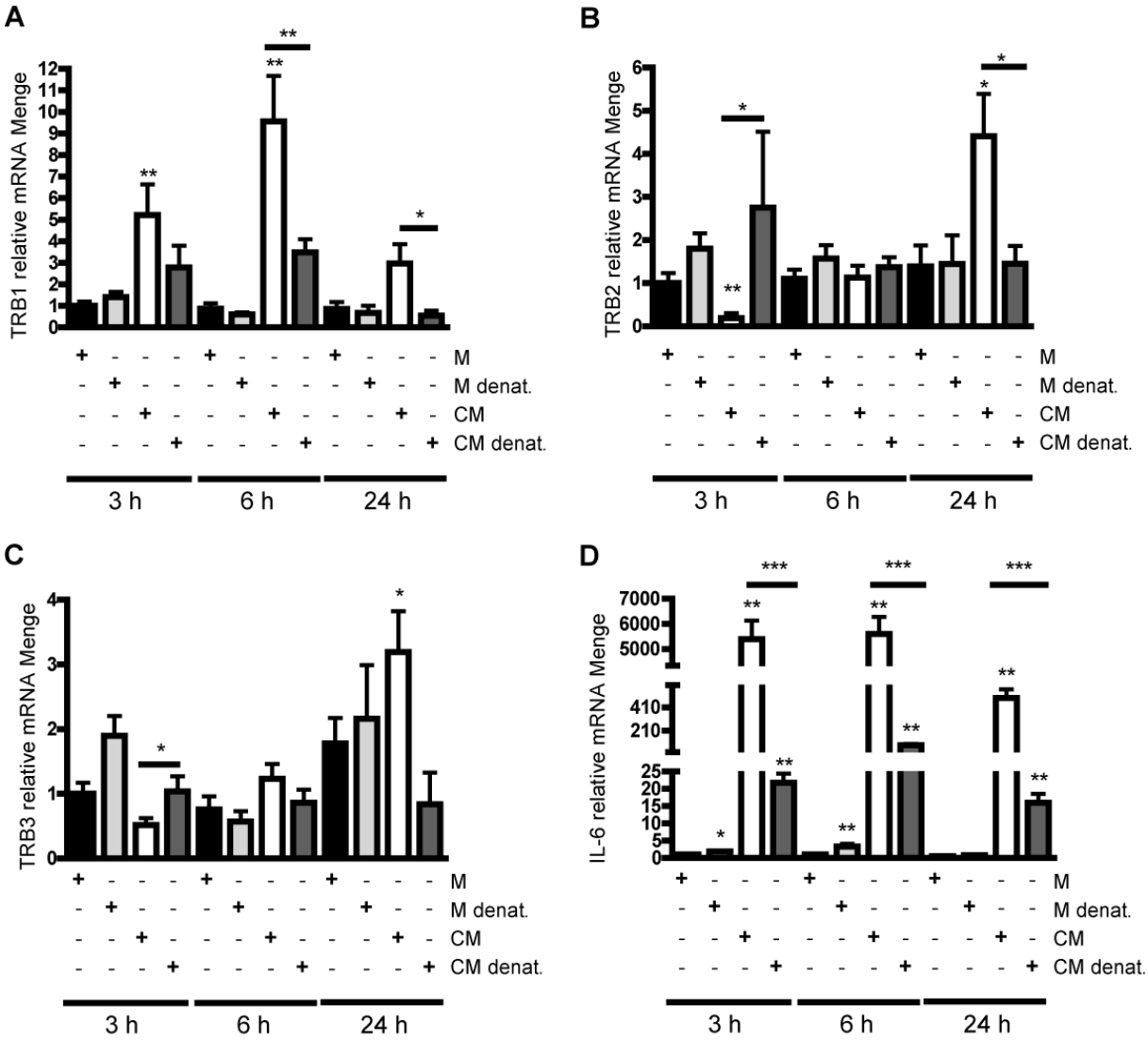


Abb. 2.12: TRB1-Expression in 3T3-L1 Zellen nach der Stimulation mit denaturiertem konditioniertem Medium. Das CM und M wurde für 5 min bei 95°C erhitzt und die Adipozyten damit und mit nicht denaturiertem CM und M für 3 h, 6 h und 24 h stimuliert. Die Tribbles-Genexpression (**A**: TRB1; **B**: TRB2, **C**: TRB3) und als Kontrolle für die inflammatorischen Wirkung des CM die IL-6-Genexpression (**D**) wurden per qPCR analysiert. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und sind Mittelwerte ± SEM (n=3). *p >0,05, **p< 0,01, ***p < 0,001, One-Way ANOVA, Bonferroni Multicomparison Post Test, Student's T-Test.

Die Stimulation der 3T3-L1 Zellen mit dem denaturierten konditionierten Medium führte zu einer signifikanten Reduktion der induzierten TRB1-Expression (Abb. 2.12 A). Die Reduktion der TRB2-Expression nach dreistündiger Stimulation wurde durch das denaturierte Medium aufgehoben und die Induktion nach 24 h war nicht mehr messbar (Abb. 2.12 B). Ein sehr ähnliches Bild ergab sich für die Expression von TRB3 (Abb. 2.12 C). Auch hier wurde die Reduktion der TRB3-Expression nach dreistündiger Stimulation aufgehoben und die Induktion nach 24 h reduziert. Als Kontrolle für die inflammatorische Wirkung wurde die Expression von Interleukin-6 (IL-6) analysiert (Abb. 2.12 D). Auch hier wurde das IL-6-Gen nach der Stimulation mit dem denaturierten CM im Vergleich zum nicht denaturierten CM reduziert exprimiert.

Die Expression von TRB1 wird daher durch einen oder mehrere hitzeinstabile/n, von Makrophagen sezernierte/n Faktor/en aktiviert.

2.2.2.4 Das LPS konditionierte Makrophagenmedium enthält einen Cocktail verschiedender Zytokine und Chemokine

Während einer Entzündungsreaktion sezernieren die aktivierten Makrophagen verschiedene proinflammatorische Zytokine und Chemokine um eine verstärkte Immunantwort auszulösen. Die RAW264.7 Makrophagen können durch LPS aktiviert werden und sezernieren daraufhin die Zytokine und Chemokine in das Kulturmedium. Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, welche Botenstoffe für die Induktion von TRB1 im Fettgewebe verantwortlich sein könnten, wurde das LPS konditionierte und das ohne LPS konditionierte Makrophagenmedium mit einem Milliplex ELISA auf verschiedene Zytokine und Chemokine IL-6, IL-1α, TNF-α, MCP-1, MIP-1α (Macrophage inflammatory protein 1 alpha), MIP-1β (Macrophage inflammatory protein 1 beta), MIP-2 (Macrophage inflammatory protein 2), LIF (Leukocyte inhibitory factor), IL-12(p40), IFN-γ (Interferon gamma) und IL-1β analysiert.

Die Analyse ergab, dass das LPS konditionierte Makrophagenmedium IL-6, IL-1α, TNF-α, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, LIF enthielt. IL-12(p40), IFN-γ und IL-1β konnten nicht nachgewiesen werden. Vor allem die Zytokine IL-6, IL-1α, TNF-α waren verstärkt im Vergleich zu dem nicht konditionierten Medium nachweisbar (Abb. 2.13). Ausgehend von dieser Analyse wurde die Wirkung einzelner Zytokine auf die TRB1-Expression in Adipozyten hin analysiert.

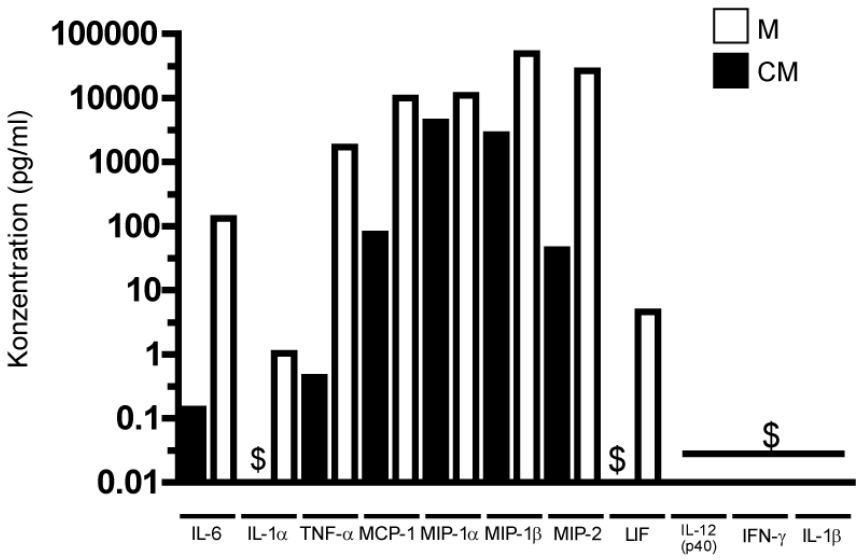


Abb. 2.13: Milliplex Analyse des CM und M. Das CM und M wurden auf die Menge an elf verschiedenen Zytokinen und Chemokinen (IL-6, IL-1α, TNF-α, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, LIF, IL-12(p40), IFN-γ, IL-1β) analysiert. $ =unterhalb der Nachweisgrenze.

2.2.2.5 TNF-α und IL-1β regulieren nicht alleine und nicht gemeinsam die TRB1-Expression

Der TNF-α ist ein Zytokin, dass für die Induktion von Insulinresistenz in Fettgewebe mitverantwortlich ist [115]. Auch IL-1β wird in diesem Zusammenhang diskutiert [116]. Um herauszufinden, ob diese zwei Zytokine für die Expression von TRB1 in den Fettzellen verantwortlich ist, wurde die SVF aus den inguinalen Fettgeweben der TNF-Rezeptor-1/Rezeptor-2- (TNFR1/R2) und TNF-Rezeptor-1/IL1-Rezeptor- (TNFR1/IL-1R) Doppelknockout-Mäusen isoliert, differenziert und mit CM und M für 6 h stimuliert. Desweiteren wurde der Einfluss von TNF-α, dass in Tieren nach LPS Injektion erhöht im Serum vorliegt, auf die TRB1-Expression im epididymalen Fettgewebe analysiert. Dafür wurden Wt- und TNFR1/R2-Doppelknockout-Mäuse mit 20 mg/kg Körpergewicht LPS für acht Stunden behandelt und die Expression per qPCR analysiert.

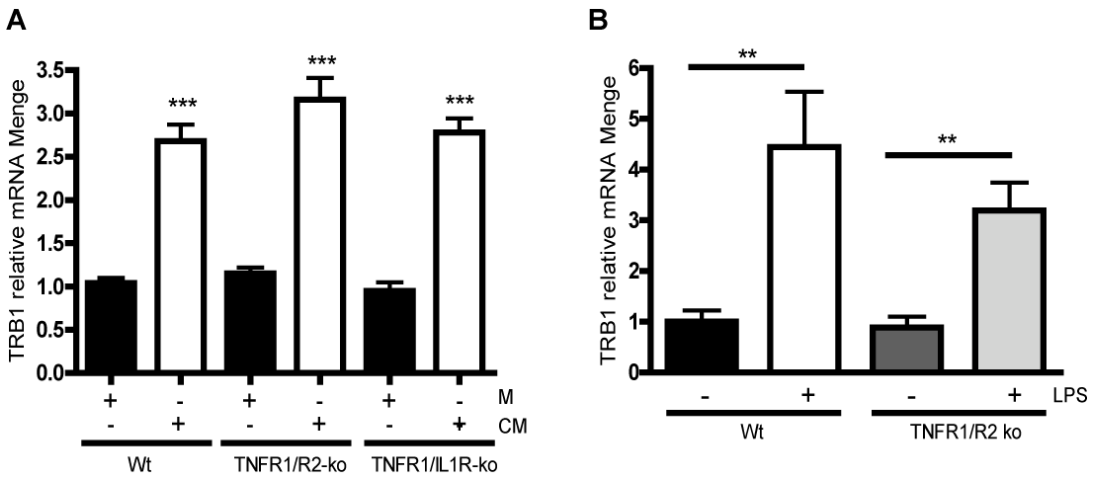


Abb. 2.14: TRB1-Expression nach Stimulation mit TNF-α und IL-1β in Adipozyten. A: Primäre Adipozyten aus TNFR-1/R2- und TNFR1/IL-1R- Doppelknockout-Mäusen wurden differenziert und mit CM und M für 6 h stimuliert .**B**: Die Expression von TRB1 in TNFR1/R2-Doppelknockout-Mäusen nach LPS Stimulation ist unabhängig von TNF-α. TNFR1/R2 Doppelknockout- und Wt-Mäuse wurden für 8 h mit LPS behandelt und die TRB1-Genexpression im Fettgewebe per qPCR analysiert. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und sind Mittelwerte ± SEM, (n=3-5). ** p< 0,01***p < 0,001, One Way ANOVA, Bonferroni Multicomparison Test.

TNF-α und IL-1β haben keinen Einfluss auf die Induktion der TRB1-Expression nach Stimulation mit CM (Abb. 2.14 A). Die Zellen ohne den TNF-Rezeptor 1 und 2 sowie ohne den TNF-Rezeptor 1 und Interleukin-1-Rezeptor reagieren noch immer mit einer signifikanten Steigerung der TRB1-Expression. Auch in den Tieren, die keinen TNFR1/R2 mehr haben verursacht die Injektion von LPS noch immer eine Steigerung der TRB1-Expression im Fettgewebe (Abb. 2.14 B). Die Induktion der TRB1-Expression in Fettzellen ist daher unabhängig von TNF-α und IL-1β und wird durch einen oder mehrere Faktoren im konditionierten Medium ausgelöst. Die Anzahl der für die Regulation der TRB1-Expression in Frage kommenden Faktoren ist groß und so wurde in den nächsten Versuchen die Signaltransduktionswege, die zur Induktion der TRB1-Genexpression in Adipozyten führt, analysiert.

2.3 Die TRB1-Expression wird über JNK und NF-κB reguliert

Die Expression von TRB1 wird durch eine Mischung verschiedener von Makrophagen sezernierten Zytokinen und Chemokinen reguliert (s. 2.2). TNF-α und IL-1β haben alleine oder in Kombination keinen Einfluss auf die TRB1-Expression. Um herauszufinden, welche Signaltransduktionswege die Expression von TRB1

beeinflussen, wurden verschiedene primäre Knockoutzellen und pharmakologische Inhibitoren verwendet.

2.3.1 JNK1 hat keinen Einfluss auf die TRB1-Expression

Die c-Jun NH_2-terminale Kinase (JNK) kann durch verschiedene Zytokine aktiviert werden. Für die Untersuchung, ob JNK1 an der Transkription von TRB1 beteiligt ist, wurden primäre SVF Zellen aus dem inguinalen Fettgewebe von JNK1-Knockout-Mäusen isoliert, differenziert und mit CM und M stimuliert. Die Expression von TRB1 wurde per qPCR analysiert. Zum Vergleich wurde die SVF aus Wt-Mäusen (C57BL/6J) isoliert, differenziert und entsprechend stimuliert.

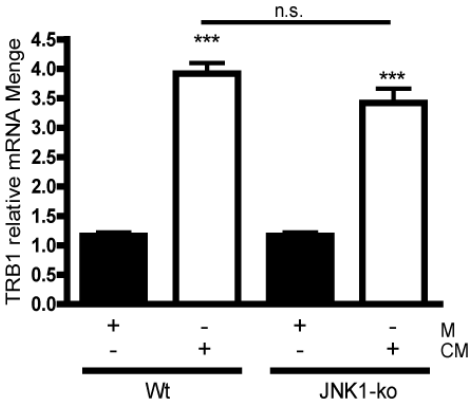


Abb. 2.15 Der Einfluss von JNK1 auf die TRB1-Expression. Die SVF Zellen wurden aus dem inguinalen Fettgewebe von JNK1-ko- und Wt-Mäusen isoliert, differenziert und stimuliert. Die Analyse der TRB1-Expression erfolgte über qPCR. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und mit dem Wt (M) = 1 in Relation gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). ***p < 0,001, One-Way ANOVA, Bonferroni Post Test, Student's, T-Test.

Die JNK1-ko-Zellen zeigten eine nicht signifikant leicht verringerte Expression von TRB1 unter inflammatorischen Bedingungen im Vergleich zu den Wildtypzellen (Abb. 2.15 A) (Wt CM: 3,92 ± 0,18 zu JNK1-ko CM: 3,42 ± 0,24). Die Expression von TRB1 in Adipozyten ist daher unabhängig von JNK1.

2.3.2 Die TRB1-Expression wird durch den JNK-Inhibitor SP600125 reduziert

Die JNK1-ko-Zellen zeigten keine veränderte Regulation der TRB1-Expression nach der Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen. JNK wird durch drei Gene kodiert und neben JNK1 gibt es noch zwei weitere JNK-Proteine (JNK2 und JNK3) sowie mehrere Spleißvarianten. Daher wurde der Inhibitor SP600125, der alle drei JNK-Proteine inhibiert, genutzt, um den Einfluss der anderen JNK-Proteine zu

untersuchen. Primäre Wt-Adipozyten wurden mit 50 µMol/l SP600125 für 30 min vorbehandelt und dann mit dem konditionierten Makrophagenmedium für 6 h stimuliert. Die TRB1-Expression wurde per qPCR analysiert. Auf die gleiche Weise wurden auch differenzierte 3T3-L1 Zellen behandelt und analysiert.

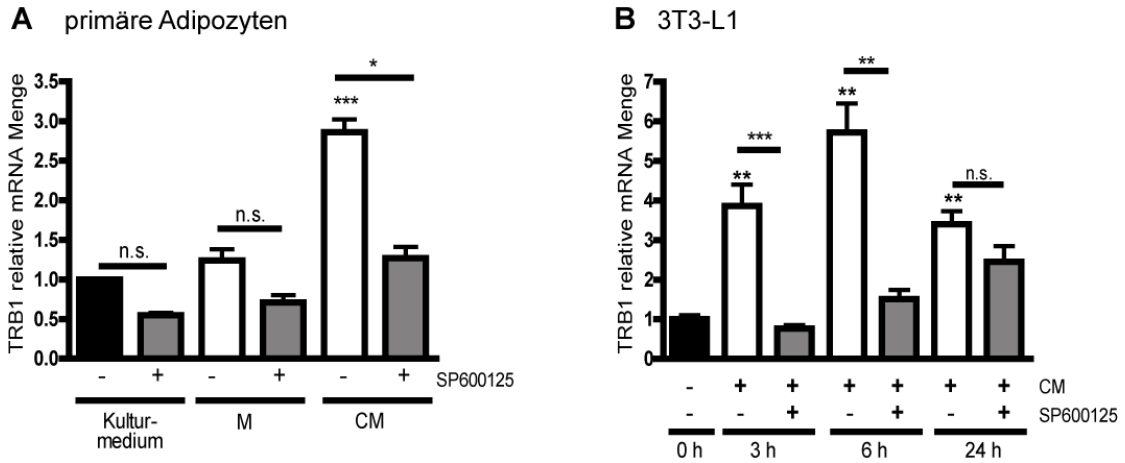


Abb. 2.16: Einfluss der Inhibition aller drei JNK-Proteine auf die Induktion der TRB1-Expression. Primäre (**A**) und 3T3-L1 (**B**) Adipozyten wurden mit 50 µMol/l SP600125 JNK-Inhibitor 30 min vorbehandelt und danach für 6 h (**A**) oder 3 h, 6 h 24 h (**B**) mit CM, M und Kulturmedium ± Inhibitor (A) oder nur mit CM ± Inhibitor (B) stimuliert. Die Expressionsanalyse erfolgte per qPCR. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). *p< 0,05, **p< 0,01, ***p < 0,001, One-Way ANOVA, Bonferroni Post Test, Student's T-Test.

Die pharmakologische Inhibition aller drei JNK-Proteine führte zu einer signifikanten Reduktion der TRB1-Expression nach der Stimulation mit dem konditionierten Makrophagenmedium in primären Adipozyten (Abb. 2.16 A, CM 2,86 ± 0,16 zu CM + SP600125 1,27 ± 0,14), sowie in 3T3-L1 Adipozyten (Abb. 2.16 B, 6 h: CM 5,73 ± 0,72 zu CM + SP600125 1,51 ± 0,23). So hat die Aktivierung des JNK-Signalweges einen positiven Einfluss auf die Expression von TRB1 in Adipozyten. Welches der JNK-Proteine und welche Spleißvariante daran beteiligt ist, lässt sich daraus zwar nicht ableiten, ausschließen lässt sich aber ein Einfluss von JNK1.

2.3.3 p50-ko Zellen zeigen eine verringerte Induktion von TRB1 nach Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium

Viele proinflammatorische Signalwege laufen über die Aktivierung von NF-κB und steuern so die Genexpression weiterer proinflammatorischer Gene. Der p50/p65 NF-κB Komplex ist einer der Transkriptionsfaktoren, die durch Zytokine aktiviert werden. Um zu untersuchen, ob dieser Komplex an der Transkription von TRB1 beteiligt ist, wurden die SVF aus inguinalem Fettgewebe von p50-ko-Mäusen isoliert, differenziert

und mit LPS-konditioniertem Makrophagenmedium für 6 h stimuliert. Zellen, denen das p50-Protein fehlt, zeigten eine signifikant verringerte Expression von TRB1 nach der Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium im Vergleich zu den Wildtypzellen (Abb. 2.17, Wt CM: 2,59 ± 0,17 zu p50-ko CM: 2,1 ± 0,08), was auf einen Einfluss von p50 auf die Genexpression von TRB1 hindeutete.

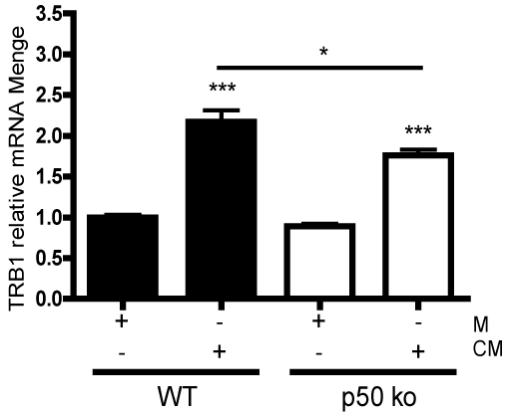


Abb. 2.17: Einfluss von p50 auf die Induktion der TRB1-Expression nach Stimulation mit CM. Die SVF-Zellen wurden aus dem inguinalen Fettgewebe von p50ko- und Wt-Mäusen isoliert, differenziert und stimuliert. Die Analyse der TRB1-Expression erfolgte über qPCR. Die Werte wurden gegen TBP normalisiert und mit dem Wt (M) =1 in Relation gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). *p<0,05, ***p < 0,001, One-Way ANOVA, Bonferroni Post Test., Student's T-Test.

2.3.4 Der NF-κB-Inhibitor Parthenolide inhibiert die Expression von TRB1 nach der Stimulation mit konditioniertem Makrophagenmedium

Die p50-ko-Zellen reagierten mit einer verringerten Expression von TRB1 auf die Stimulation mit CM. Da ein p65-Knockout letal ist, wurde der aus dem Fiebergras gewonnene NF-κB-Inhibitor Parthenolide für die weitere Analyse des Einflusses von NF-κB auf die TRB1-Expression verwendet [117, 118]. Primäre und 3T3-L1 Adipozyten wurden 30 min mit dem Inhibitor (50 µMol/l) vorbehandelt und anschließend mit dem konditionierten Makrophagenmedium stimuliert. Die Analyse der TRB1-Expression erfolgte durch qPCR.

Die Induktion der TRB1-Expression durch CM wurde durch die Inhibition von NF-κB signifikant blockiert. In primären Adipozyten wurde die Induktion (CM: 2,86 ± 0,16) fast vollständig gehemmt (CM + Parthenolide: 1,28 ± 0,13) (Abb. 2.18 A). Auch in 3T3-L1 Adipozyten wurde die Induktion der TRB1-Expression durch Parthenolide blockiert (6h CM: 9,65 ± 2,24 zu CM + Parthenolide: 1,36 ± 0,33) (Abb. 2.18 B). Die

Expression von TRB1 wurde daher durch die Aktivierung des NF-κB-Transkriptionsfaktors durch von Makrophagen sezernierten Faktoren reguliert.

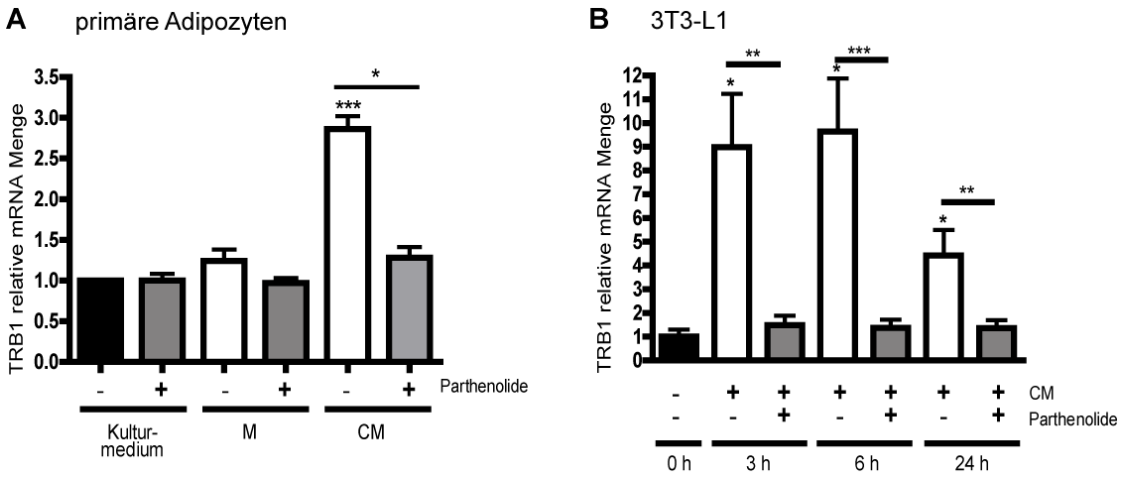


Abb. 2.18: Einfluss der Inhibition von NF-κB auf die Induktion von TRB1 nach Stimulation mit CM. Primäre (**A**) und 3T3-L1 (**B**) Adipozyten wurden mit 50 µMol/l Parthenolide 30 min vorbehandelt und danach für 6 h (**A**) oder 3 h, 6 h oder 24 h (**B**) mit CM, M und Kulturmedium ± Inhibitor (**A**) oder nur mit CM ± Inhibitor (**B**) stimuliert. Die Expressionsanalyse erfolgte per qPCR. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). *p< 0,05, **p< 0,01, ***p < 0,001, One-Way ANOVA, Bonferroni Post Test, Student's T-Test.

2.3.5 Die Inhibition von p38, Erk, PI-3K und PKA haben keinen signifikanten Einfluss auf die TRB1-Expression

Neben JNK und NF-κB gibt es noch weitere Signaltransduktionselemente, die durch Zytokine aktiviert werden können. Unter diesen spielen die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 und Erk eine wichtige Rolle. Auch die Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (PI-3K) und die Proteinkinase A (PKA) sind wichtige Schlüsselenzyme. Für die Analyse ihrer Funktion in der Regulation von TRB1 wurden sie in 3T3-L1 Adipozyten mit spezifischen Inhibitoren 30 min blockiert und die Zellen danach mit CM stimuliert. Für die PI-3K wurde der Inhibitor Ly294002 (10 µMol/l), für die PKA H89 (10 µMol/l), für p38 SB202198 (10 µMol/l) und für Erk PD98059 (20 µMol/l) verwendet.

Wie zuvor gezeigt (Abb. 2.10), wurde auch hier TRB1 durch das konditionierte Makrophagenmedium signifikant verstärkt exprimiert. Dagegen hatte die Inhibition der PI-3K (Abb. 2.19 A), von p38 (Abb. 2.19 B) und von Erk (Abb. 2.19 C) keine signifikante Auswirkung auf die TRB1-Expression. Allein die Inhibition der PKA führt

zu einer signifikanten Verstärkung der Expression nach dreistündiger Stimulation (CM 2,64 ± 0,31 zu CM + H89 4,37 ± 0,53), die aber nach 6 h nicht mehr zu messen war.

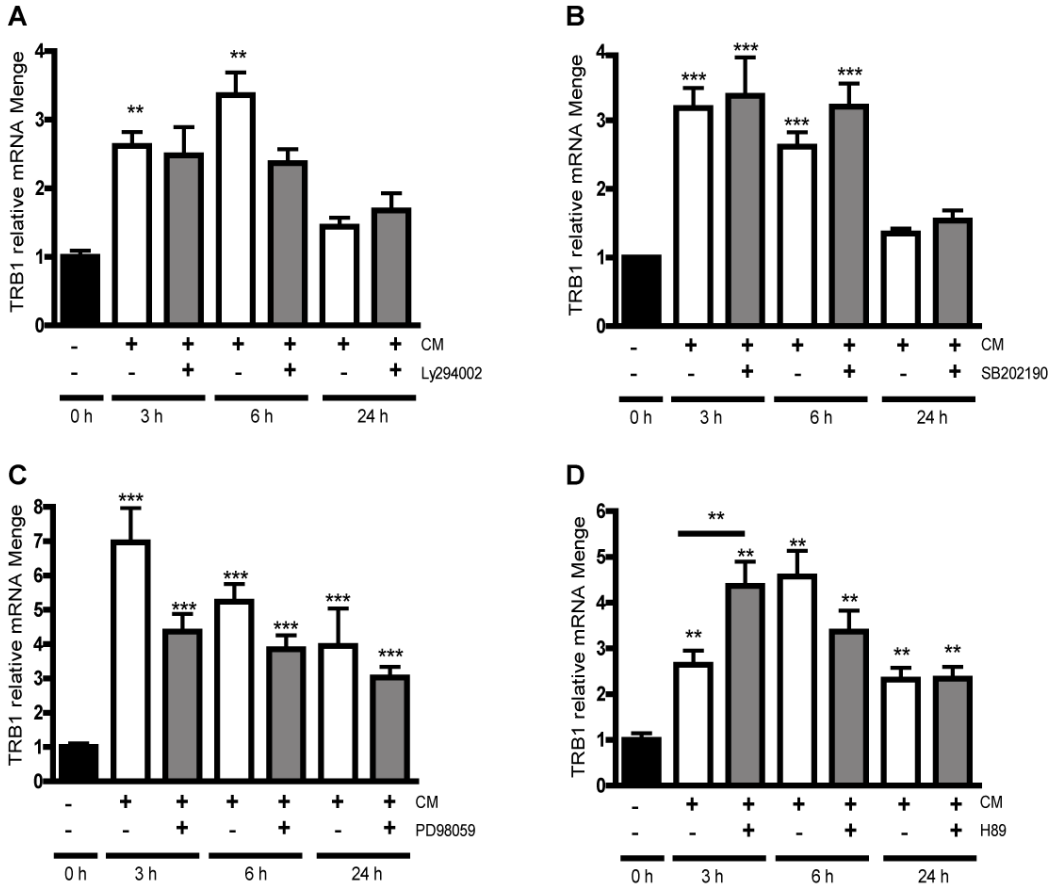


Abb. 2.19: Einfluss der PI-3K (A), p38 (B), Erk (C) und PKA (D) auf die Expression von TRB1. 3T3-L1 Adipozyten wurden mit den jeweiligen Inhibitoren 30 min vorinkubiert und für den angegebenen Zeitraum mit CM stimuliert. Die Expressionsanalyse erfolgte per qPCR. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). **p< 0,01, ***p < 0,001, One-Way ANOVA, Bonferroni Post Test.

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass die Expression von TRB1 durch von Makrophagen sezernierte Faktoren induziert wird, unabhängig von LPS und dem TLR4. Desweiteren konnte ein Einfluss von TNF-α und IL-1β ausgeschlossen werden. Die Induktion der Expression verlief über den JNK-Signalweg und war abhängig von der Aktivierung des NF-κB Transkriptionsfaktors.

2.4 Die Expression von TRB1 lässt sich durch eine lentiviral vermittelte MikroRNA nicht herunterregulieren

2.4.1 TRB1 spezifische MikroRNAs (miRNAs) reduzieren die Expression von TRB1 im Luziferasereporter–Assay und auf der Proteinebene

Das Einbringen von MikroRNAs in Gewebe oder Zellen ist eine Möglichkeit, die Expression eines Zielgens unter zu Hilfenahme der zellulären RNAi-Maschinerie spezifisch zu inhibieren. Bei dem hier verwendeten System Block-iT™ PolII miR RNAi Expression Vector Kit, Invitrogen, wird ein miRNA-Oligo hinter einen PolII-Promotor in den Vektor pcDNA™6.2GW/EmGFP kloniert. Dieser Vektor exprimiert in der Zielzelle zusätzlich zur miRNA auch noch GFP. Der Vorteil, der durch eine PolII Promotor gesteuerten Expression der miRNA ist, dass sich der Promotor gegen einen gewebsspezifischen austauschen lässt und so die miRNA nur im Zielgewebe exprimiert werden kann. So kann *in vivo* ein Nebeneffekt in anderen Zellen wie z.B. Immunzellen ausgeschlossen werden.

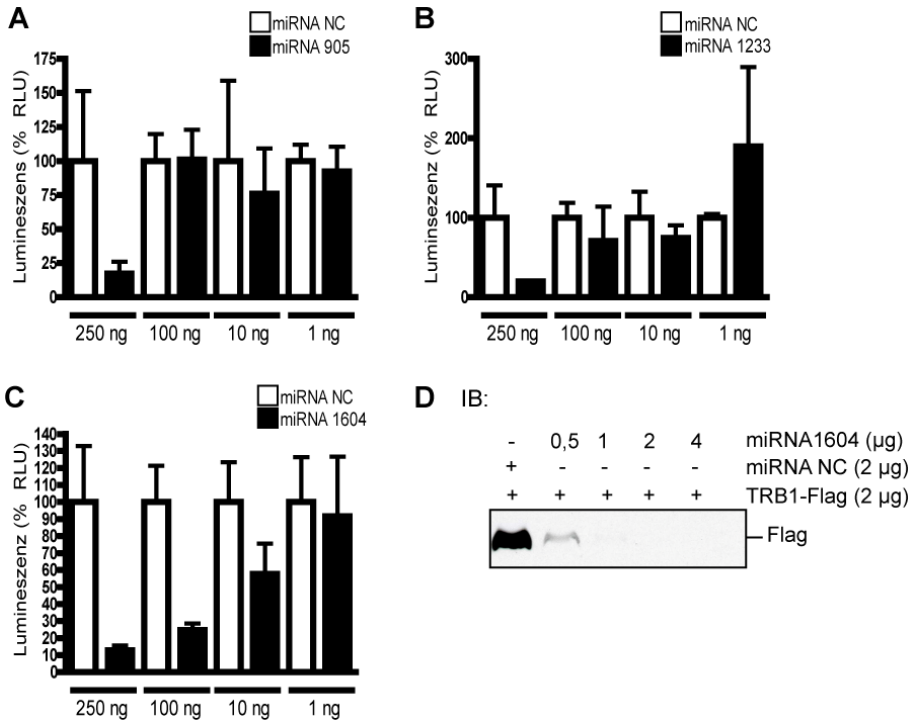


Abb. 2.20: Analyse der miRNAs. A-C: Die pcDNA6.1GW/EmGFP-miRNA Vektoren wurden zusammen mit dem pTarget-TRB1-Plasmid in HEK 293 Zellen koexprimiert. Die Knockdowneffizienz wurde über die Luziferaseaktivität ermittelt. **D**: Das pcDNA3-TRB1-Flag-Plasmid und der die miRNA1604 exprimierende pcDNA6.1GW/EmGFP-Vektor wurden in HEK 293 Zellen koexprimiert, die Zellen nach 48 h lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das TRB1-Flag-Protein wurde per Immunoblot (IB) gegen Flag detektiert.

Für den miRNA vermittelten Knockdown von TRB1 wurden drei miRNA-Oligos in den pcDNA™6.2GW/EmGFP-Vektor kloniert und die Effizienz des Knockdowns im GeneErase™ Luciferase Supression System (Stratagene) getestet. In diesem System wird die Zielsequenz der shRNA (hier der offene Leserahmen (ORF) von TRB1) vor ein Luziferasereportergen kloniert. Die Knocknown-Effizienz der shRNA gegenüber der nichtspezifischen shRNA lässt sich dann durch die Menge an exprimierter Luziferase messen. Desweiteren wurde die Knockdownkapazität durch die Koexpression von TRB1-Flag und der miRNA per Immunoblot gegen Flag getestet. Die miRNA1604 zeigte im Luziferaseassay die beste Knockdowneffizienz (Abb. 2.20 C, D) und eine dosisabhängige Wirkung auf die TRB1-Expression. Diese miRNA wurde für die Herstellung von miRNA-exprimierenden Lentiviren verwendet (2.4.2).

2.4.2 Herstellung von miRNA-exprimierenden Lentiviren

Lentiviren nutzen die zelluläre Maschinerie, um ihre Erbinformation auf der viralen RNA nach dem Eintritt in die Zelle in DNA umzuschreiben. Diese DNA wird in das Genom der Wirtszelle integriert und infizierte Zellen exprimieren die viralen Gene. Dieser Vorgang wird genutzt um Zelllinien herzustellen, die eine miRNA spezifischer Sequenz in ihrem Genom tragen und exprimieren. Für die Herstellung der Lentiviren wurde das Block-iT™ Lentiviral PolII miR RNAi Expression System, Invitrogen, verwendet.

Der pcDNA™6.2GW/EmGFP-miRNA1604-Vektor wurde mit einem pDONR221-Vektor durch eine BP-Reaktion rekombiniert. Der entstandene Vektor wurde daraufhin über eine LR-Reaktion mit dem pLenti6/V5-DEST-Vektor rekombiniert. Dem so entstandenen pLenti6/V5-miR1604-Vektor fehlen aus Sicherheitsgründen mehrere Gene für die Replikation. Für die Virusproduktion wurde daher der pLenti6/V5-miR1604-Vektor mit den weiteren Verpackungsvektoren (ViraPowerMix, Invitrogen), oder den Plasmiden pMD2.G, pRSV_rev, pMDLg_pRRE (AG G. Schütz, DKFZ) in 293FT bzw. 293T Zellen transfiziert. Die Zellen gaben die Viruspartikel in das Medium ab. Das virusenthaltende Medium konnte direkt für die Infektion der 3T3-L1 Fibroblasten genutzt werden, indem sie zusammen mit 6 µg/ml Polybrene und dem virusenthaltenden Überstand für 24 h inkubiert wurden.

2.4.3 Durch lentiviral vermittelte miRNA lässt sich kein stabiler Knockdown von TRB1 erzielen

Die mit dem lentivirusenthaltenden Medium transduzierten 3T3-L1 Fibroblasten wurden mit Blasticidin selektiert, die resistenten Klone vereinzelt und über zwei Wochen in Selektionsmedium herangezogen. Die stabilen Zellen wurden differenziert und die Expression von TRB1 wurde per qPCR ermittelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit Lentiviren infiziert, die eine nichtspezifische miRNA exprimieren. Einige der stabilen Zelllinien zeigten im Vergleich zu der nicht mit Virus behandelten Kontrolle einen Knockdown von TRB1 (Abb. 2.21 B). Allerdings ließ sich eine stark verringerte Expression von TRB1 auch in den stabilen Zellen der Negativkontrolle messen (Abb. 2.21 A). Die meisten Klone, die mit der TRB1 spezifischen miRNA transduziert wurden, ließen sich in Adipozyten differenzieren und der Fettgehalt mit einer Öl-Rot-O-Färbung nachweisen (Abb. 2.21 C). Wohingegen die Zellen, die mit der unspezifischen miRNA transduziert wurden, ihre Differenzierungskapazität verloren hatten. Daher ließ sich aus diesen Ergebnissen keine eindeutige Wirkung von TRB1 auf die Differenzierung von Adipozyten ableiten. Die mit der miR1604 über Lentiviren stabil transduzierten Zellen wurden für weitere Analysen nicht verwendet. Um dennoch die Funktion von TRB1 in Adipozyten zu analysieren wurden Adenoviren, die eine TRB1 spezifische shRNA exprimieren, hergestellt und der Einfluss des transienten Knockdowns von TRB1 auf die Genexpression von Adipozyten untersucht.

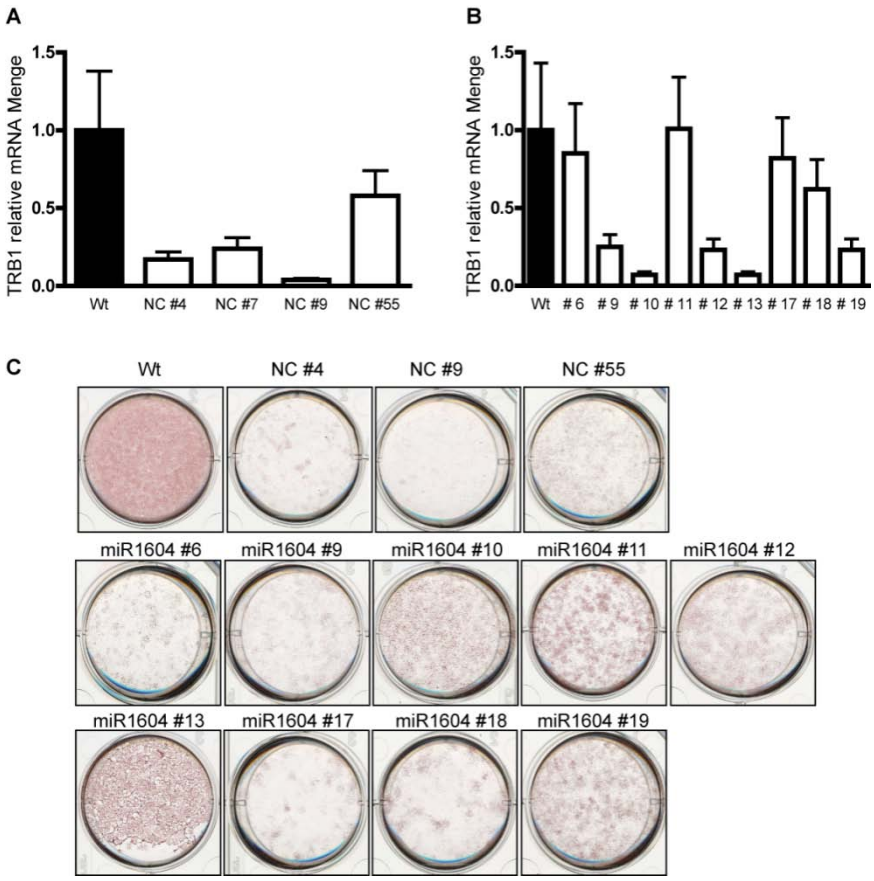


Abb. 2.21: Herstellung miRNA1604 stabil exprimierender 3T3-L1 Zellen. A: Expressionsanalyse von TRB1 in den differenzierten stabilen Klonen. Blasticidinselektierte Zellklone wurden zu Adipozyten differenziert, die RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und die Expression von TRB1 per qPCR ermittelt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM, normalisiert gegen TBP und in Relation gesetzt zu Wt, (n=2) **B**: Öl-Rot-O-Färbung der selektierten differenzierten Klone und der nicht mit Virus transduzierten Wt-Zellen.

2.5 Die shRNA vermittelte Inhibition der TRB1-Expression führt zu einer veränderten Genexpression von Zytokinen

2.5.1 Adenoviral vermittelter Knockdown von TRB1

Für die funktionelle Analyse von TRB1 in Adipozyten wurden Adenoviren hergestellt, die entweder eine TRB1 spezifische shRNA, oder eine nicht spezifische short hairpin RNA (shRNA) exprimierten. Dafür wurden drei verschiedene shRNA Sequenzen mit Hilfe der Block IT™ RNAi Designer Software (Invitrogen) ermittelt und in pENT/U6-Vektoren kloniert (BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit, Invitrogen). Der Vektor enthält eine shRNA-Kassette, die hinter einem U6-Promotor liegt und am 5‘ Ende eine PolIII Terminationsstelle enthält. Die Kassette wird von zwei Rekombinationsstellen umgeben. Die Transkription des shRNA kodierenden

Oligonukleotids in der Zielzelle führt zu einer „Stem-Loop“ Struktur, die von der RNAi-Maschinerie prozessiert wird und durch die Entfernung des Loops ihre Funktion ausüben kann.

Die shRNAs wurden auf ihre Knockdown-Effizienz im GeneErase™ Luciferase Suppression System (Stratagene) getestet und auch auf Proteinebene mit überexprimiertem Flag-markiertem TRB1 per Immunoblot gegen Flag getestet. Die shRNA mit der höchsten Knockdown-Kapazität wurde über eine LR-Reaktion in den pAd-Block-IT™DEST-Vektor (Block-iT™ Adenoviral RNAi Expression System, Invitrogen) rekombiniert. Dieser Vektor kodiert für das humane Adenovirus Serotyp 5. Dem Vektor fehlen die zwei viralen Gene E2 und E3, daher kann sich das Virus per se nicht in eukaryotischen Zellen replizieren. Für die Virusproduktion wurde der rekombinierte pAd-Vektor in HEK 293A Zellen mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Diese Zellen tragen stabil in ihrem Genom integriert die zwei fehlenden viralen Gene. Die Expression des viralen Vektors und der zwei Gene *in trans* führt zur Synthese vollständiger Viruspartikel. Die Produktion und Aufreinigung erfolgte über zwei Cäsiumchloridgradienten und anschließender Dialyse gegen PBS/Glyzerin. Der Virustiter wurde über die Bestimmung des $TCID_{50}$ im Plaqueassay bestimmt.

2.5.1.1 Die Expression von TRB1 lässt sich durch eine shRNA inhibieren

Die drei verschiedenen TRB1 spezifischen shRNAs zeigten alle eine dosisabhängige Wirkung auf die Expression des Luziferasereporters (Abb. 2.22 A-C). Um sicherzugehen, dass auch das TRB1-Protein durch die Expression der shRNA nicht mehr vorhanden ist, wurden HEK 293 Zellen mit jeweils 1 µg pcDNA3-TRB1-Flag und je 1 µg des pENTR/U6-shRNA mit der Kalziumphosphatmethode transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in modifiziertem RIPA-Puffer lysiert und 20 µg Proteinlysat über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Flag-spezifischen Antikörper immunodetektiert. Als Ladekontrolle wurde VCP detektiert (Abb. 2.22 D).

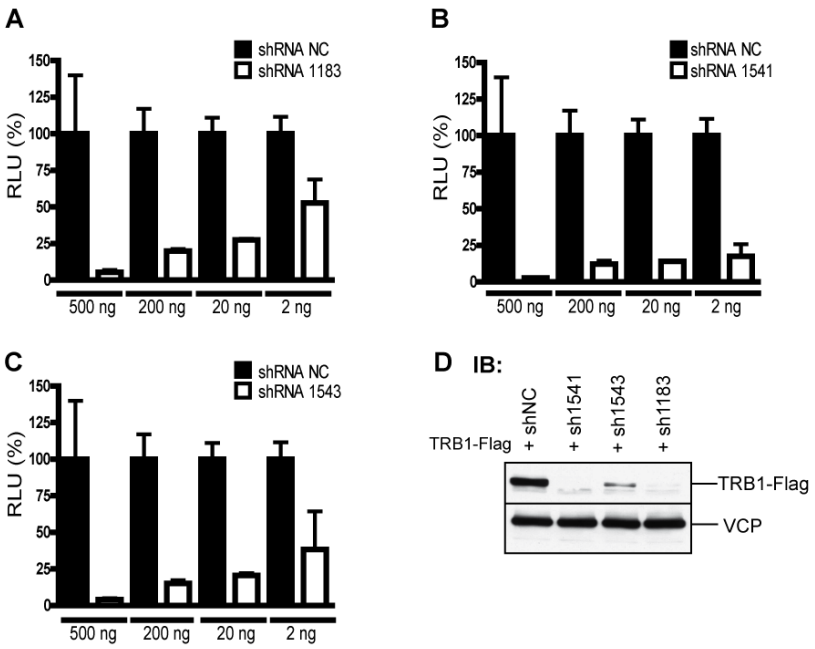


Abb. 2.22: Analyse des Einflusses der shRNA auf die TRB1 Expression. HEK 293 Zellen wurden mit 200 ng/µl pTarget-Luc-TRB1, 200 ng/µl pENTR/U6-NC, und jeweils den pENTR/U6-shRNAs transfiziert. Die Luziferaseexpression wurde 48 h nach der Transfektion gemessen **(A-C)**. **D:** Immunoblot (IB) gegen TRB1-Flag + shRNAs**.** HEK 293 Zellen wurden jeweils mit 1 µg pcDNA3-TRB1-Flag und je 1 µg der pENTR/U6 shRNAs transfiziert. 20 µg Protein wurden jeweils über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt und die Expression von TRB1-Flag mit einem α-Flag Antikörper im Immunoblot detektiert. Als Ladekontrolle diente VCP.

Unter den gewählten Bedingungen führten alle drei shRNAs zu einer verminderten TRB1-Flag Proteinmenge. Durch die Koexpression der shRNA1541 war kein TRB1-Flag-Protein mehr detektierbar. Bei der Koexpression der shRNA1543 und shRNA1183 war jeweils noch TRB1-Flag-Protein nachweisbar. Die shRNA1541 zeigte in beiden Versuchsansätzen die beste Wirkung, sodass diese für die Herstellung eines shRNA exprimierenden Adenovirus (shTRB1) verwendet wurde.

2.5.1.2 Die Expression von TRB1 in Adipozyten wird durch die Adenovirus vermittelte Expression einer spezifischen shRNA verringert

Nach der Virusherstellung wurden 3T3-L1 und primäre Adipozyten mit einer MOI (Multiplicity of infection) von 1000 infiziert und die Knockdowneffizienz und Spezifität per qPCR gegen TRB1, TRB2 und TRB3 nach 48 h analysiert. Die Effizienz der shRNA-TRB1 die TRB1-Expression zu inhibieren, war in primären Adipozyten besser als in 3T3-L1 Zellen (0,28 ± 0,02 zu 0,64 ± 0,06). In beiden Zelltypen wurde die

Expression von TRB2 und TRB3 nicht signifikant beeinflusst (Abb. 2.23 A, B). Der Knockdown von TRB1 konnte auch per Immunoblot gegen das endogene TRB1-Protein in 3T3-L1 Adipozyten nachgewiesen werden (Abb. 2.23.C).

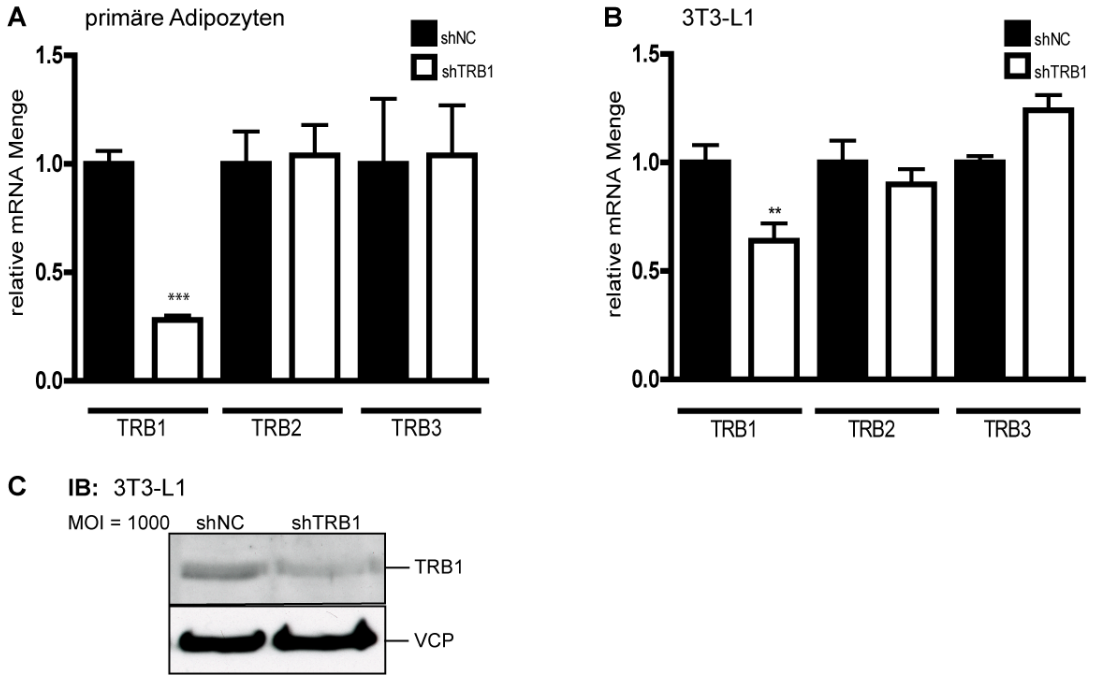
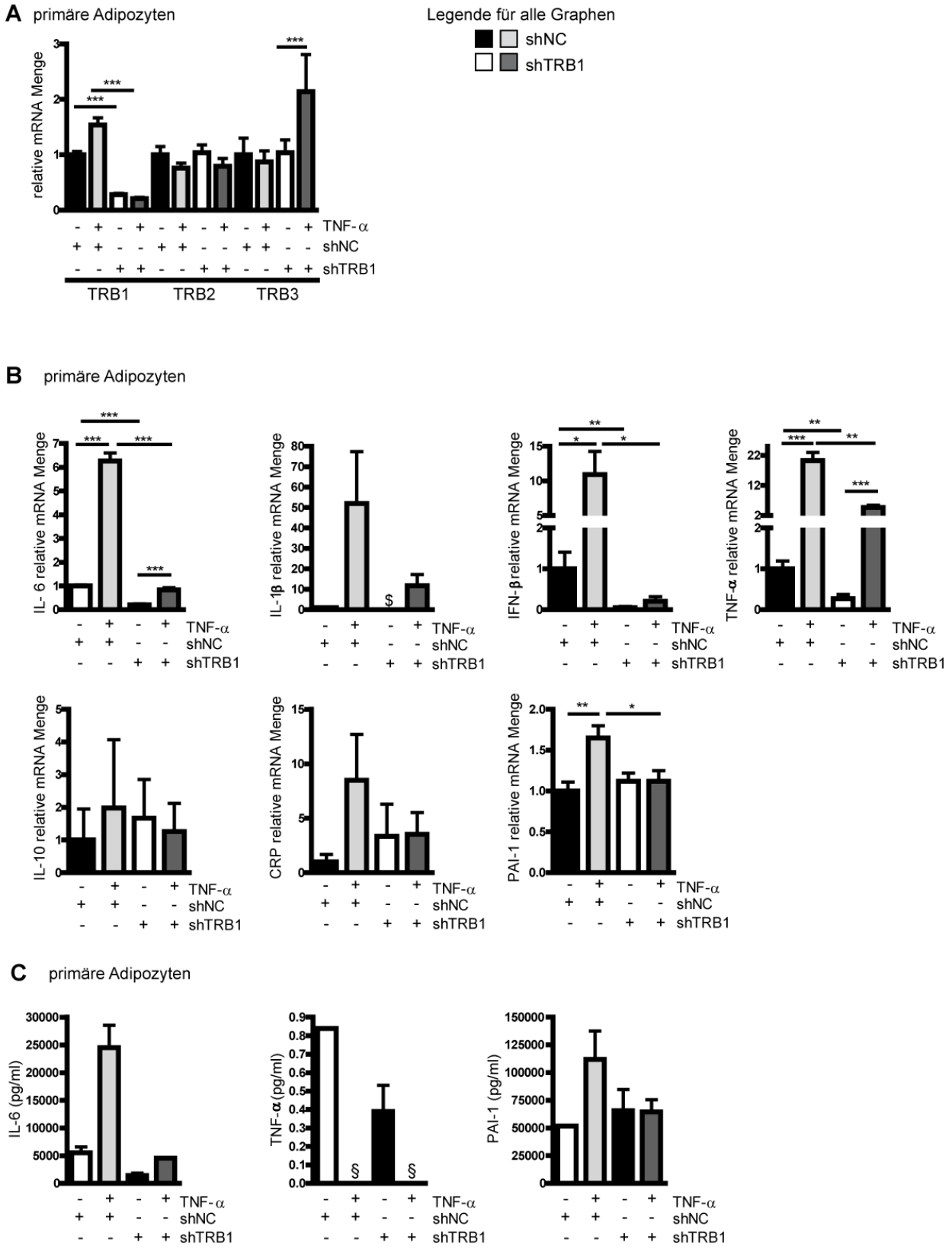


Abb. 2.23: Analyse des durch shRNA exprimierende Adenoviren vermittelten Knockdowns auf die TRB1-Expression in Adipozyten. Primäre differenzierte Adipozyten (**A**) und differenzierte 3T3-L1 Zellen (**B**) wurden mit dem shRNA exprimierenden Adenovirus mit einer MOI von 1000 transduziert. Die Effizienz des shRNA vermittelten Knockdowns von TRB1 wurde per qPCR bestimmt. Zur Spezifitätskontrolle der shRNA wurde die Expression der zwei homologen Gene TRB2 und TRB3 bestimmt. Die Expressionsanalyse erfolgte per qPCR. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). **p< 0,01, ***p < 0,001, Student's T-Test. **C: Immunodetektion des TRB1-Proteins in 3T3-L1 Adipozyten.** 3T3-L1 Adipozyten wurden mit dem shRNA exprimierenden Adenovirus mit einer MOI von 1000 transduziert und in 2x-SDS-Ureapuffer lysiert. 25 µg Protein wurden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt und das endogene TRB1-Protein per Immunoblot detektiert. Als Ladekontrolle diente VCP.

2.5.1.3 Der Knockdown von TRB1 führt zu einer veränderten Expression proinflammatorischer Gene

Die Expression von Zytokinen wurde in den mit dem shRNA-TRB1 exprimierenden Adenovirus transduzierten Adipozyten analysiert, wobei die Zellen zusätzlich mit 1,5 ng/ml TNF-α für 6 h stimuliert wurden, um den Einfluss von TRB1 auch unter proinflammatorischen Bedingungen zu untersuchen. TNF-α selbst hatte keinen Einfluss auf die TRB1-Expression in primären Adipozyten (Abb. 2.24 A). In 3T3-L1 Adipozyten führte die Stimulation mit TNF-α dagegen zu einer erhöhten TRB1 -

Expression (Abb. 2.24 D). Die durch die shRNA vermittelte verminderte Expression von TRB1 führte basal sowie nach der Stimulation mit TNF-α zu einer signifikant verringerten Expression von Zytokinen (IL-6, IL-1β, IFN-β, TNF-α) in primären sowie in 3T3-L1 Adipozyten (Abb. 2.24 B, D). Die verringerte Expression zeigte sich auch in der Menge der Zytokine, die in das Kulturmedium abgegeben wurden. Die mit einem Milliplex ELISA (Millipore) ermittelten Mengen von IL-6 und TNF-α sind in den shRNA behandelten Zellen basal sowie nach TNF-α-Stimulation (nur IL-6) geringer, wohingegen die Mengen an PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor 1) sich nicht veränderten (Abb. 2.24 C, F). TRB1 hatte also basal sowie unter inflammatorischen Bedingungen einen Einfluss auf die Expression von Zytokingenen und die Reduktion der mRNA-Menge spiegelte sich auch in der Proteinmenge dieser Zytokine wieder. Generell war der Effekt des TRB1-Knockdowns in den primären Zellen besser und auch der Einfluss auf die Expression anderer Gene deutlicher.


A primäre Adipozyten
Legende für alle Graphen
shNC
shTRB1
relative mRNA Menge
TNF-α
shNC
shTRB1
TRB1
TRB2
TRB3
B primäre Adipozyten
IL- 6 relative mRNA Menge
IL-1β relative mRNA Menge
IFN-β relative mRNA Menge
TNF-α relative mRNA Menge
IL-10 relative mRNA Menge
CRP relative mRNA Menge
PAI-1 relative mRNA Menge
C primäre Adipozyten
IL-6 (pg/ml)
TNF-α (pg/ml)
PAI-1 (pg/ml)

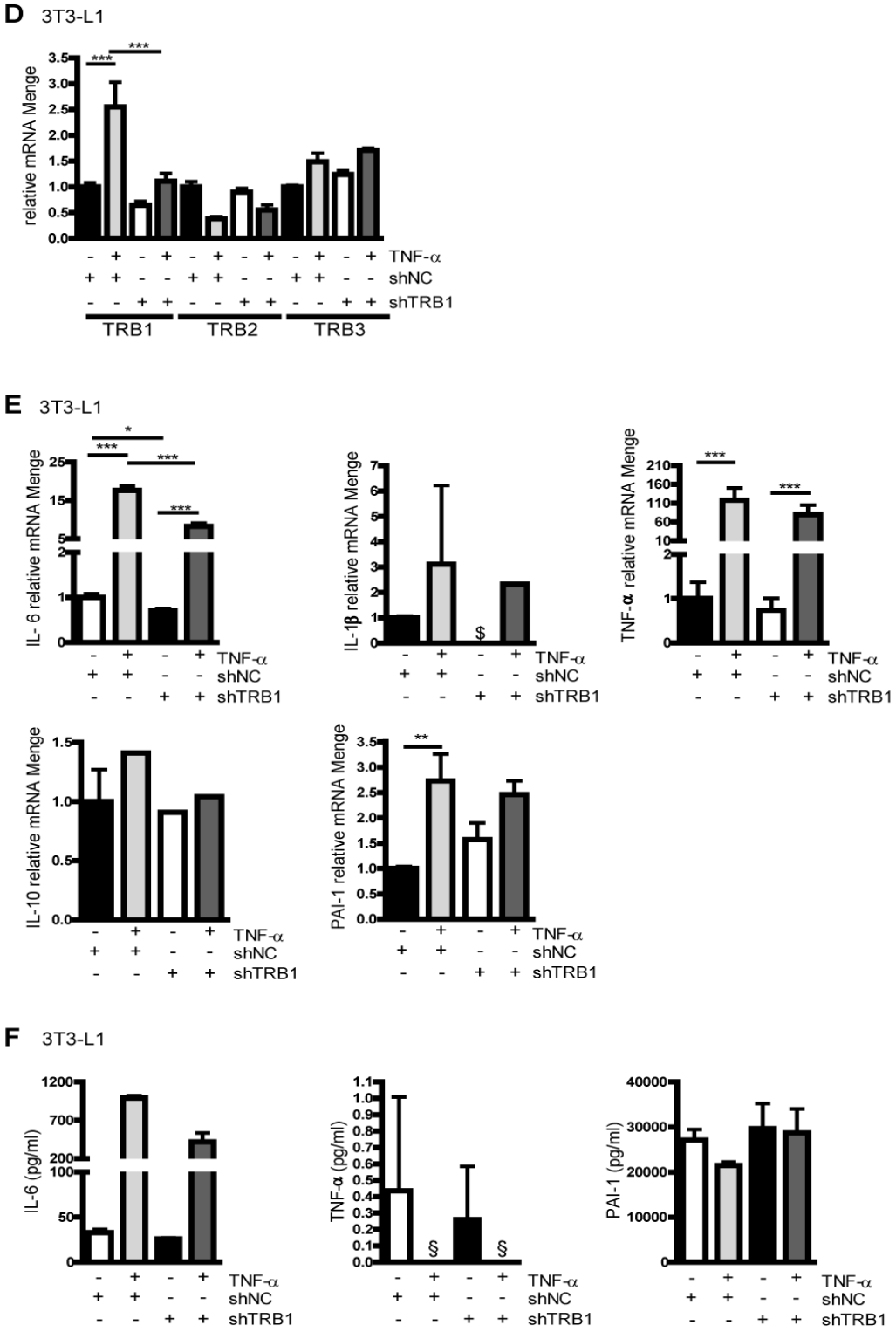


Abb. 2.24: Expression von proinflammatorischen Genen und Sekretion von Zytokinen in und von primären und 3T3-L1 Adipozyten nach TRB1-Knockdown und Stimulation mit TNF-α. Primäre (**A-C**) und 3T3-L1 (**D-F**) Adipozyten wurden mit dem shRNA exprimierenden Adenovirus transduziert und und mit 1,5 ng/ml TNF-α 6 h stimuliert. Die Expression der Tribbles-Gene und von inflammatorischen Genen (IL-6, IL-1β, IFN-β, TNF-α, IL-10, PAI-1, CRP) wurde per qPCR bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). *p< 0,05, **p< 0,01, ***p < 0,001,Student's T-Test; $ =unterhalb der Nachweisgrenze Die veringerte Expression zeigte sich auch in der Sekretion der Zytokine (IL-6, TNF-α, PAI-1) die mit einem Milliplex ELISA gemessen wurde (**C**, **F**). Werte = Mean ± SD, (n =2). §= nicht bestimmt, da mit TNF-α stimuliert wurde.

2.5.1.4 Der Knockdown von TRB1 führt zu einer veränderten Expression von metabolischen Genen in Adipozyten

Die mit dem shRNA-TRB1 Adenovirus transduzierten Adipozyten wurden auf die Expression von im Metabolismus involvierten Genen hin analysiert. Die durch die shRNA vermittelte verminderte Expression von TRB1 führte zu einer signifikant verstärkten Expression von am Stoffwechsel beteiligten Genen, vor allem der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und der AcetylCoA-Carboxylase-1 (ACC1) in primären wie in 3T3-L1 Zellen (Abb. 2.25 A, B). Die Expression des Fettsäurebindeproteins (FABP, Fatty acid binding protein) wurde durch den Knockdown von TRB1 nur in den primären Zellen verstärkt. Die Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) und der Fettsäuresynthase (FAS, fatty acid synthase) wurden nicht signifikant beeinflusst und die Expression der ACC2 wurde in den primären Adipozyten verringert. Unter proinflammatorischen Bedingungen, die hier durch die Stimulation mit TNF-α erzeugt wurden, wurde die Expression der PEPCK in den mit Kontrollvirus sowie mit shRNA-TRB1-Virus behandelten Zellen herunterreguliert, dennoch war die Verringerung der PEPCK-Expression in den shRNA-TRB1 exprimierenden Zellen nicht ganz so stark wie in mit der unspezifischen shRNA behandelten Adipozyten. TNF-α hatte keinen Einfluss auf die Expression von ACC1, denn in den mit der unspezifischen shRNA behandelten Adipozyten, die mit TNF-α stimuliert wurden, änderte sich die Expression nicht und auch in den shRNA-TRB1 exprimierenden Zellen, die mit TNF-α behandelt wurden, wurde ACC1 verstärkt exprimiert. ACC2 wurde durch die Stimulation mit TNF-α reduziert exprimiert, wohingegen der Knockdown von TRB1 keinen Einfluss auf die ACC2-Expression hatte. Die TRB1-Pseudokinase hatte daher auch einen Einfluss auf die Expression von Genen, die am Stoffwechsel beteiligt sind.

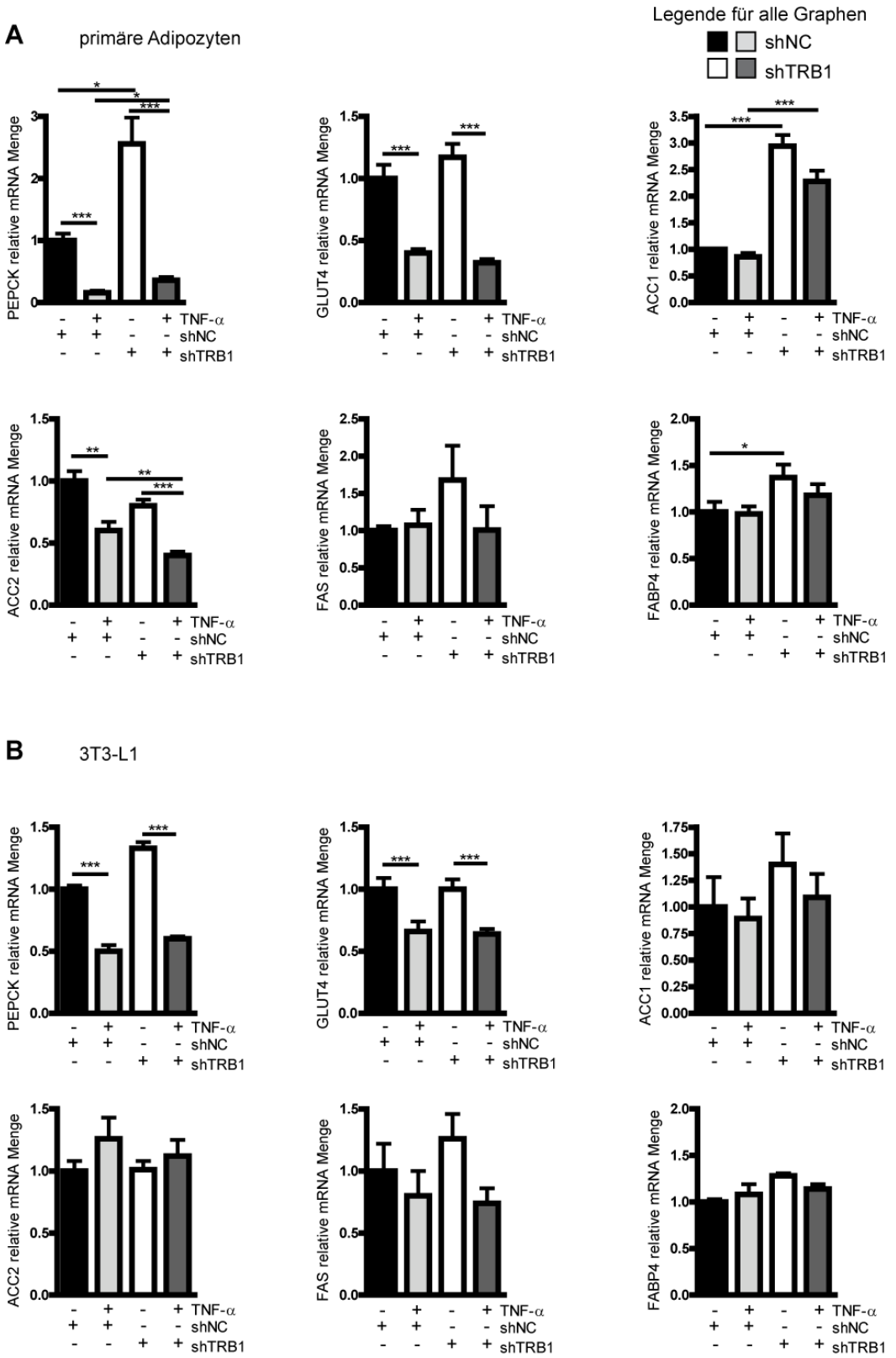


Abb. 2.25: Expression von am Stoffwechsel beteiligter Gene in primären und 3T3-L1 Adipozyten nach TRB1-Knockdown und Stimulation mit TNF-α. Primäre (**A**) und 3T3-L1 (**B**) Adipozyten wurden mit dem shRNA-TRB1 exprimierenden Adenovirus mit einer MOI von 1000 transduziert und 6 h mit 1,5 ng/ml TNF-α stimuliert. Die Expression von Genen, die am Stoffwechsel beteiligt sind (PEPCK, GLUT4, ACC1, ACC2, FAS, FABP) wurde per qPCR bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). *p< 0,05, **p< 0,01, ***p < 0,001,Student's T-Test.

2.5.1.5 Der Knockdown von TRB1 führt zu einer veränderten Expression von Adipokinen

Der Zellkulturüberstand der mit shRNA exprimierenden Adenoviren behandelten Adipozyten wurde mit einem Milliplex ELISA (Millipore) auf die Sekretion der Adipokine Adiponectin, Leptin und Resistin analysiert.

Die Menge an sezernierten Adipokinen unterschied sich sehr stark zwischen den verwendeten Zellen. So war die Menge an den Adipokinen Resistin und Adiponektin, die von 3T3-L1 Zellen sekretiert werden ca. 10-fach höher als in den primären Adipozyten (Abb. 2.26 B). Trotzdem war in beiden Gruppen die Menge an sezerniertem Resistin in den unstimulierten und den mit TNF-α stimulierten shRNA-TRB1 exprimierenden Zellen erhöht (unstimulierte primäre Adipozyten: shNC: 227,7 pg/ml ± 37,5; shTRB1: 546,2 pg/ml ± 41,6; 3T3-L1 Adipozyten: shNC: 11801,3 pg/ml ± 743,8; shTRB1: 15165,7 pg/ml ± 7,3) (Abb. 2.26 A, B). Die Menge an Leptin hingegen war nur in den primären Zellen erhöht (shNC: 40,1 pg/ml ± 9,6; shTRB1: 330,1 pg/ml ± 23,5). Die Menge an sekretierten Adipokinen zeigte einen Unterschied zwischen der Zelllinie und den primären Zellen auf. Dennoch hatte der Knockdown von TRB1 einen Einfluss auf die Menge an sezerniertem Resistin in beiden Zelltypen und man kann daher von einem TRB1 spezifischen Effekt auf die Resistinmenge ausgehen. Die Stimulation mit TNF-α hatte nur einen Einfluss auf die Menge an sezerniertem Leptin. In beiden Zelltypen wurde durch die Stimulation mit TNF-α weniger Leptin in das Medium abgegeben.

Generell zeigten diese Ergebnisse, dass TRB1 in Adipozyten einen Einfluss auf die Genexpression spezifischer Gene, die eine Rolle in der Entzündungsreaktion spielen oder am Stoffwechsel beteiligt sind, hatte.

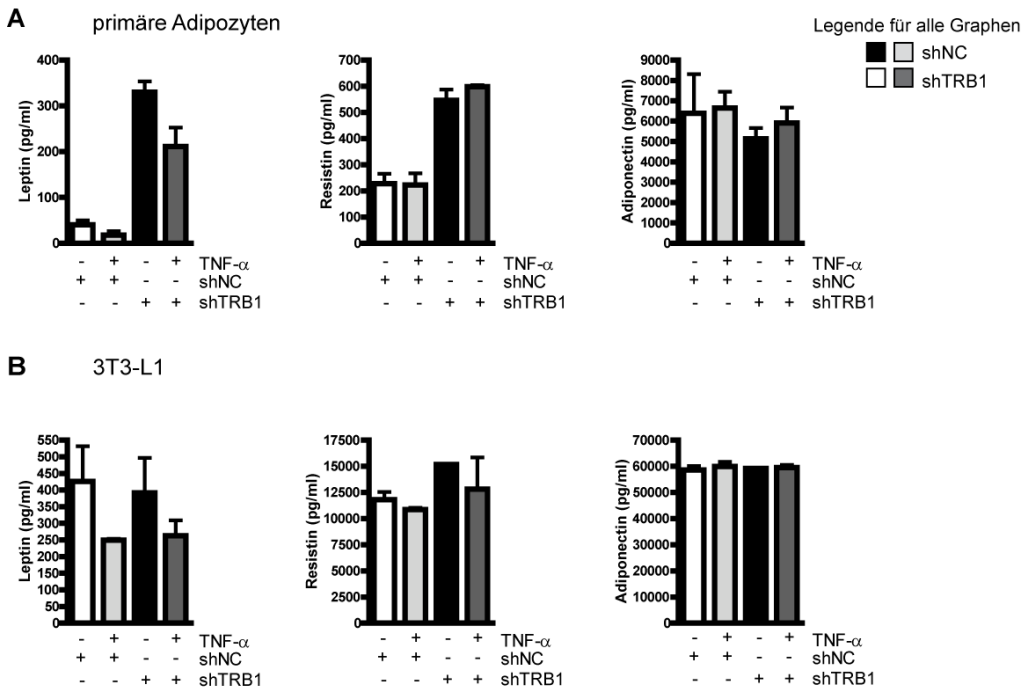


Abb. 2.26: Sekretion von Adipokinen von mit TRB1 shRNA +/- TNF-α behandelten Adipozyten. Primäre (**A**) und 3T3-L1 (**B**) Adipozyten wurden mit dem shRNA-TRB1 exprimierenden Adenovirus mit einer MOI von 1000 transduziert, 6 h mit 1,5 ng/ml TNF-α stimuliert und die Menge an sezernierten Adipokinen (Leptin, Adiponektin, Resistin) im Medium per Milliplex ELISA bestimmt. Werte = Mean ± SD, (n =2).

2.6 TRB1 heterozygote Knockout-Mäuse zeigen kein verändertes Zytokinprofil nach LPS-Injektion

Mit den bisher erhaltenen Ergebnissen, dass TRB1 verstärkt im Fettgewebe von mit LPS behandelten Tieren exprimiert wird (2.1.3.1) und dass der Knockdown von TRB1 in Adipozyten zu einer verringerten Zytokinexpression führt (2.5), lässt sich vermuten, dass TRB1 eine Rolle in der Regulation der Zytokinexpression spielen könnte. Um dies zu testen, wurden TRB1 heterozygote Knockout-Mäuse (Osaka Universität, Japan) verwendet, da sich die Züchtung der homozygoten Knockout-Tiere als schwierig erwies. Die TRB1$^{+/-}$-Mäuse und der korrespondierende Wt wurden mit LPS bzw. PBS für 8 h behandelt und die Expression der TRB-Gene sowie die in 2.4 ermittelten regulierten Gene analysiert. Um einen Hinweis auf einen metabolischen Phänotyp der TRB1$^{+/-}$-Mäuse zu bekommen, wurde auch das Serum der Mäuse analysiert, sowie der Blutzuckerspiegel und Anteil des Körperfettes am Gesamtgewicht bestimmt.

2.6.1 TRB1$^{+/-}$-Mäuse zeigen keinen Unterschied im Körperfettgehalt

Für die Analyse des Körperfettgehalts der TRB1 heterozygoten Knockout-Mäuse wurden die Tiere einer ECHO-Magnetresonanztomographie (MRI magnet resonance imaging) unterzogen. Diese nichtinvasive und am lebenden Tier ohne Narkose durchführbare Methode ermittelt den Körperfettgehalt. Die TRB1$^{+/-}$-Mäuse hatten keinen veränderte Körperfettgehalt gegenüber den Wt-Mäusen (Abb. 2.27).

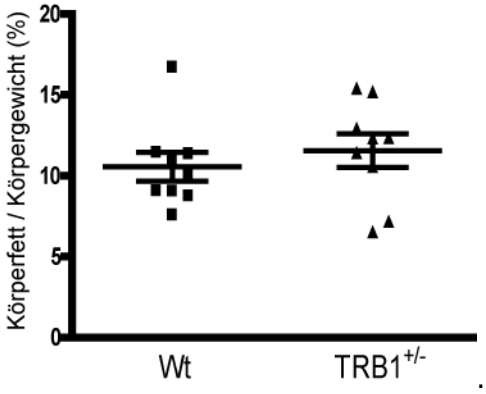


Abb. 2.27: Analyse des Körperfettanteils in TRB1$^{+/-}$-Mäusen. Der Körperfettgehalt der Wt- und TRB1$^{+/-}$-Mäuse wurden im ECHO-MRI bestimmt und in Relation zum Körpergewicht gesetzt. Dargestellt sind individuelle Werte mit dem Mittelwert ± SEM (n=9); Student's T-Test.

2.6.2 TRB1$^{+/-}$-Mäuse mit LPS induzierter Sepsis zeigen keine veränderte Zytokinexpression

Den TRB1$^{+/-}$-Mäuse sowie den Wt-Mäuse wurden jeweils entweder 20 mg/kg Körpergewicht LPS oder PBS peritoneal injiziert. Nach 8 h wurde der Blutzuckerspiegel der Tiere gemessen und die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und präpariert.

Die Genexpression im Fettgewebe der mit PBS oder LPS behandelten Wt- und TRB1$^{+/-}$-Mäuse wurde per qPCR untersucht.

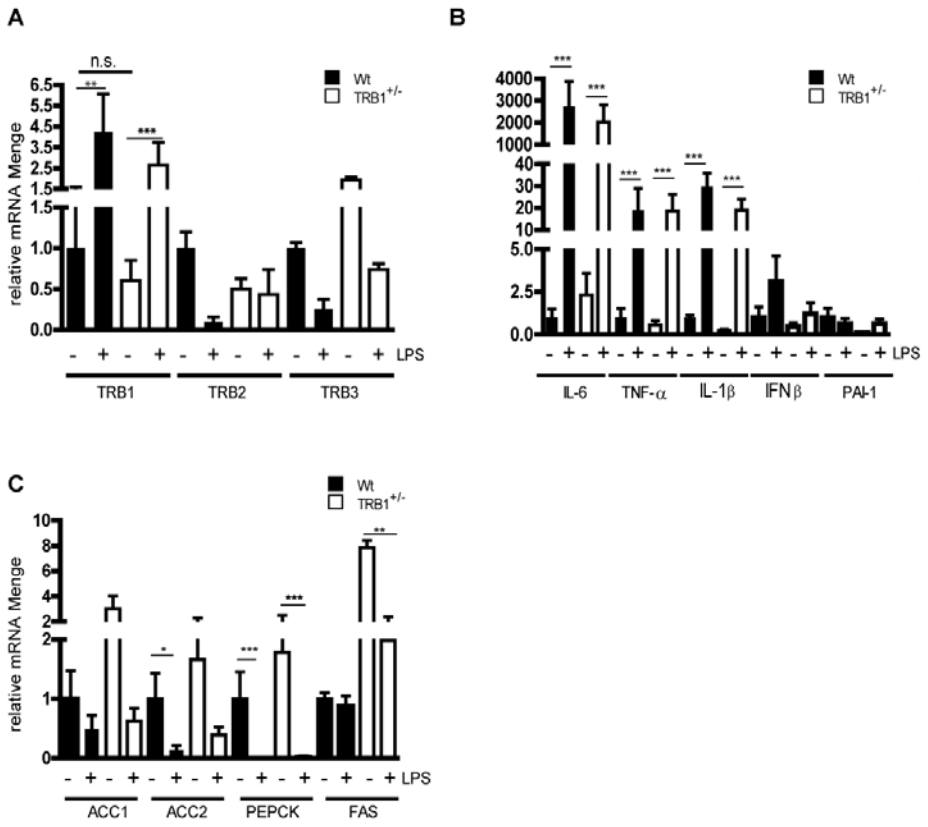


Abb. 2.28: Genexpressionsprofil nach LPS Behandlung im Fettgewebe von TRB1$^{+/-}$-Mäusen. TRB1$^{+/-}$- und Wt-Mäuse wurden mit LPS bzw PBS behandelt und die Expression der zu analysierenden Gene wurde im epididymalen Fettgewebe der Tiere per qPCR gemessen. **A:** Expression von TRB1, TRB2 und TRB3. **B:** Expression der inflammatorischen Gene IL-6, TNF-α, IL-1β, IFN-β und PAI-1. **C** Expression der im Stoffwechsel aktiven Gene ACC1, ACC2, PEPCK und FAS. Die Werte sind Mittelwerte, normalisiert gegen TBP und in Relation gesetzt zu Wt-PBS (=1); (n=3-6). *p <0,05, **p<0,01, ***p<0,001, One Way ANOVA; Student's T-Test.

Die Expression von TRB1 war in den TRB1 heterozygoten Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wt-Mäusen niedriger, wenn auch nicht signifikant. Interessanterweise wurde TRB1 in den Wt- wie in den heterozygoten Knockout-Tieren nach LPS-Behandlung verstärkt exprimiert (Abb. 2.28 A). Die Expression von TRB2 war in den PBS behandelten Tieren niedriger und wurde auch durch die LPS Behandlung reduziert (Abb. 2.28 A). Im Gegensatz dazu war die Expression von TRB3 in den TRB1 heterozygoten Knockout-Tieren erhöht und wurde im Wt- wie in den TRB1$^{+/-}$-Tieren durch die Behandlung mit LPS reduziert (Abb. 2.28 A). Die Zytokine IL-6, TNF-α, IL-1β und IFN-β, wurden bis auf letzteres in den mit LPS behandelten Tieren signifikant verstärkt exprimiert. In den PBS behandelten Tieren ließ sich eine Tendenz der geringeren TNF-α, IL-1β, IFN-β und PAI-1 Expression feststellen, die zum Teil auch in den mit TRB1-shRNA Adenovirus transduzierten

Zellen (s.2.5.1.3) zu sehen war (Abb. 2.28 B). Die am Stoffwechsel beteiligten Gene ACC1, ACC2, PEPCK und FAS wurden in den TRB1$^{+/-}$-Mäusen verstärkt exprimiert und in den Wt- wie in den heterozygoten Knockout-Tieren durch die LPS Behandlung verringert exprimiert (Abb. 2.28 C). Die geringere Expression von TRB1 hatte daher keinen Einfluss auf die Expression von proinflammatorischen Genen nach achtstündiger LPS-Behandlung, wohingegen die Expression dieser Gene unter unstimulierten Bedingungen eine Tendenz aufzeigten, bei der sie in den TRB1$^{+/-}$-Tieren geringer exprimiert wurden.

2.6.2.1 TRB1$^{+/-}$-Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Serumanalyse

Der Einfluss von TRB1 auf den Blutzucker und die Blutfettwerte wurde in den LPS und PBS behandelten Tieren im Vollblut (Blutzucker) und Serum untersucht. Die Blutglukosewerte der Wt- und TRB1$^{+/-}$-Tiere nach 22 h Hungern zeigten keinen signifikanten Unterschied. In beiden Gruppen führte die LPS-Behandlung zu einem signifikant niedrigeren Blutzuckerspiegel (Abb. 2.29 A). Die Seruminsulinwerte waren durch die LPS Behandlung in beiden Gruppen leicht erhöht, wiesen aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf (Abb. 2.29 B).

Zwischen den mit PBS sowie den mit LPS behandelten Wt- und TRB1$^{+/-}$-Tieren gab es jeweils keinen signifikanten Unterschied in den Mengen an freien Fettsäuren (NEFA, non esterified fatty acids) (Abb. 2.29 C), Cholesterin (Abb. 2.29 D) oder Triglyzeriden (Abb. 2.29 E). Die Menge an NEFAs und Triglyzeriden war in den LPS behandelten Wt-Tieren im Vergleich zu den PBS behandelten Wt-Tieren signifikant niedriger. Diese Tendenz war auch in den TRB1$^{+/-}$-Tieren zu erkennen (Tab.2.1). TRB1 hatte daher keinen Einfluss auf die Blutfettwerte und den Blutzucker, sowie auf das Seruminsulin unter Hunger- und proinflammatorischen Bedingungen.

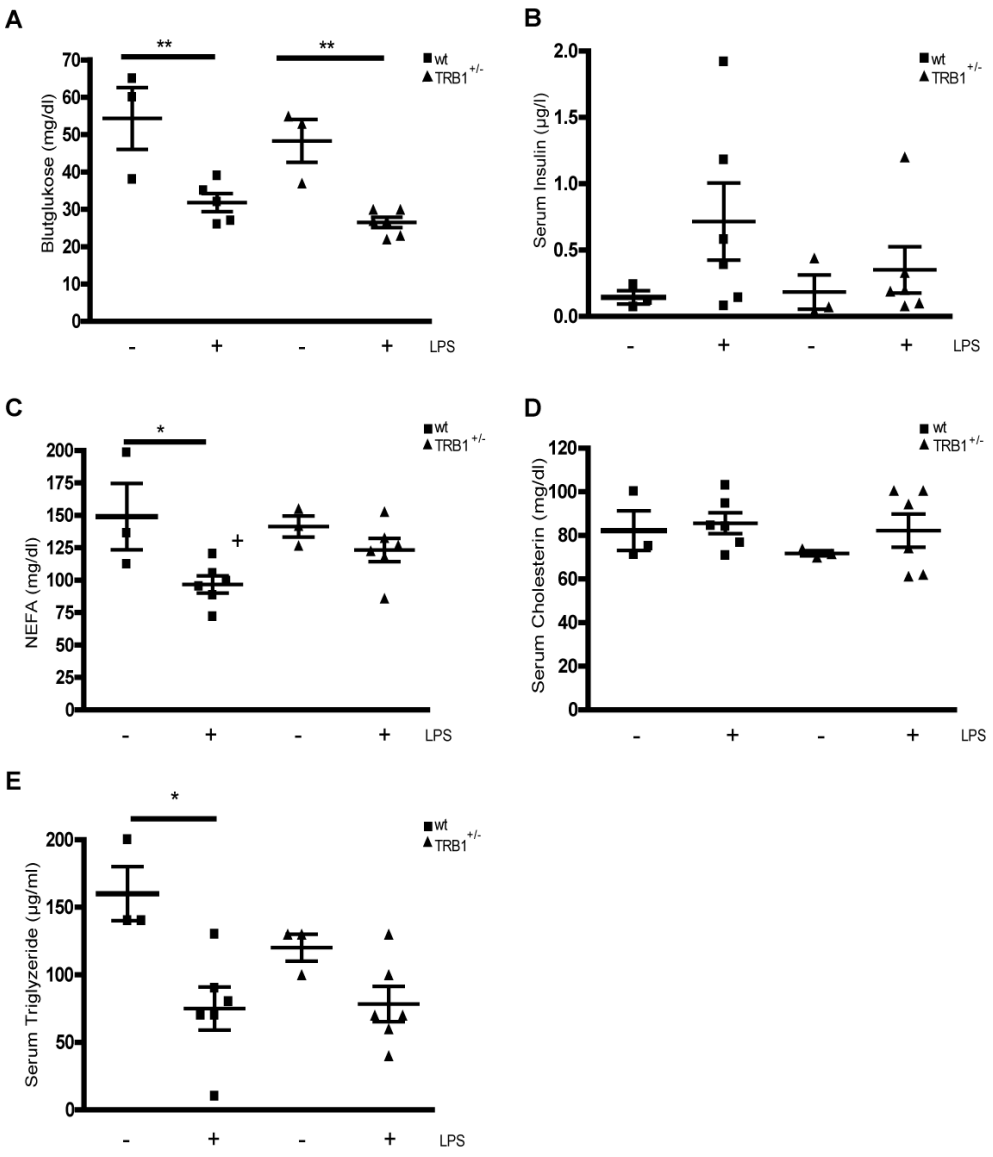


Abb. 2.29. Blutzucker-, Seruminsulinkonzentration und Blutfettwerte der TRB1$^{+/-}$- und Wt-Mäuse nach LPS-Behandlung. TRB1$^{+/-}$- und Wt-Mäuse wurden mit LPS bzw. PBS behandelt und der Blutzuckerspiegel nach 8 h gemessen. Die Blutwerte wurden im Serum ermittelt. Dargestellt sind individuelle Werte mit dem Mittelwert ± SEM. (n=3-6), Student's T-Test. **A**: Blutglukose nach 22 h Hungern und LPS Injektion, **B**: Insulinkonzentration nach 22 h Hunger und LPS Injektion, **C**. Freie Fettsäuren im Serum nach 22 h Hungern und LPS Injektion, **D**: Cholesterinkonzentration im Serum nach 22 h Hungern und LPS Injektion, **E**: Triglyzeride im Serum nach 22 h Hungern und LPS Injektion.

Tab. 2.1 Serumanalyse der mit PBS bzw. LPS behandelten Wt- und TRB1$^{+/-}$-Mäuse

	Wt PBS	Wt LPS	TRB1$^{+/-}$ PBS	TRB1$^{+/-}$ LPS
Blutglukose (mg/dl)	54,33 ± 8,3	31,80 ± 2,4	48,33 ± 5,7	26,50 ± 1,4
	(3,02 mMol/l)	(1,77 mMol/l)	(2,67 mMol/l)	(1,47 mMol/l)
Insulin (µg/l)	0,14 ± 0,05	0,72 ± 0,29	0,18 ± 0,13	0,35 ± 0,17
NEFA (mg/dl)	149 ± 25,6	96,78 ± 6,6	141,4 ± 8,2	123,3 ± 8,9
Cholesterin (mg/dl)	82,12 ± 9,1	85,60 ± 4,8	71,77 ± 1,1	82,19 ± 7,6
Triglyzeride (µg/ml)	160,0 ± 20,00	75,00 ± 15,86	120,0 ± 10,00	78,33 ± 13,02

2.7 TRB1 ist ein Kernprotein und ein Koaktivator von NF-κB

Der shRNA vermittelte Knockdown von TRB1 in Adipozyten führte zu einer verminderten Expression von inflammatorischen Genen. Viele dieser Gene werden über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB reguliert, vor allem über das p50/p65-Dimer. Um festzustellen, ob TRB1 die NF-κB vermittelte Transkription reguliert, wurde zum einen die Rekrutierung von TRB1 an NF-κB-Elemente in Promotoren proinflammatorischer Gene getestet. Zum anderen wurde die Aktivierungskapazität von TRB1 auf ein NF-κB sensitives Element (response element) analysiert. Desweiteren wurde die Protein-Protein-Interaktion zwischen TRB1 und NF-κB untersucht.

2.7.1 TRB1 ist eine Kernprotein

Die Lokalisation eines Proteins in der Zelle gibt Hinweise auf dessen Funktion. Um die Lokalisation des endogenen TRB1-Proteins zu untersuchen, wurden 3T3-L1 Adipozyten hypotonisch aufgeschlossen. Über einen Zentrifugationsschritt wurden die zytosolischen Bestandteile von der Kernfraktion getrennt und anschließend die so gewonnenen Fraktionen per SDS-PAGE aufgetrennt. TRB1, das Kernprotein p300 und das zwischen Kern und Zytosol pendelnde Protein p65, sowie VCP und β-Aktin wurden per Immunoblot detektiert. In den unstimulierten 3T3-L1 Adipozyten befand sich TRB1 sowie p300 ausschließlich im Zellkern. p65 war in beiden Fraktionen detektierbar, lag aber vermehrt im Zytosol vor. VCP und β-Aktin wurden als Ladekontrollen benutzt und lagen beide sowohl im Kern als auch im Zytosol vor (Abb. 2.30 A).

2.7.2 TRB1 wird über die NF-κB-Bindestelle an Promotoren von Zytokingenen rekrutiert

Der TRB1-Knockdown hat gezeigt, dass die Expression von Genen, die durch proinflammatorische Signale reguliert werden, inhibiert wird. Viele dieser Gene haben eine NF-κB-Bindestelle in ihrer Promotorsequenz. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Einfluss des TRB1-Knockdowns über NF-κB vermittelt werden könnte.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) mit überexprimiertem TRB1-Flag in mit CM und M stimulierten 3T3-L1 Fibroblasten

durchgeführt. Die Bindung an die DNA wurde mittels qPCR mit genspezifischen Primern von Zytokinpromotoren analysiert. Die Amplifikation der durch die Chromatin-IP von TRB1-Flag erhaltenen DNA Stücke zeigte eine Bindung von TRB1-Flag an die Promotoren von IL-6 (M: 0,42% ± 0,002, CM: 2,62% ± 0,015 des Inputs), IL-1β (M: 0,91% ± 0,0015, CM: 2,11% ± 0,003) und TNF-α (M: 0,42% ± 0,0007, CM: 2,12% ± 0,004) (Abb. 2.30 B, Tab. 2.1). Das TRB1-Flag-Protein war nach Stimulation mit dem CM an den Promotoren im Vergleich zu mit M stimulierten Zellen angereichert. Die Bindung an den IL-6-Promotor fand nur an einer Sequenz mit NF-κB-Bindestelle statt, da bei der PCR über die Region von IL-6 ohne NF-κB-Bindestelle keine Anreicherung messbar war. Auch die Bindung an den IL-1β-Promotor war stärker an der Sequenz mit der NF-κB-Bindestelle als an die ohne (M: 0,2% ± 0,0006, CM: 0,13% ± 0,0003).

Tab. 2.2 Chromatin-Immunopräzipitation von TRB1-Flag an Promotoren von Zytokingenen

Promotor	IP anti-Flag		IP anti-HA		IP anti-H4	
	% Input M	% Input CM	% Input M	% Input CM	% Input M	% Input CM
IL-6	0,42% ± 0,002	2,62% ± 0,015	$	$	$	4,87%
IL-6 Δ NF-κB	$	$	$	$	$	$
IL-1β	0,91%± 0,0015	2,11% ± 0,003	$	$	1,17%	$
IL-1β Δ NF-κB	0,2%± 0,0006	0,13% ± 0,0003	$	$	$	0,11%
TNF-α	0,42% ± 0,0007	2,12% ± 0,004	$	$	$	1%

$ = unterhalb der Nachweisgrenze

Die ChIP mit unspezifischem HA-Antikörper war in allen Fällen negativ und die Kontrolle mit dem Histon-4-Antikörper (H4) war positiv (Tab. 2.2). Daher kann man davon ausgehen, dass TRB1 spezifisch über die NF-κB-Bindestelle an die Promotorregionen von proinflammatorischen Genen bindet und dadurch die Expression dieser Gene beeinflusst. Ob die Bindung direkt an die DNA erfolgt oder über einen Proteinkomplex konnte mit diesen Ergebnissen jedoch nicht beantwortet werden.

2.7.3 TRB1 hat einen direkten Effekt auf die NF-κB abhängige Transkription

Die shRNA vermittelte Reduktion der TRB1-Expression führte zu einer verringerten Expression von NF-κB abhängigen Genen. Um zu untersuchen, ob TRB1 eine n direkten Effekt auf die NF-κB-Aktivität hat, wurden 3T3-L1 Fibroblasten mit einem „3x NF-κB Response Element“ Luziferase-Reporterkonstrukt und dem pENTR/U6-shRNA1541-Plasmid transfiziert. Nach 48 h wurde die Luziferaseexpression gemessen. Der Knockdown von TRB1 führte zu einer signifikant reduzierten NF-κB-Aktivität (Abb. 2.30 C). Die Koexpression von TRB1-Flag und p65 führte zu einer erhöhten Transkription des Reporterkonstrukts als die Expression der jeweiligen Konstrukte alleine (Abb. 2. 30 D).

2.7.4 TRB1 und p65 interagieren über die p65-Transaktivierungs-Domäne

Um eine direkte Interaktion von p65 und TRB1 nachzuweisen, wurde das p65-GST-Fusionsprotein und die Domänen p65-RHD-GST und p65-TAD-GST rekombinant exprimiert und über Glutathion Sepharose 4B (Amersham) aufgereinigt. Das TRB1-Flag-Protein wurde *in vitro* in Retikulozytenlysat mit L-[^{35}S]-Methionin (Amersham) exprimiert. Die GST-Fusionsproteine wurden mit dem radioaktiv markierten Protein vermengt und über Nacht zusammen mit der Glutathion-Sepharose bei 4°C inkubiert. Die an die Sepharose gebundenen Proteinkomplexe wurden durch Aufkochen in 2x SDS-Probenpuffer denaturiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und eine Autoradiografie durch die Exposition eines Films (Kodak® BioMAX™ MR Film) für 48 h angefertigt.

Das radioaktivmarkierte TRB1-Protein ließ sich im Retikulozytenlysat nachweisen. Es interagierte mit dem vollständigen p65 sowie mit der TA-Domäne von p65 (Abb. 2.30 E). Die Kopräzipitation im GST-Pulldown ist ein direkter Nachweis für die Interaktion von TRB1 mit p65.

Ein weiterer Nachweis für die Interaktion von p65 und TRB1-Flag wurde über eine Koimmunopräzipitation erbracht. Die Expressionsplasmide pcDNA-p65 und pcDNA3-TRB1-Flag wurden in HEK 293 Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden lysiert und mit Flag-Agarose (Sigma) inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden durch ein Flag-Peptid im Überschuss von der Agarose gelöst und über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Flag-Antikörper und p65 Antikörper detektiert. Die beiden Proteine TRB1-Flag und p65 konnten im Lysat nachgewiesen werden. Im Eluat der TRB1-Flag und p65 Koexpression ließ sich p65 nachweisen, was in der Kontrolle von koexprimiertem Flag und p65 nicht der Fall war. TRB1 interagierte daher spezifisch mit p65 (Abb. 2.30 F).

Das TRB1-Gen wird in Adipozyten von adipösen Tieren und unter inflammatorischen Bedingungen über die Aktivierung des JNK-Signalwegs und der Aktivierung des NF-κB Transkriptionsfaktors exprimiert. Stimuliert wird die Expression durch Insulin und durch von Makrophagen sezernierte, hitzeinstabile Faktoren. TRB1 ist ein Koaktivator von p65 und reguliert darüber die Expression von proinflammatorischen und am Stoffwechsel beteiligten Genen.

Abb. 2.30 Analyse der Funktion von TRB1. Siehe folgende Seite.

A: TRB1 ist ein Kernprotein. Die Zellkerne und die zytosolische Fraktion von unstimulierten 3T3-L1 Adipozyten wurden über SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und TRB1, p65, p300, VCP und β-Aktin wurden im Immunoblot detektiert. **B:** TRB1 bindet an die Promotoren von IL6, IL-1β und TNF-α über NF-κB-Bindestellen. Die ChIPs wurden mit überexprimiertem TRB1-Flag in mit CM oder M stimulierten 3T3-L1 Fibroblasten durchgeführt. Eine Bindung wurde über PCR mit den entsprechenden Primern nachgewiesen. $= unterhalb der Nachweisgrenze. **C:** Der TRB1-Knockdown hat einen direkten Effekt auf die NF-κB abhängige Transkription. 3T3-L1 Fibroblasten wurden mit einem 3x NF-κB Response Element Luziferase-Reporterkonstrukt und dem pENTR/U6-shRNA1541 Plasmid transfiziert und die Luziferaseaktivität nach 48 h gemessen. **D:** Koexpression von p65 und TRB1-Flag führt zu einer erhöhten Transkription des NF-kB-Response Elements. 3T3-L1 Fibroblasten wurden mit einem 3x NF-κB Response Element Luziferase-Reporterkonstrukt und p65, TRB1-Flag, oder Flag kotransfiziert und die Luziferaseaktivität 48 h später gemessen. **E:** TRB1 interagiert direkt mit p65 im GST-Pulldown Assay. Das p65-GST-Fusionsprotein und die Deletionskonstrukte GST-p65–RHD und GST-p65-TAD, sowie das TRB1-Flag Protein wurden *in vitro* exprimiert, aufgereinigt und miteinander inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden über Sepharose präzipitiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Interaktion wurde über die Autoradiografie eines Films nachgewiesen. **F:** TRB1 interagiert mit p65 in einer Koimmunopräzipitation. TRB1-Flag und p65 wurden in HEK 293 Zellen überexprimiert, die Zellen nach 48 h lysiert und mit Flag-Agarose inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot gegen Flag und p65 detektiert.

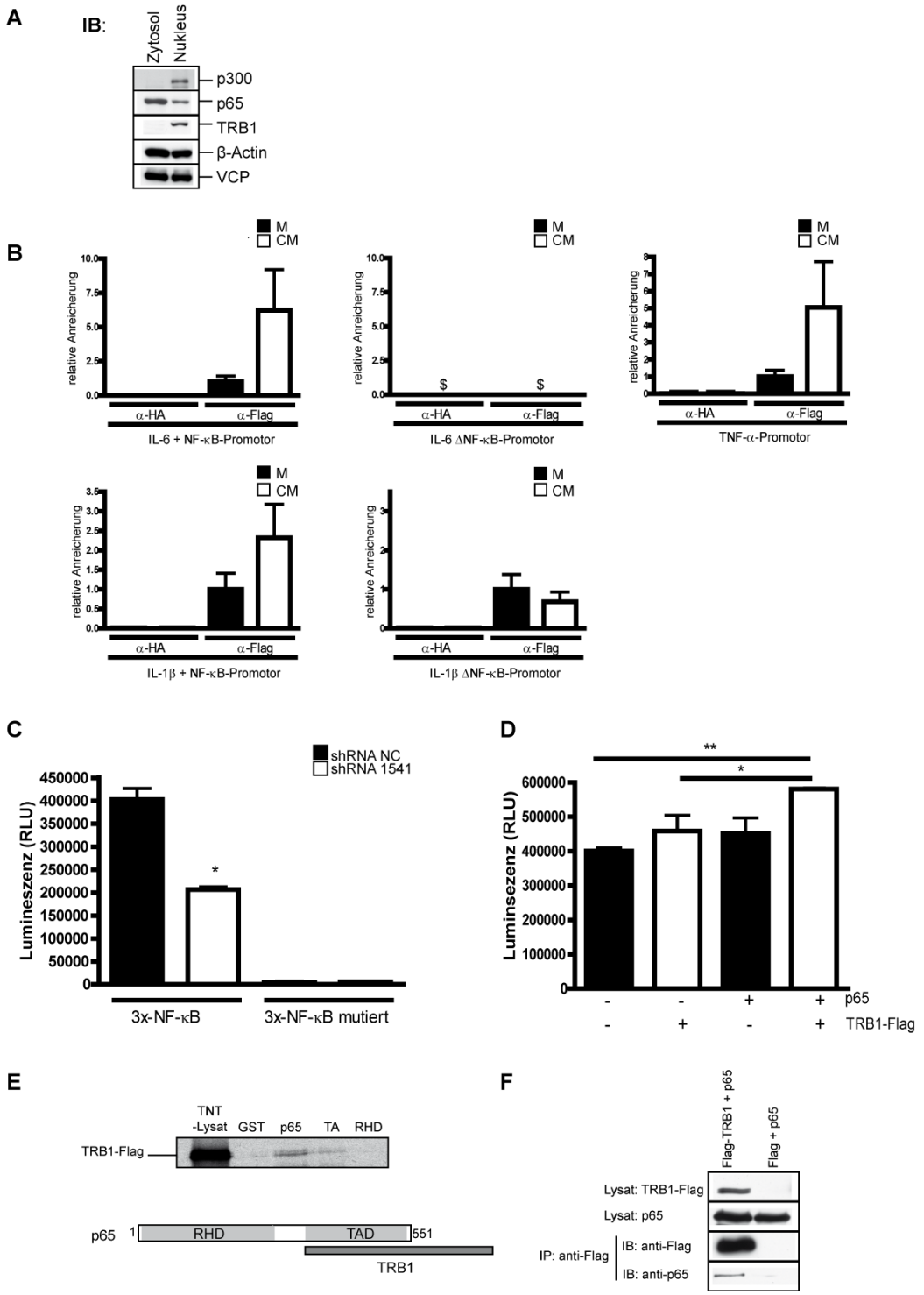


Abb. 2.30 Analyse der Funktion von TRB1. Erklärungen siehe vorherige Seite.

3 Diskussion

Die zunehmende weltweite Prävalenz von Adipositas und die damit verbundenen Krankheiten wie Typ 2 Diabetes, Arteriosklerose und Herzerkrankungen werden zu einem immer größeren Problem, nicht nur in der westlichen Welt. Zwar zählen kalorienreiche Ernährung und mangelnde Bewegung zu den Hauptgründen dieses Problems, doch spielen auch genetische Faktoren eine Rolle. Die molekularen Mechanismen der Entstehung einer Adipositas, bzw. der durch die Adipositas beeinflussten Stoffwechselprozesse und deren Folgen sind noch weitestgehend unbekannt. Eine Gruppe von Genen, denen in diesem Zusammenhang eine Bedeutung zukommt, sind die Tribbles-Pseudokinasen (TRB1, TRB2, TRB3). Die drei homologen Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen und werden unabhängig voneinander gewebsspezifisch exprimiert. Signale, die die Expression dieser Gene steuern, sind unter anderem Hunger und Entzündungsreaktionen [47, 78]. Auf der Beobachtung aufbauend, dass TRB3 in der Leber diabetischer Tiere überexprimiert wird und dadurch die Insulinresistenz fördert, wurde in dieser Arbeit die Expression der drei Tribbles-Gene in verschiedenen Mausmodellen der Adipositas, Sepsis und Krebskachexie analysiert. So konnte in der vorliegenden Arbeit die Pseudokinase TRB1 als ein im Fettgewebe durch proinflammatorische Moleküle stimuliertes Gen identifiziert werden, das wiederum an der Regulation der Expression von proinflammatorischen Genen beteiligt ist. Dies geschieht durch die Bindung von TRB1 an die p65 Untereinheit des NF-κB-Transkriptionsfaktors wodurch dessen transkriptionelle Aktivität erhöht wird. Somit wurde TRB1 als ein neuer Transkriptions-Kofaktor von NF-κB im Fettgewebe identifiziert.

3.1 Die Expression der Pseudokinase Tribbles 1 wird im Fettgewebe durch proinflammatorische Moleküle induziert

Die Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen Blutzuckerspiegels ist wichtig für die Gesundheit. Trotz Phasen der Nahrungszufuhr und des Nahrungsmangels bleibt der Blutzuckerspiegel eines gesunden Menschen durch eine enge Regulation zwischen 4 und 7 mMol/l. Ist Nahrung verfügbar, wird zur Aufnahme der Glukose aus dem Blut Insulin ausgeschüttet. In Geweben wie Fett, Skelettmuskulatur und der Leber bindet Insulin an den Insulinrezeptor und initiiert dadurch eine intrazelluläre

Signaltransduktion, die zur Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT4) zur Zellmembran führt. Daraufhin kann Glukose aus dem Blut in Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden. Insulin blockiert gleichzeitig die Glukoneogenese in der Leber und die Lipolyse im Fettgewebe [76]. Bei der Untersuchung der Expression der Tribbles-Pseudokinasen in den peripheren metabolisch aktiven Geweben Leber, Fett und Skelettmuskulatur zeigte sich, dass die drei Gene gewebsspezifisch und abhängig vom metabolischen Status reguliert wurden. Es stellte sich heraus, dass die Expression der Pseudokinase TRB1 primär im Fettgewebe und TRB3 in der Leber und im Fettgewebe unter metabolischen Bedingungen wie Hunger und Nahrungsaufnahme reguliert wurde. Die Pseudokinase TRB2 wurde zwar in allen drei untersuchten Geweben exprimiert, aber unter diesen Bedingungen nicht reguliert.

Die beobachtete erhöhte TRB3-Expression in der Leber unter Hunger führt wie von Du *et al*. beschrieben zu einer Interaktion zwischen TRB3 und Akt und somit zu einer Inhibition der Insulinsignaltransduktion [78]. Auch die von Qi *et al*. beschriebene Regulation von TRB3 im Fettgewebe konnte bestätigt werden (Abb. 2.1 A). TRB3 stimulierte in den Fettzellen die Lipolyse indem es den proteasomalen Abbau der AcetylCoA-Carboxylase (ACC) steuert. Dabei vermittelte TRB3 die Assoziation der E3 Ubiquitinligase COP1 (constitutive photomorphogenic protein 1) an ACC, das daraufhin proteasomal abgebaut wurde. Übereinstimmend mit diesem Befund waren Mäuse, die TRB3 in Fettzellen transgen überexprimierten vor ernährungsbedingter Adipositas geschützt, in dem sie eine erhöhte Lipolyserate aufwiesen [88].

Alle drei Gene werden auch in Skelettmuskelzellen exprimiert, aber unter den gegebenen Bedingungen nicht reguliert. Während für die Pseudokinase TRB2 noch keine Funktion im Muskelgewebe beschrieben wurde, ist von TRB3 bekannt, dass es während der Differenzierung von C2C12 Myoblasten zu Myotuben herunterreguliert wird, da TRB3 auch in diesen Zellen mit Akt interagiert und dadurch die Differenzierung blockiert [119]. TRB3 übt daneben auch in Muskelzellen den gleichen inhibitorischen Effekt auf Akt aus und hemmt auch hier die Insulinsignaltransduktion. TRB1 hingegen scheint eher eine Rolle in der glatten Muskulatur zu spielen, denn es steuert die Chemotaxis und Proliferation von glatten Muskelzellen und wird in arterosklerotischen Arterien verstärkt exprimiert [55].

Die Funktion und Regulation von TRB1 im Fettgewebe war bisher unbekannt. Interessanterweise war die Regulation von TRB1 im Fettgewebe verglichen mit der Expression von TRB2 und TRB3 am stärksten und wurde durch die Nahrungsaufnahme induziert (Abb. 2.1 A). Nahrungsaufnahme führt zur Ausschüttung von Insulin und dies reguliert die Glukoseaufnahme aus dem Blut in die Gewebe. Insulin steuert daneben aber auch die Genexpression [120]. Die erhöhte Expression von TRB1 im Fettgewebe kann daher unter anderem auf die Stimulation der Genexpression durch Insulin zurückgeführt werden, denn in Adipozyten, die mit Insulin stimuliert wurden, wurde TRB1 verstärkt exprimiert (Abb. 2.9).

Die Genexpressionsanalyse des Fettgewebes der verschiedenene Adipositas-mausmodelle zeigte eine erhöhte Expression von TRB1 in den db/db- und ob/ob-Tieren aber nicht in dem polygenetischen Modell der NZO-Mäuse und auch nicht in Mäusen, die durch fettreiche Nahrung eine Adipositas entwickelten.

Die beiden monogenetischen Mausmodelle der Adipositas db/db und ob/ob haben beide einen Defekt in der Leptinsignaltransduktion. Den db/db-Tieren fehlt der Leptinrezeptor, den ob/ob-Tieren das Leptingen. Leptin wird fast ausschließlich von Adipozyten sezerniert, ist ein Sättigungshormon und steuert im Gehirn die Nahrungsaufnahme [121]. Durch das fehlende Signal für das Sättigungsgefühl sind die Tiere hyperphag, werden adipös und insulinresistent [122]. Die Substitution der ob/ob-Tiere mit Leptin über einen Zeitraum von 21 Tagen führte zu einer Gewichtsreduktion [104], jedoch nicht zu einer Reduktion der erhöhten Expression von TRB1. Die Expression von TRB1 im Fettgewebe wird daher nicht durch Leptin reguliert.

Die Entwicklung einer Adipositas allein reicht nicht aus, um die Expression von TRB1 im Fettgewebe dauerhaft zu erhöhen. Das zeigte der Fütterungsversuch mit fettreichem Futter. Die Tiere nahmen zwar an Gewicht zu, die Expression von TRB1 änderte sich aber nicht (Abb. 2.4). Neben der durch Fehlernährung entstehenden Adipositas trägt auch die genetische Prädisposition zu deren Entwicklung bei. Der polygenetische Mausstamm New Zealand Obese (NZO) ist ein Modell, das spontan Adipositas und Insulinresistenz entwickelt. Vor allem die Männchen leiden unter Hyperinsulinämie mit darauffolgender Hyperglykämie und dienen als Modell des metabolischen Syndroms [123]. Interessanterweise zeigten diese Tiere keine

Änderung in der Expression von TRB1 im Fettgewebe. So scheint die genetische Prädisposition für Adipositas dieser Tiere keinen Einfluss auf die Regulation der TRB1-Expression zu haben.

So führte die akute Nahrungaufnahme vermutlich über die Wirkung von Insulin zu einer erhöhten Expression von TRB1 im Fettgewebe. Die reine kurzzeitige Veränderung der Fettgewebsmasse, sei es durch Gewichtszunahme über fettreiche Nahrung oder Gewichtsabnahme durch die Injektion von Leptin, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression von TRB1.

Die Expansion des Fettgewebes bei einer starken Gewichtszunahme führt zu einer subakuten chronischen Entzündungsreaktion, die erst lokal im Fettgewebe abläuft. Die hypertrophen Fettzellen sezernieren Adipokine, die die Einwanderung von Makrophagen in das Fettgewebe steuern. Die erhöhte Anzahl an aktiverten Makrophagen führt zu einer erhöhten Sekretion von Zytokinen, die durch den Blutkreislauf auch systemisch wirken. Es kommt zu einer leichten systemischen Entzündungsreaktion, die die Insulinsensitivität der Adipozyten, der Leber und der Skelettmuskulatur negativ beeinflusst [20, 21]. Neben dieser Ursache für die systemische Inflammation unter adipösen Bedingungen gibt es auch Hinweise, dass Mikroorganismen im Darm einen Einfluss darauf haben. So wird inzwischen davon ausgegangen, dass die Fehlernährung zu einer veränderten Besiedlung des Darmes mit Mikroorganismen führt. Diese setzen beim Absterben unter anderem das Endotoxin Lipopolysaccharid frei, das primär mit Sepsis in Verbindung gebracht wird, aber auch zur metabolischen Endotoxämie führen kann [25]. Db/db- und ob/ob-Tieren weisen einen erhöhten LPS-Spiegel im Plasma auf [124] und auch in Studien an adipösen Menschen konnten erhöhte Endotoxinwerte im Blut gemessen werden [125, 126]. Die metabolische Auswirkung einer Sepsis ähnelt der durch Adipositas ausgelösten systemischen Inflammationsreaktion [29]. Die erhöhte Expression von TRB1 im Fettgewebe der db/db- und ob/ob-Tiere könnte also auch auf die erhöhte Inflammation, die evt. durch den erhöhten LPS-Spiegel im Serum verursacht wird [124], zurückgeführt werden. Ein weiteres Argument für die These, dass Inflammation eine Rolle in der Regulation der TRB1-Expression spielt, liefert die Analyse der Genexpression im Fettgewebe von Mäusen, in denen eine Sepsis durch die Injektion von LPS ausgelöst wurde. LPS bindet an den Toll Like Rezeptor 4 und aktiviert den NF-κB-Transkriptionsfaktor sowie den JNK-Signalweg und steuert darüber die

Expression von proinflammatorischen Genen [114]. In Adipozyten wird nach der Stimulation mit LPS der TLR4 vermehrt exprimiert und es kommt zu einer erhöhten Expression von Zytokinen [127]. Die erhöhte Expression von proinflammatorischen Genen wie IL-6; IL-1β, TNF-α und MCP-1 im Fettgewebe der septischen Tiere deutete auf eine Entzündungsreaktion hin. Interessanterweise wurde auch TRB1, im Gegensatz zu TRB2 und TRB3, verstärkt exprimiert (Abb. 2.6 A).

Neben der starken Gewichtszunahme und der damit verbundenen leichten Entzündungsreaktion, wird wahrscheinlich auch die starke Gewichtsabnahme während der Krebskachexie durch erhöhte Zytokine im Plasma beeinflusst. Die Krebskachexie ist eine komplexe Stoffwechselstörung die durch fortschreitenden Gewichtsverlust gekennzeichnet ist und als Nebeneffekt eines Tumors auftritt [128]. Das Auftreten einer Kachexie trägt zu einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufs bei und ist für bis zu 20% aller Todesfälle durch Krebs verantwortlich [129]. Der Gewichtsverlust entsteht durch Anorexie und dem Verlust von Muskelmasse und Fettgewebe durch katabole Prozesse wie Proteinabbau und erhöhte Lipolyse. Man geht davon aus, dass Faktoren, die vom Tumor sezerniert werden, zu diesem Phänotyp führen. So werden die im Blut zirkulierenden proinflammatorischen Moleküle IL-6, TNF-α und IL-1 mit der Entstehung einer Kachexie in Verbindung gebracht [130]. Allerdings scheint es nicht ein einzelnes Zytokin zu sein, dass den kachektischen Phänotyp auslöst, sondern eine Mischung, die von Tumor zu Tumor unterschiedlich sein kann [129]. Studien in Patienten, die mit Entzündungshemmern behandelt wurden zeigten, dass ein Entzündungsprozess der Krebskachexie zu Grunde liegen kann. Die Patienten nahmen zwar nicht an Gewicht zu, hatten aber eine längere Überlebensrate verglichen mit der Placebogruppe [131]. In diesem katabolen, proinflammatorischen Zustand war die TRB1-Expression im Fettgewebe kachektischer Tiere erhöht (Abb. 2.7 A). Dies ist wahrscheinlich eher auf den proinflammatorischen Zustand als auf den katabolen Zustand zurückzuführen, da die Expression von TRB1 unter Hunger in gesunden Tieren verringert war.

Das Fettgewebe besteht nicht nur aus Adipozyten und Präadipozyten sondern auch aus Immunzellen wie Makrophagen und Leukozyten sowie Endothelzellen [9]. Da die Expression von TRB1 in den Makrophagen durch LPS herunterreguliert wurde, kann

man davon ausgehen, dass die gemessene Expressionszunahme von TRB1 im Fettgewebe vorwiegend auf die Fettzellen zurückzuführen ist (Abb. 2.10 A). Die aktivierten Makrophagen im Fettgewebe sezernieren eine Reihe an Zytokinen und Chemokinen, die wiederum die Fettzellen beeinflussen und dort eine Entzündungsreaktion sowie Insulinresistenz hervorrufen können [132]. Die Expressionsprofile der Tribbles-Gene in Adipozyten nach der Stimulation mit LPS-konditioniertem Makrophagenmedium, das proinflammatorische Faktoren enthält, zeigten, dass alle drei Gene durch Zytokine in unterschiedliche Richtungen reguliert werden. So wird TRB1 induziert, während TRB2 und TRB3 reprimiert werden. Der zeitliche Verlauf der Repression bzw. die Induktion der Genexpression ist für jedes der drei Gene einzigartig und lässt auf eine unabhängige Regulation schließen. Dies spiegelt die Daten von Sung *et al*. wieder, die zeigten, dass die drei Tribbles-Gene zelltypspezifisch und stimulusabhängig durch das proinflammatorische Moleküle IL-1β in Zelllinien der glatten Muskulatur und Endothelzellen reguliert werden [55].

LPS selbst hat keinen Einfluss auf die Expression von TRB1 und TRB3 in Adipozyten, denn die Stimulation von TLR4-ko-Zellen mit dem konditionierten Medium zeigte keine Veränderung der Induktion (Abb. 2.11 A, C). Im Gegensatz dazu kann die Inhibition der Expression von TRB2 im Fettgewebe nach LPS Stimulation durch das Fehlen des TLR4 aufgehoben werden. Eine Reduktion der Expression von TRB2 nach LPS-Stimulation wurde von Eder *et al*. in Monozyten beschrieben. Die Reduktion von TRB2 führte zu einer erhöhten Expression von IL-8 [68]. TRB2 inhibiert die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (Erk) und JNK indem es an die vorgeschalteten MAPKK-Komplexe MKK7 und MEK1 bindet. Durch die verminderte Expression von TRB2 wird diese Inhibition aufgehoben und das IL-8-Gen kann exprimiert werden. Es könnte daher interessant sein, zu untersuchen, ob die Funktion von TRB2 in Monozyten auch in Adipozyten nachweisbar ist und ob TRB2 so zur Entstehung einer Inflammation im Fettgewebe beiträgt. Einen Hinweis darauf könnten das Expressionsprofil der ob/ob-Mäuse und die Expression der mit konditioniertem Makrophagenmedium behandelten Adipozyten geben. Im Fettgewebe der ob/ob-Tiere wurde TRB2 im Vergleich zu den Wildtyptieren geringer exprimiert wurde und auch in den Adipozyten wurde die TRB2-Expression stark reduziert.

Makrophagen sezernieren nach der Aktivierung mit LPS eine große Anzahl verschiedener Zytokine und Chemokine. Durch die Hitzeinaktivierung des konditionierten Mediums verlor dieses seine aktivierende Wirkung auf die TRB1-Genexpression. Dies lässt auf einen hitzeinstabilen Faktor, vermutlich ein Protein, schließen, der für die Induktion der TRB1 Expression verantwortlich ist. Die Zytokine IL-6, IL-1 und TNF-α, die im Zusammenhang mit der subakuten chronischen Entzündungsreaktion im Fettgewebe einer Adipositas diskutiert werden [21] konnten auch in dem konditionierten Makrophagenmedium nachgewiesen werden. Neben ihrer proinflammatorischen Wirkung werden IL-1 und TNF-α auch als Initiatoren für die Induktion einer Insulinresistenz im Fettgewebe diskutiert [115, 116] und für IL-1 wurde eine aktivierende Wirkung auf die Genexpression von TRB1, TRB2 und TRB3 in glatten Muskelzellen der Aorta, (VSMC), in Endothelzellen (HUVEC) und in Monozyten (THP-1) beschrieben [55]. Diese aktivierende Wirkung von IL-1 und ein Effekt von TNF-α auf die Tribbles-Genexpression konnte für Adipozyten nicht nachgewiesen werden. Die Stimulation von TNF-R1/R2- und TNF-R1/IL-1R-Doppelknockout-Adipozyten mit dem konditionierten Medium führte zu keiner Inhibition der TRB1-Expression und auch die Induktion einer Sepsis mit LPS in TNF-R1/R2 Doppelknockout-Mäusen zeigte keine veränderte Expression von TRB1 im Fettgewebe. Die im Zusammenhang mit Adipositas beschriebenen Zytokine haben keinen Einfluss auf die Expression von TRB1. Viele weitere Moleküle oder auch die konzertierte Aktivierung durch mehrere Faktoren könnte für die TRB1-Genexpression in Frage kommen. Daher kann die Analyse der involvierten Signaltransduktionswege einen Hinweis auf die Regulation des TRB1-Gens geben.

Verschiedene Signaltransduktionswege werden durch proinflammatorische Zytokine aktiviert. Unter diesen nehmen der JNK-Signalweg und der NF-κB-Signalweg eine tragende Rolle ein. Beide werden durch Zytokine aktiviert und verstärken die Expression proinflammatorischer Gene. Die pharmakologische Inhibition der beiden Signaltransduktionswege, sowie die Analyse von Zellen, denen ein Schlüsselprotein der jeweiligen Signaltransduktionswege fehlte, JNK1 bzw. p50, zeigte, dass die Expression von TRB1 nach proinflammatorischer Stimulation vom JNK-Signalweg und vom Transkriptionsfaktor NF-κB abhängig ist. Während das Fehlen des JNK1-Proteins in den Adipozyten keinen Einfluss auf die verstärkte Expression von TRB1 hatte (Abb. 2.15), wurde die Expression durch den generellen Inhibitor SP600125 der auch die anderen JNK-Proteine, JNK2 und JNK3, blockiert um etwa 50% reduziert

(Abb. 2.16 A, B). Es könnte also sein, dass das Fehlen von JNK1 durch die anderen beiden JNK-Proteine kompensiert werden kann oder der Effekt auf die Transkription von TRB1 über die Aktivierung eines der anderen JNK-Proteine und weiterer Transkriptionsfaktoren verläuft [133].

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch proinflammatorische Signale aktiviert wird und daraufhin die Transkription von weiteren proinflammatorischen Genen steuert ist der NF-κB Komplex. Dieser NF-κB-Transkriptionsfaktor liegt als Dimer von p50 und p65 vor. Die Analyse der TRB1-Expression in p50-ko-Zellen zeigte eine reduzierte Induktion unter inflammatorischen Bedingungen (Abb. 2.17 A). Der aus dem Fiebergras (*Tanacetum parthenium (L.))* gewonnene NF-κB-Inhibitor Parthenolide verhindert die Aktivierung des Komplexes und so die NF-κB abhängige Genexpression [117, 134]. Parthenolide steuert die IKK an und/oder verhindert die Degradation von IκBα und IκBβ [135, 136]. Ein etwas anderer Wirkmechanismus wird von Rungeler et al. vorgeschlagen, die zeigten, dass Parthenolide p65 durch Alkylierung eines Cysteins inhibieren kann [137]. Die Behandlung der Adipozyten mit diesem Inhibitor und nachfolgender Stimulation mit CM führte zu einer vollkommenen Hemmung der Induktion der TRB1-Expression (Abb. 2.18 A, B). Somit ist die Expression des TRB1-Gens abhängig von dem Transkriptionsfaktor NF-κB. Interessanterweise konnte auch die insulinabhängige Regulation der TRB1-Expression durch Parthenolide inhibiert werden (Abb. 2.9 B). Insulin kann neben der Aktivierung der Glukoseaufnahme in die Zelle auch den NF-κB Transkriptionsfaktor aktivieren und hat somit Einfluss auf die Expression von proinflammatorischen Genen [111, 112]. Der Einfluss von NF-κB auf die Expression von TRB1 könnte auch erklären, weshalb die Inhibition von JNK nicht zu einer vollständigen Reduktion der Expression führte, da anscheinend beide Signaltransduktionswege an der Regulation der TRB1-Expression beteiligt sind. Die Inhibition von weiteren Proteinkinasen, die an der Transduktion von Stresssignalen beteiligt sind, wie p38 oder Erk sowie die Proteinkinasen PI-3K und PKA, hatte keinen Einfluss auf die TRB1-Expression unter inflammatorischen Bedingungen in Adipozyten (Abb. 2.19).

So wird die Regulation der TRB1-Expression unter proinflammatorischen Bedingungen wie auch durch Insulin über die Aktivierung von NF-κB (p50/p65) und des JNK-Signalwegs gesteuert.

3.2 TRB1 ist ein Koaktivator von p65 und ist an der Regulation von proinflammatorischen Genen beteiligt

Eine Verbindung zwischen der Aktivierung von NF-κB und einer Entzündungsreaktion wurde in vielen Krankheiten des Menschen und in Tiermodellen gezeigt [138]. Je nach Signal werden durch NF-κB verschiedene Gene aktiviert [138]. NF-κB bindet in der Promotorregion dieser Gene an κB-Elemente, die eine Konsensussequenz 5‘-GGRNN(WYYCC)-3‘ (R = Purin, N = beliebige Base, W = Adenin oder Thymin und Y = Pyrimidin) enthält [139]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die TRB1-Transkription nicht nur durch NF-κB aktiviert wird, sondern dass TRB1 auch ein neuer Koaktivator von p65 ist und die Expression von NF-κB regulierten Genen beeinflusst. Die Fähigkeit der Transaktivierung von p65 wird durch die Interaktion der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) mit kotranskriptionellen Regulatoren und der Transkriptionsmaschinerie vermittelt [140]. TRB1 interagiert direkt mit der TAD von p65 und durch die Bindung von TRB1 an p65 wurde TRB1 an die κB-Elemente in den Promotoren proinflammatorischer Gene rekrutiert. Der Knockdown von TRB1 in Adipozyten führte zu einer veränderten Transkriptionsrate von Genen, die unter anderem durch NF-κB reguliert werden. So hat der Knockdown von TRB1 in Adipozyten einen Einfluss auf die Expression von IL-6, IL-1β, IFN-β und TNF-α, aber keinen auf die Expression von IL-10, PAI-1 und CRP (Abb. 2.22; Abb. 2.23). Auch die Mengen an sezernierten Zytokinen wie IL-6 und TNF-α waren durch den Knockdown reduziert (Abb. 2.24). TRB1 wird also durch Entzündungsmediatoren verstärkt exprimiert und hat gleichzeitig einen Einfluss auf die Genexpression derselben indem es als Koaktivator von p65 agiert. TRB1 wurde bisher als Inhibitor des Transkriptionsfaktors AP-1 und als Interaktionspartner von MEK1 und MKK4 beschrieben, der die Aktivität der MAPKK reguliert [46, 53]. Der Einfluss von TRB1 auf die NF-κB abhängige Transkription in Adipozyten beschreibt eine weitere und neue Funktion der Pseudokinase in der Regulation der Genexpression. Der Einfluss von TRB1 auf die Transkription proinflammatorischer Gene zeigte sich auch unter unstimulierten Bedingungen in TRB1$^{+/-}$-Mäusen. Auch wenn die Werte statistisch nicht signifikant waren, so lässt sich doch eine ähnliche Tendenz in der Genexpression einiger Gene ausmachen, wie sie auch in primären Adipozyten, die die TRB1-shRNA exprimierten, zu finden war. So wurde TNF-α, IL-1β, IFN-β und auch PAI-1 in den TRB1$^{+/-}$-Tieren geringer exprimiert als in den Wt-Mäusen. Unter septischen Bedingungen hatte das Fehlen eines TRB1-Allels keinen

Effekt auf die Expression der proinflammatorischen Gene und die Expression von TRB1 war nicht signifikant geringer als in den LPS behandelten Wt-Tieren. So führt das Fehlen eines Allels von TRB1 zu keiner geringeren Zytokinexpression unter stark inflammatorsichen Bedingungen.

Einen Anhaltspunkt, dass TRB1 eine Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen könnte, zeigt eine Studie in *C. elegans*. Pujol *et al*. identifizierten die Kinase NIPI-3, die TRB1 in der Kinasedomäne sehr ähnelt. NIPI-3 wurde als neue Komponente der angeborenen Immunantwort identifiziert. Die Kinase wirkt in der Epidermis und kontrolliert die Expression von AMP- (antimicrobial peptide) Genen nach einer Infektion [141].

Mehrere Genomstudien haben gezeigt, dass ein SNP (single nucleotide polymorphism) in der Region vor dem TRB1-Gen einen Einfluss auf die Fettwerte im Blut hat [60, 61, 142]. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob TRB1 neben seiner Rolle in der Regulation von proinflammatorischen Genen auch einen Einfluss auf den Stoffwechsel hat, wurden verschiedene Gene, die eine Schlüsselrolle im Fett- und Glukosestoffwechsel spielen, in den TRB1-shRNA exprimierenden Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass der Knockdown von TRB1 zu einer erhöhten Expression der Phophoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), und der AcetylCoA-Carboxylase (ACC1) führte. PEPCK ist ein Schlüsselenzym in Adipozyten für die *de novo* Synthese von Glyzerol-3-Phosphat aus Pyruvat, Laktat oder bestimmten Aminosäuren, wie z.B. Alanin. Glyzerol-3-Phophat ist notwendig für die Rückveresterung von Fettsäuren während Hungerperioden [143]. ACC1 katalysiert die Synthese von MalonylCoA, das Substrat für die Fettsäuresynthese [144] und wird in Hungerperioden herunterreguliert [145], wobei TRB3 eine Rolle spielt [88]. Welchen direkten Einfluss TRB1 auf die Regulation der Expression dieser beiden Gene hat und welchen Einfluss das wiederum auf den Metabolismus hat, bleibt zu untersuchen, doch zeigten auch die TRB1$^{+/-}$-Mäuse eine ähnliche Tendenz der Regulation von PEPCK und ACC1 im Fettgewebe. Da TRB1 in adipösen Mäusen verstärkt exprimiert wird, lässt sich spekulieren, dass dadurch die Expression von PEPCK in Fettzellen inhibiert wird und eine Veresterung der Fettsäuren nicht stattfindet. TRB1 könnte so zu erhöhten Blutfettwerten beitragen. Die durch den Knockdown von TRB1 beobachtete erhöhte Expression des an der

Fettsäuresynthese beteiligten Enzyms ACC1 könnte für eine Beteiligung von TRB1 in der Regulation der Fettsäuresynthese sprechen.

Das Fehlen eines TRB1-Allels hatte keinen Einfluss auf den Körperfettgehalt und die Serumwerte von Cholesterin, freien Fettsäuren und Triglyzeriden (Abb. 2. 30 C, D, E) in TRB1$^{+/-}$-Mäusen. Die beschriebenen Assoziationen der SNPs vor dem TRB1-Gen mit erhöhten Cholesterinwerten [61] und polygener Dyslipidämie [142] und das damit verbundene erhöhte Risiko kardiovaskulärer Herzerkrankungen [61] spricht für eine „gain of function“ Mutation, ausgehend davon, dass die TRB1 heterozygoten Knockout-Tiere keine veränderten Blutfettwerte zeigen. Die Analyse von TRB1$^{-/-}$-Mäusen, bzw die transgene Überexpression von TRB1 könnte helfen, den Einfluss von TRB1 auf die Blutfettwerte zu entschlüsseln. Neben den Blutfettwerten spielt auch die schwindende Insulinsensitivität der Gewebe eine große Rolle in der Entstehung des metabolischen Syndroms. Doch scheint TRB1 keinen Einfluss auf den Blutglukosespiegel im nüchternen Zustand zu haben und auch unter septischen Bedingungen verändert sich der Blutglukosespiegel der TRB1$^{+/-}$-Tiere genauso wie in den Wildtypmäusen.

Auch die Expression von Adipokinen wird durch den Knockdown von TRB1 beeinflusst. Die Adipokine Adiponectin, Leptin und Resistin werden primär von weißen Fettzellen sezerniert. Adipozyten, die die TRB1 spezifische shRNA exprimieren, sezernieren mehr Resistin und Leptin, wohingegen die Reduktion von TRB1 keinen Einfluss auf die Menge an sezerniertem Adiponectin hatte. Während die 3T3-L1 Adipozyten auch schon basal etwa zehnmal mehr Adipokine sezernierten als die primären Zellen, war, wahrscheinlich durch die geringere Knockdoneffizienz, kein positiver Effekt auf die Leptinmenge, aber dennoch auf die Resistinmenge zu erkennen (Abb. 2.24). Die Serumkonzentration von Adiponectin korreliert negativ mit der Menge an viszeralem Fettgewebe. Es hat einen antiinflammatorischen Effekt und beeinflusst die Insulinsensitivität und den Glukosestoffwechsel günstig [146]. Die Funktion von Resistin und dessen Einfluss auf die Glukosehomöostase und Insulinresistenz werden noch kontrovers diskutiert. Die Expression von Resistin wird durch Hungern inhibiert und durch Nahrungsaufnahme aktiviert, dennoch ergeben verschiedene Studien an Mäusen (db/db, ob/ob) gegenteilige Informationen über die Serumwerte von Resistin [147]. Resistin hat proinflammatorischen Eigenschaften und könnte eine Funktion im Entzündungsprozess ausüben [148]. Ob die Expression von

Resistin durch proinflammatorische Moleküle nun inhibiert oder aktiviert wird ist noch unklar, da gegenteilige Beobachtungen noch kein schlüssiges Bild liefern [149, 150]. Neben einer Rolle im Metabolismus und Inflammationsreaktionen inhibiert Resistin auch die Adipogenese [151]. So bleibt die Funktion der Resistinexpression unter der Kontrolle von TRB1 zu untersuchen. Die Produktion von Leptin wird unter anderem auch durch Zytokine aktiviert [152]. Es steuert das Sättigungsgefühl im Gehirn und ein Mangel an Leptin führt durch unkontrollierte Nahrungsaufnahme zu Adipositas in Mäusen (ob/ob) sowie auch beim Menschen [144]. Leptin hat einen positiven Effekt auf die Serumglukosewerte. Es verbessert die Insulinsensitivität in der Muskulatur und der Leber und es inhibiert die Insulinausschüttung der Betazellen [153-155]. Um festzustellen ob das Fehlen eines TRB1-Allels einen Einfluss auf den Adipokinspiegel hat, müsste dieser im Serum der TRB1$^{+/-}$-Mäuse bestimmt werden. Davon ausgehend wäre es auch interessant zu sehen, ob die Überexpression von TRB1 zu einer Reduktion der Leptin- und Resistinsekretion führt und somit TRB1 neben dem regulatorischen Einfluss auf die NF-κB abhängige Transkription auch einen Einfluss auf die Expression und/oder Sekretion von Adipokinen hat und so eine Rolle im Stoffwechsel ausübt.

Um eine genauere Aussage über den Einfluss von TRB1 auf die Genexpression sowie auf den Metabolismus unter septischen Bedingungen machen zu können, wäre es interessant, TRB1-Knockoutmäuse zu analysieren oder aber auch eine kürzere LPS-Stimulation zu wählen. Denn nach 8 h ist die stärkste Expression von Zytokinen schon vorbei (J. Tuckermann, persönliche Mitteilung) und Sekundäreffekte dieser Zytokine könnten den TRB1-Effekt auf die Genexpression überdecken.

3.3 Ausblick

Der Einfluss von TRB1 auf die Expression von proinflammatorischen Genen sowie auf Gene, die am Stoffwechsel beteiligt sind, lässt auf eine Rolle der Pseudokinase in der NF-κB abhängigen Genregulation schließen. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob TRB1 auch an die anderen Untereinheiten von NF-κB wie RelB oder c-Rel binden kann. Desweiteren wäre es interessant die Region des TRB1-Proteins zu bestimmen, die mit p65 interagiert und inwieweit die Bindung von TRB1 an p65 die biochemischen Eigenschaften von p65 verändert, da bisher keine Funktion für die

Pseudokinasedomäne bekannt ist. NF-κB ist daneben auch an der Regulation der Apoptose beteiligt. Je nach Zelltyp und Stimulus hat es einen pro- oder antiapoptotischen Einfluss [156, 157]. Die Aufklärung des Einflusses von TRB1 auf die Expression von pro- oder antiapoptotischen Genen und das damit verbundene Zellschicksal könnte einen weiteren Mechanismus der durch TRB1 regulierten NF-κB abhängigen Transkription aufzeigen. Desweiteren wäre es aufschlussreich die Rolle der TRB2-Regulation im Fettgewebe und deren Einfluss auf die TRB1-Regulation zu untersuchen, da die verringerte Expression von TRB2 der erhöhten Expression von TRB1 in den Expressionsanalysen der Adipozyten vorrausging.

Neben der Interaktion zwischen TRB1 und p65 und dem gezeigten Einfluss derselben auf die NF-κB abhängigen Transkription wäre es auch interessant zu untersuchen, ob TRB1 in einem autoregulatorischen Kreislauf die eigene Genexpression über NF-κB steuert und über welches NF-κB-Dimer dies geschieht. In diesem Zusammenhang würde auch eine Analyse der TRB1-Promotorregion eventuell nähere Hinweise auf weitere Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der TRB1-Expression im Fettgewebe beteiligt sind, geben.

Alle gezeigten Daten bezogen sich bisher auf die Funktion und die Expression von TRB1 im Fettgewebe. Eine Analyse des gefundenen Mechanismus in anderen Geweben könnte aufzeigen, ob der Effekt spezifisch für Fettzellen ist, oder ob er auch in anderen Geweben auftritt, da TRB1 in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Mal eine Funktion von TRB1 in der Genregulation im Fettgewebe beschrieben. Das sich daraus ableitende Modell stellt die Pseudokinase TRB1 in den Kontext der Inflammation. Seine Expression wird durch proinflammatorische Signale reguliert und TRB1 ist wiederum selbst an der Transkriptionsregulation von NF-κB abhängigen Genen beteiligt, indem es als Koaktivator von p65 agiert (Abb. 3.1).

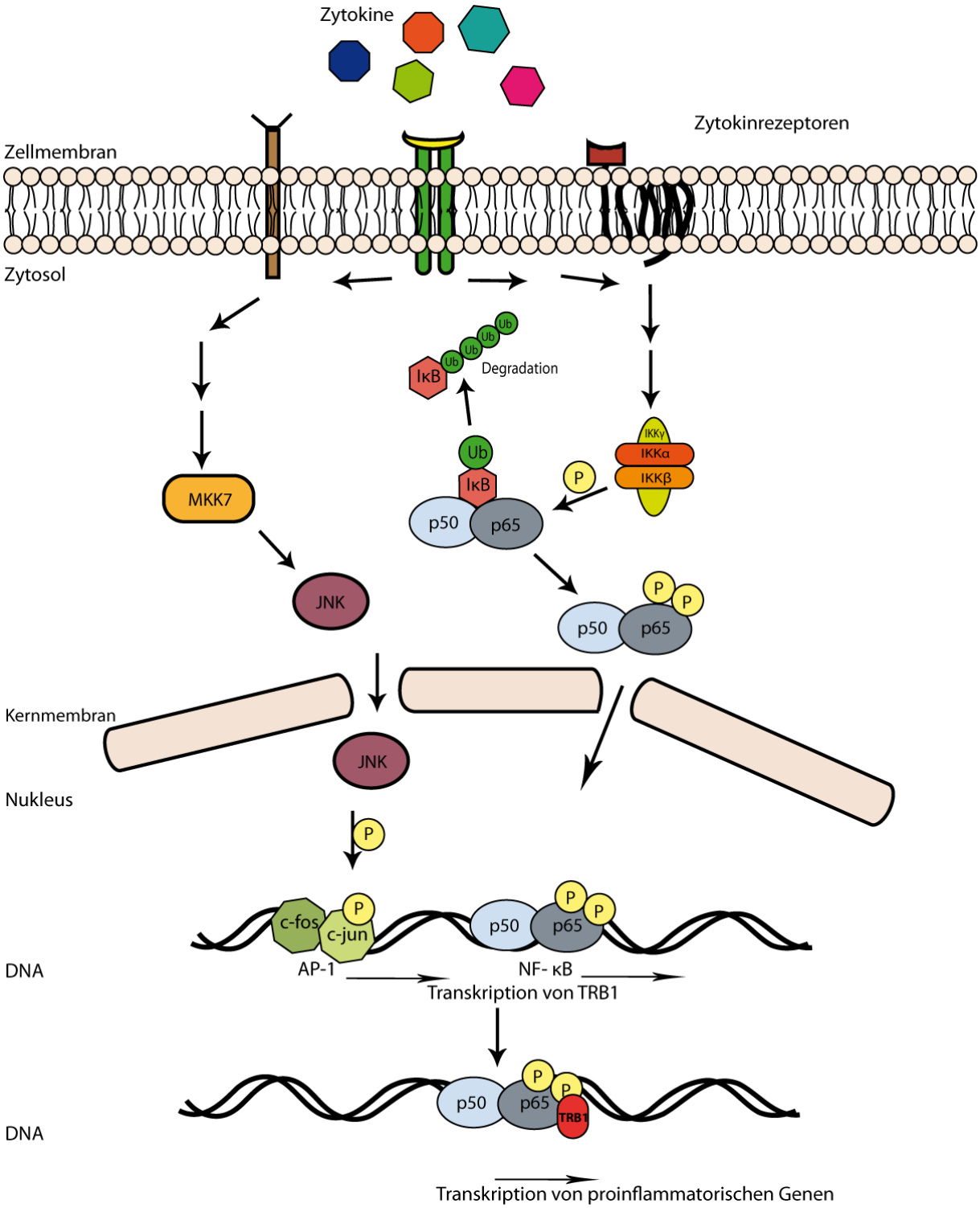


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Regulation der TRB1 Expression und dessen Einfluss auf die NF-κB abhängige Transkription. Durch Zytokine wird die JNK abhängige und NF-κB abhängige Transkription aktiviert und TRB1 wird exprimiert. TRB1 bindet an p65 und koaktiviert dadurch die Transkription von NF-κB abhängigen Genen.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente können durch die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Als Vorlage dienten entweder cDNA oder Plasmide, die die gewünschte DNA-Sequenz enthielten. Zur Amplifikation aus cDNA wurden 2 µl cDNA, 2 µg Plasmid DNA, 1 µl der jeweiligen Primer (10 mMol/l) (Tab. 4.1), 1 mM dNTPs (10 mMol/l), der geeignete Polymerasepuffer und 2 U der DNA-Polymerase (Pfu-Polymerase, Stratagene, oder Phusion-Polymerase, Finnzymes) eingesetzt. Die Reaktion verlief nach folgendem Schema im PCR-Block (PTC-200; MJ-Research):

Schritt 1:	Denaturierung	95°C – 5 min
Schritt 2:	Denaturierung	95°C – 30 sec
Schritt 3:	Annealing	Annealing-Temperatur – 30 sec
Schritt 4:	Elongation	72°C – 3 min
Schritt 5:		Schritt 2-4 - 30x
Schritt 6:	Elongation	72°C – 10 min

Die Annealing-Temperatur wurde für jedes Primerpaar anhand ihrer Länge und des G/C Gehalts berechnet. T_a = 69°C + 0,41 (% G/C) – 650/ bp Primer

Tab. 4.1 Primer und Zielvektoren

Name	Zielvektor	Sequenz	Annealing-Temperatur
TRB1a NotI_ for	pTarget	AATAATGCGGCCGCGGTCGGTCCCGTGCGTTTTG	71°C
TRB1a NotI_ rev	pTarget	AAGAATGCGGCCGCTCCAGAGCCGGCTTCACAGATAGG	
TRB2c_NotI_ for	pTarget	AAGAATGCGGCCGCCGGCGCGGCTCATCCATCTCT	71°C
TRB2c_NotI_ rev	pTarget	AAGAATGCGGCCGCCTGAACCCAACCCCCATCCCACAC	
TRB1_NotI_for	pcDNA3.1-Flag	ATTTGCGGCCGC	66°C
TRB1_XbaI_ rev	pcDNA3.1-Flag	ATTTTCTAGACTAGCAGAAGAAGGAACTTATGTCACTGTC	
TRB1-NcoI for	pET21d	CATGCCATGGCGCGGGTCGGTCCCGT	54°C
TRB1-HindIII_ rev	pET21d	CATGAAGCTTGCAGAAGAAGGAACTTATGTCACT	

4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können anhand ihrer Größe über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dazu wurden die DNA Proben mit 1x OrangeG (70% Glyzerin, 10 mMol/l EDTA, OrangeG) versetzt und über ein 1%iges (w/v) Agarosegel in 1x TBE-Puffer (10x TBE: 0,45 Mol/l Trizma Base, 0,45 Mol/l Borsäure, 10 mMol/l EDTA, pH 7,6), das mit 1 µl Ethidiumbromid (Stock 10 mg/ml) pro 100 ml Agarosegel versetzt wurde, bei einer Spannung von 80 V und konstanter Stromstärke aufgetrennt. Die DNA Banden wurden durch UV-Licht (254 nm) detektiert und dokumentiert (Quantity One Gel Device, Biorad). Sollten die DNA Fragmente für weitere Verfahren verwendet werden, wurden sie bei 230 nm detektiert, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mittels Gelextraktion (s. 4.1.3) herausgelöst.

4.1.3. DNA-Gelextraktion

DNA Fragmente wurden unter Verwendung des QIAquick Gelextraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert. Die isolierte DNA wurde in 50 µl H_2O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.1.4 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von Plasmiden und DNA-Fragmenten wurden die Proben mit 10-20 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (Tab. 4.2) und Puffern versetzt und 2-4 h bei 37°C verdaut. Je nach Restriktionsenzym wurde die Reaktion hitzeinaktiviert. Die geschnittenen Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und extrahiert.

Tab.4.2 Restriktionsenzyme und Puffer (New England Biolabs, NEB)

Restriktionsenzym	Puffer	Hitzeinaktivierung
EcoRI	NEBU	65°C 20 min
HindIII	NEB2	65°C 20 min
NcoI	NEB3	65°C 20 min
NotI	NEB3	65°C 20 min
PacI	NEB1, BSA	65°C 20 min
PstI	NEB3, BSA	80°C 20 min
XbaI	NEB2, BSA	65°C 20 min
XhoI	NEB2, BSA	65°C 20 min

4.1.4.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von geschnittenen Plasmidvektoren und PCR-Produkten wurde der Vektor mit 10 U CIP (Calf intestine Phosphatase, NEB) für 60 min bei 37°C dephosphoryliert, Vektor und PCR-Produkt (Insert) im molekularen Verhältnis 3:1 gemischt und unter Verwendung von 1 U der T4-Ligase (NEB) oder Quickligase (NEB) und den entsprechenden Puffern über Nacht bei Raumtemperatur (T4-Ligase) oder 1 h bei 25°C (Quickligase) ligiert.

Die Berechnung der zu verwendenden Mengen an Vektor und Insert erfolgte nach folgender Formel: ng Insert = (100 ng Vektor x bp Insert / bp Vektor) x 3

4.1.5 Transformation von Bakterien

Zur Amplifikation der klonierten Plasmide wurden die Ligationsprodukte in kompetente Bakterien transformiert.

4.1.5.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurden 2-5 µl Ligationsprodukt zu den Bakterien (One Shot® TOP10 (Invitrogen), XL-1 Blue Subcloning grade competent cells (Stratagene), Rosetta2<DE3>pLysS (Novagen)) gegeben und nach Herstellerangaben transformiert. 100-200 µl der transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin (50 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Spectinomycin (30 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml)) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.1.5.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente XL-1-Blue Bakterien wurden mit 1-3 µl Ligationsprodukt oder 1 µg Plasmid-DNA transformiert, indem 100 µl Bakterien mit der DNA gemischt wurden. Die Bakterien wurden zusammen mit der DNA in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und durch das Anlegen einer Spannung von 2,5 kV, 25 µF und einem Widerstand von 400 Ω elektroporiert. Die Bakterien wurden mit 500 µl LB-Medium versetzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37°C und 300 rpm geschüttelt und anschließend 50-100 µl auf LB Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

4.1.6 Plasmid-DNA Minipräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einem Klon von einer LB-Agarplatte angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 170 rpm inkubiert

4.1.6.1 QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H_2O eluiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.1.6.2 Plasmid-DNA Minipräparation

2 ml der Übernachtkultur wurden 3 min bei 8000 rpm pelletiert, der Überstand abgekippt und das Pellet im Rückfluss resuspendiert. Zu dem resuspendierten Pellet wurden 300 µl TENS (1x TE, pH 8, 0,1 Mol/l NaOH, 0,5% SDS) gegeben, kurz gevortext und mit 150 µl 3 Mol/l NaAc/HAc, pH 5,2 versetzt, gevortext und 2 min bei 13000 rpm, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl eiskaltem absolutem Ethanol gemischt. Das Gemisch wurde wieder 2 min bei 13000 rpm, RT, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen des Pellets wurden 200 µl eiskalter 70%iger Ethanol dazugegeben, 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 5-10 min bei 37°C getrocknet und in 20 µl P1 Puffer (5 mMol/l Tris pH 8, 1 mMol/l EDTA, 0,001% RNase A; Qiagen) für 10 min bei 37°C gelöst.

4.1.7 Plasmid-DNA Maxipräparation

Für die Präparation von größeren Plasmidmengen wurden 200 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einem Klon einer LB-Agarplatte angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Für die Isolation wurde das PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Maxiprep Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 200 µl H_2O resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

4.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde bei 260 nm per NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) gemessen.

4.1.9 Sequenzierung

Zur Bestimmung der klonierten DNA-Sequenz wurden 800 ng Plasmid-DNA sequenziert (Agowa, Berlin).

Tab.4.3 Plasmide und verwendete Sequenzierungsprimer

Plasmid	Sequenzierprimer
pcDNA3_C8FW (TRB1)	T7 for; SP6 rev (AGOWA)
pcDNA3_TRB2	T7 for, SP6 rev (AGOWA)
pcDNA3_mFINR (TRB3)	T7 for, SP6 rev (AGOWA)
pcDNA™6.2GW/EmGFP-mir	EmGFP for
pTarget-TRB1, pTarget-TRB2	Geneerase for
pcDNA3.1-Flag-TRB1	T7 for; SP6 rev (AGOWA)
pAd	pAd_LRRekomb_for; pAd_LR_Rekomb-rev (AGOWA)

4.1.10 RNA-Isolation mit Qiazol

Phenol-Guanidinthiozyanat kann zur Isolation von RNA aus Gewebe oder Zellen verwendet werden.

4.1.10.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Zur Isolation von RNA wurden 50-90 mg Gewebe (Leber, Fett, Muskel) in 1 ml QIAzol (Qiagen) mechanisch mit einer Metallkugel in einem 2 ml Reaktionsgefäß im Tissue Lyser (Qiagen) bei 30 Hz für 3 min homogenisiert. Das Lysat wurde für 5 min bei RT inkubiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fettlysate wurden bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Lysat unterhalb der Fettschicht in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden mit 200 µl Chloroform versetzt, 20 s geschüttelt und 2 min bei RT inkubiert bis sich zwei Phasen ausgebildet hatten. Die Proben wurden 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die oberste wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gut vermischt. Für die RNA-Fällung wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert und die RNA 10 min bei 13000 rpm, 4°C präzipitiert. Der Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 5 min bei

8000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde gut getrocknet und in 30 µl RNase freiem H_2O für 10 min bei 55°C gelöst.

4.1.10.2 RNA-Isolation aus Zellen

4.1.10.2.1 mit QIAzol

Die im 12- oder 6-Well Format kultivierten und stimulierten Zellen wurden in 1 ml QIAzol lysiert und die RNA wurde wie unter 4.1.10.1 beschrieben isoliert.

4.1.10.2.2 mit dem RNeasy® Micro Kit

Für die Isolation von RNA aus differenzierten primären Adipozyten wurden die Zellen in 1 ml QIAzol lysiert, mit 200 µl Chloroform versetzt, 2 min bei RT inkubiert und für 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die oberste wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl 70%igem Ethanol versetzt. Die weitere Isolation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNeasy® Micro Kit (QIAgen) mit DNAse Verdau.

4.1.11 Überprüfung der RNA-Qualität und -Quantität

Die Qualität der RNA wurde über die Auftrennung der RNA in einem 1%igen Agarosegel überprüft. Dazu wurde 1 µl RNA mit 10 µl RNA-Probenpuffer (0,5 µl 10x MOPS (0,2 Mol/l MOPS, 0,05 Mol/l Na-Acetat, 0,01 Mol/l EDTA); 0,5 µl 1 mg/ml Ethidiumbromid, 1,7 µl 6x Ladepuffer, 5 µl Formamid, 1,75 µl Formaldehyd, 0,55 µl H_2O) versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert und in einem 1%igen Agarosegel für 20-30 min bei 80 V und konstanter Stromstärke aufgetrennt. Die RNA wurde bei 280 nm detektiert (Biorad). Die Qualität der RNA wurde anhand des Mengenverhältnisses der 28 S ribosomalen RNA (rRNA) und 18 S rRNA bestimmt. Ein Verhältnis von 2:1 dieser beiden rRNAs lässt auf intakte RNA schließen.

Für die Quantifizierung wurden 1,5 µl der RNA mit dem Nano-Drop (ND1000 Spectrophotometer) vermessen. Ein Verhältnis der Messung bei 260 nm und 230 nm zwischen 1,8 und 2,2 wurde als gute RNA-Qualität bewertet.

4.1.12 cDNA-Synthese

4.1.12.1 First Strand cDNA Synthesis Kit

Für die Synthese von cDNA wurden 500-1500 ng RNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung des First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas) mit dem Oligo$(dT)_{18}$-Primer. Die cDNA wurde 1:10 auf 200 µl mit H_2O verdünnt.

4.1.12.2 Superscript® II

Für die cDNA Synthese von RNA aus primären Adipozyten wurde die Superscript® II Reverse Transkriptase (Invitrogen) und der Oligo(dT)-Primer (Invitrogen), sowie dNTPs (10 mMol/l) (Fermentas) verwendet. Die Synthese erfolgte nach Herstellerangaben. Die erhaltene cDNA wurde 1:10 auf 200 µl mit H_2O verdünnt

4.1.13 Quantitative Real time PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die cDNA in einer quantitativen Real Time PCR (qPCR) vermessen. Pro Probe wurden 10 µl qPCR Mix (TaqMan® gene expression Master Mix, Applied Biosystems, oder Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, Invitrogen), 1µl der Sonde (Gene expression Assay, Applied Biosystems, Tab. 4.4), 4 µl H_2O und 5 µl cDNA eingesetzt. Die Proben wurden im AbiPrism 7300 (Applied Biosystems) vermessen und die Daten mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode ausgewertet [158].

Tab. 4.4: qPCR Sonden

Sonde	Name (englisch)	Nummer Applied Biosystems
Trib1	Tribbles 1	Mm00454875_m
Trib2	Tribbles 2	Mm00454876_m1
Trib3	Tribbles 3	Mm00454879_m1
TBP	Tata-Box Binding Protein	Mm00446973_m1
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
MCP-1	Macrophage colony stimulating Factor	Mm00441242m1
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha	Mm 00443258_m1
IL-1β	Interleukin 1 beta	Mm00434228_m1
IL-4	Interleukin 4	Mm00445259_m1
IL-13	Interleukin 13	Mm99999190_m1
IFN-β	Interferon beta	Mm00439546_s1

ACC1	Acetyl-Coenzym-A Carboxykinase 1	Mm01304279_m1
ACC2	Acetyl-Coenzym-A Carboxykinase 2	Mm01204683_m1
PEPCK	Phosphoenol pyruvat carboxy kinase	Mm00440636_m1
Glut4	Glucose transporter 4	Mm00436615_m1
FAS	Fatty acid synthase	Mm00662319_m1
FABP4	Fatty acid binding Protein 4	Mm00445880_m1
CRP	C-reactive protein	Mm00432680_g1

4.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

Die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 10% DMSO) in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

4.2.1 Zelllinien und Differenzierung

4.2.1.1 HEK 293, HEK 293A, HEK 293FT, HEK 293T

Human embryonic Kidney (HEK) 293 Zellen wurden in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert. Die Zellen wurden alle vier Tage 1:10 passagiert.

HEK 293A Zellen wurden in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% nichtessentieller Aminosäuren (NAA) und 1% Pen/Strep kultiviert. Die Zellen wurden alle vier Tage 1:10 passagiert.

HEK 293FT; HEK 293T Zellen wurden in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Pen/Strep kultiviert. Die Zellen wurden alle vier Tage 1:10 passagiert.

4.2.1.2 Raw264.7

Die murine Makrophagenzelllinie Raw264.7 wurde in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Pen/Strep kultiviert und alle vier Tage 1:20-1:40 passagiert.

4.2.1.2.1 Herstellung von konditioniertem Makrophagenmedium

Zur Gewinnung von konditioniertem Makrophagenmedium wurden $3x10^6$ Zellen auf eine 15 cm Platte ausgesät, nach drei Tagen wurden die Zellen mit DMEM mit 10%

hitzeinaktiviertem FCS und 1% Pen/Strep und 100 ng/ml LPS versetzt und für 3,5 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde gesammelt, durch einen 45 µm Filter filtriert, und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.2.1.3 3T3-L1

3T3-L1 Fibroblasten können in weiße Adipozyten differenziert werden und dienen als Zellkulturmodell von Fettzellen.

4.2.1.3.1 Kultivierung

3T3-L1 Fibroblasten wurden stark subkonfluent (< 80%) gehalten. Dazu wurden $3x10^4$ Zellen in eine 15 cm Zellkulturschale ausgesät und alle vier Tage passagiert. Als Kulturmedium diente DMEM (1 g/L Glukose) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Pen/Strep.

4.2.1.3.2 Differenzierung

Für die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Adipozyten wurden $2,2x10^4$ Zellen pro Vertiefung in einer 6-Wellplatte ausgesät und bis zur Konfluenz vier Tage lang wachsen gelassen. Die Differenzierung wurde durch die Zugabe von Differenzierungsmedium (DMEM (4,5 g/L Glukose), 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Pen/Strep, 250 µMol/l 3-Isobuthyl-1-methylxanthin (IBMX), 1 µg/ml Insulin, 2,5 µMol/l Dexamethason, 2,5 µMol/l Rosiglitazon und 1:1000 einer Mischung von Ascorbinsäure, d-Pantothensäure und d-Biotin (ABP, 50 mg/ml L-Ascorbat, 1 mMol/l d-Biotin, 17 mMol/l Pantothenat)) induziert. Dieses Medium wurde nach zwei Tagen durch frisches ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurde das Medium durch DMEM (4,5 g/L Glucose), 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Pen/Strep, 1 µg/ml Insulin und ABP ausgetauscht. Sieben Tage nach Beginn der Differenzierung wurden die differenzierten Zellen in Kulturmedium gehalten und 10-12 Tage nach Beginn der Differenzierung für Experimente verwendet.

4.2.1.3.3 Öl-Rot-O Färbung

Die Fettakkumulation in Adipozyten kann durch die Färbung der Lipide mit Öl-Rot-O sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Adipozyten mit PBS gewaschen und in 10% Formalin für 1h bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 60% Isopropanol gewaschen und getrocknet. Die Färbung erfolgte durch Zugabe der Öl-Rot-O Lösung

(6 Teile Öl-Rot-O Stock (0,7 g Öl-Rot-O in 200 ml Isopropanol) und 4 Teile H_2O) für 10 min bei RT. Die überschüssige Färbelösung wurde mit Wasser weggespült und die gefärbten Zellen wurden fotografiert.

4.2.2 Gewinnung und Differenzierung primärer Mausadipozyten

Die Verifizierung der mit den 3T3-L1 Adipozyten erhaltenen Ergebnisse, sollte in primären Adipozyten geschehen. Dafür wurden die inguinalen Fettdepots der männlicher Mäuse präpariert und die stromale-vaskuläre Zellfraktion (SVF) in Kultur genommen und zu Fettzellen differenziert.

4.2.2.1 Präparation

Die 8-10 Wochen alten männlichen Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und der Bauchraum eröffnet. Die inguinalen Fettgewebe wurden freipräpariert und in 1x-D-PBS gewaschen. Bei den inguinalen Fettdepots wurden die Lymphknoten entfernt und die Gewebe fein mit der Schere zerkleinert. 1 g Gewebe wurde in 7 ml Kollagenaselösung (1,5 mg/ml Typ II Kollagenase, 0,5% BSA in DMEM (4,5 g/l Glukose), pH ~7,5) bei 37°C und 150 rpm für 45 min verdaut. Zum Abstoppen der Reaktion wurden ca. 6 ml Wachstumsmedium (DMEM (4,5 g/L Glukose) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Pen/Strep) zugegeben. Die Zellsuspension wurde 5-10 min bei RT stehen gelassen und die obenauf schwimmende Adipozytenfraktion wurde abgenommen. Die restlichen Zellen, die stromale vaskuläre Fraktion, wurden bei 1000 rpm, RT, 10 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Mikrosieb filtriert und die Zellen auf 12-Wellplatten in Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Wachstumsmedium versorgt. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt bis die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten.

4.2.2.2 Differenzierung

Die konfluenten Präadipozyten wurden durch Induktionsmedium (DMEM (4,5 g/L Glukose), 5% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Pen/Strep, 0,5 mMol/l IBMX, 1µg/ml Insulin, 0,25 µMol/l Dexamethason, 2,5 µMol/l Rosiglitazon, ABP 1:1000, 3 nMol/l Triiodothyronin (T3)) zur Differenzierung angeregt. Das Induktionsmedium wurde für 4-6 Tage auf die Zellen gegeben. Danach wurde das Medium durch

Erhaltungsmedium (DMEM, 5% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Pen/Strep, 1 µg/ml Insulin, 2,5 µMol/l Rosiglitazon, ABP 1:1000, 1 nMol/l T3) für zwei Tage ersetzt. Die zu Adipozyten differenzierten Zellen wurden bis zur Verwendung an Tag 10-12 nach Beginn der Differenzierung in Wachstumsmedium gehalten.

4.3 Zellbasierte Assays

4.3.1 Transfektion

4.3.1.1 Transfektion mit Kalziumphosphat

Für die Transfektion von HEK 293 Zellen mittels Kalziumphosphat wurden $5x10^4$ Zellen pro Well einer 24-Wellplatte 18 h vor der Transfektion ausgesät. 0,5-1 µg DNA wurden mit 20 µl 0,25 Mol/l $CaCl_2$ und 20 µl 2x BBS (280 mMol/l NaCl, 50 mMol/l BES, 1,5 mMol/l NaH_2PO_4, pH 6,95) gemischt, 15 min bei RT inkubiert und auf die Zellen gegeben. Nach 5-6 h wurde das Medium durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt.

4.3.1.2 Transfektion mit Lipofectamine

3T3-L1 Fibroblasten können mit Lipofectamine transfiziert werden. Dafür wurden $8x10^4$ Zellen pro Vertiefung auf eine 12-Wellplatte ca 17 h vor der Transfektion ausgesät. Pro Well wurden 1 µg DNA transfiziert. Die DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 12,5 µl OptiMEM vorgelegt und mit 7,5 µg Lipofectamin (2 mg/ml Stock) in 12,5 µl OptiMEM gemischt. Für die Bildung der Lipofectamine-DNA-Komplexe wurde die Mischung 30 min bei RT inkubiert. Zu den gebildeten Komplexen wurden 25 µl OptiMEM gegeben. Das Medium der Zellen wurde durch 350 µl/well DMEM/OptiMEM im Verhältnis 1:1 ersetzt und 50 µl der DNA-Lipofectaminekomplexe dazugegeben. Nach 4-5 h wurde das Medium durch das Kultivierungsmedium ersetzt. Die Promotoraktivität wurde nach 48 h durch den Luziferaseassay ermittelt.

4.3.2 Luziferase Assay

Für die Analyse der klonierten miRNA und shRNAs wurde das GeneErase™ Luciferase Suppression System (Stratagene) genutzt. Dabei wird die Sequenz des Zielgens vor ein Luziferasegen kloniert. Die Aktivität der RNA-Interferenz kann durch

die Koexpression von shRNA/miRNA und des Luziferasereporters in HEK 293 Zellen über die Luziferin-Luziferasereaktion gemessen werden.

Um die Aktiviering von Promotoren zu messen, wird die Sequenz des Promotors vor ein Luziferasereportergen kloniert. Durch die Messung der Emmission der Luziferin-Luziferasereaktion des dem Promotor nachgeschalteten Luziferasegens kann die Aktivität des Promotors bestimmt werden.

4.3.2.1 Ernte der transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 150 µl Erntepuffer (Glycyl-Glycinpuffer (25 mMol/l Gly-Gly, 15 mMol/l $MgSO_4$, 4 mMol/l EGTA, pH 7,8), 1% Triton X-100, 1 µMol/l DTT) lysiert. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und je nach Zelltyp 10 sec sonifiziert. Das Lysat wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

4.3.2.2 Lumineszenz-Messung

Die Menge an Luziferase und damit die Promotoraktivität, bzw. die Wirkung der miRNA oder shRNAs wurde über die Luziferin-Luziferasereaktion ermittelt. Dafür wurden 30 µl der Zelllysate mit 100 µl Assaypuffer (80% Gly-Glypuffer, 0,02 Mol/l K_3PO_4 pH 7,8, 1,6 mMol/l DTT, 2 mMol/l ATP) versetzt. Die Lichtmission der Luziferin-Luziferase Reaktion wurde bei 562 nm gemessen (Mithras Multilabel Reader, Berthold). Dabei wurden die Proben mit luziferinenthaltendem Luziferasepuffer (Gly-Glypuffer, 0,1 Mol/l Luziferin (1 mMol/l Luziferinstocklösung (5 mg Luziferin in 15,7 ml Gly-Glypuffer, 2 mMol/l DTT)) versetzt und die entstehende Lichtemission gemessen.

4.3.2.3 β-Galaktosidase-Messung

Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die Aktivität des Reporterenzyms β-Galaktosidase gemessen. 50 µl Zelllysat wurden mit 50 µl ONPG-Puffer (0,1 Mol/l NaP, 1 mMol/l $MgCl_2$, 10 mMol/l KCl, 1mg/ml ONPG, 13,5 µl/ 5 ml 14,4 Mol/l β- Mercaptoethanol) versetzt, bei 37°C bis zur Gelbfärbung inkubiert und die Absorption bei 405 nm gemessen (Mithras Multilabel Reader, Berthold).

Für die Auswertung wurden die Luziferasewerte mit den β-Galaktosidasewerten verrechnet und die relativen Luziferasewerte ermittelt.

4.3.3 Stimulation von Adipozyten

4.3.3.1 mit Insulin

3T3-L1 Adipozyten wurden über Nacht in serumfreiem DMEM (1g/L Glukose) kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 nMol/l Insulin in serumfreiem DMEM (1g/L Glukose) stimuliert und nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h geerntet.

4.3.3.2 mit konditioniertem Makrophagenmedium

Für die Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten mit konditioniertem Makrophagenmedium wurden die Adipozyten über Nacht in frischem Differenzierungsmedium inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen werden mit dem LPS-konditionierten (CM) und dem ohne LPS konditionierten Makrophagenmedium (M) stimuliert. Nach 3 h, 6 h und 24 h wurde das Medium entfernt, die Zellen in QIAzol lysiert und die RNA isoliert (s. 4.2.10.2.1)

4.3.3.3 mit proinflammatorischen Zytokinen

Die proinflammatorischen Zytokine und Stimulantien wurden nach Herstellerangaben gelöst und in 3T3-L1 Differenzierungsmedium verdünnt (Tab. 4.5). Die Zellen wurden für 3 h, 6 h und 24 h mit den Zytokinen stimuliert, in Qiazol lysiert und die RNA isoliert.

Tab. 4.5 Zytokine und proinflammatorische Stimulantien

Zytokin	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
LPS (Lipopolysaccharid)	100 ng/ml	Sigma
TNF-α (Tumor Nekrosefaktor alpha)	1,5 ng/ml	Biomol
IL-6 (Interleukin 6)	20 ng/ml	Biomol
IL-1β (Interleukin 1 beta)	10 ng/ml	Biomol

4.3.3.4 mit Inhibitoren von Signaltransduktionswegen

Die Inhibitoren wurden nach Herstellerangaben gelöst und die Zellen vor der Stimulation mit den Inhibitoren 30 min bei 37°C vorinkubiert. Das LPS-konditionierte Makrophagenmedium wurde mit den Inhibitoren versetzt (Tab. 4.6) und die Adipozyten für 3 h, 6 h und 24 h stimuliert, die Zellen in QIAzol lysiert und die RNA isoliert.

Tab. 4.6 Inhibitoren

Inhibitor	Zielprotein	Konzentration	Hersteller
Parthenolide	Nuklear Faktor-Kappa B (NF-κB)	50 µMol/l	Calbiochem
SP600125	C jun N-terminale Kinase (JNK1, JNK2, JNK3)	50 µMol/l	Calbiochem
PD98059	MAP Kinase Kinase (MEK) und ERK	50 µMol/l	Calbiochem
SB202190	p38 MAP Kinase	10 µMol/l	Calbiochem
Ly294002	Phodphatidyl-inositol-Kinase-3 (PI3-K)	50 µMol/l	Calbiochem
H89	Proteinkinase A (PKA)	10 µMol/l	Calbiochem

4.4 Virale Methoden

4.4.1 Herstellung von miRNA exprimierenden Lentiviren

Für die Herstellung stabiler Zelllinien, die die Expression des Zielgens durch die Expression einer spezifischen miRNA inhibieren, wurden miRNA-exprimierende Lentiviren hergestellt.

4.4.1.1 Klonierung der pcDNA™6.2GW/EmGFP-miR Konstrukte

Für die Klonierung der pcDNA™6.2GW/EmGFP-miR Vektoren wurde das Block-iT™ PolII miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet und die miRNA Sequenzen mit dem BlockIT™ RNAi Designer, Invitrogen, (Tab. 4.7) ermittelt. Die Konstrukte wurden im GeneErase™Luciferase Suppression System (Stratagene) auf ihre Knockdown-Kapazität getestet und das Konstrukt mit dem besten Knockdown wurde in den weiteren Versuchen verwendet.

Tab.:4.7 miRNA-Sequenzen

Name	Strang	Sequenz 5‘-3‘
Trib1-miRNA995	top	TGCTGAGTGCATGTCTCCAAAGTCCTGTTTTGGCCACTGACTGA CAGGACTTTAGACATGCACT
Trib1-miRNA995	bottom	CCTGAGTGCATGTCTAAAGTCCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAG GACTTTGGAGACATGCACTC
Trib1-miRNA1233	top	TGCTGTAGGCTGGGCAGCCATGTTTAGTTTTGGCCACTGACTGA CTAAACATGTGCCCAGCCTA
Trib1-miRNA1233	bottom	CCTGTAGGCTGGGCACATGTTTAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTA AACATGGCTGCCCAGCCTAC
Trib1-miRNA1604	top	TGCTGAGAAGAAGGAACTTATGTCACGTTTTGGCCACTGACTGA CGTGACATATTCCTTCTTCT
Trib1-miRNA1604	bottom	CCTGAGAAGAAGGAATATGTCACGTCAGTCAGTGGCCAAAACG TGACATAAGTTCCTTCTTCTC
Trib2-miRNA1355	top	TGCTGTATAGACGACAGCTCTTCGAAGTTTTGGCCACTGACTGA CTTCGAAGATGTCGTCTATA
Trib2-miRNA1355	bottom	CCTGTATAGACGACATCTTCGAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTT CGAAGAGCTGTCGTCTATAC
Trib2-miRNA1459	top	TGCTGAAGTATTTCCCGATGCAAGAAGTTTTGGCCACTGACTGA CTTCTTGCAGGGAAATACTT
Trib2-miRNA1459	bottom	CCTGAAGTATTTCCCTGCAAGAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTT CTTGCATCGGGAAATACTTC
Trib2-miRNA2051	top	TGCTGAAGAGAACTAGGCTCAATGTCGTTTTGGCCACTGACTGA CGACATTGACTAGTTCTCTT
Trib2-miRNA2051	bottom	CCTGAAGAGAACTAGTCAATGTCGTCAGTCAGTGGCCAAAACG ACATTGAGCCTAGTTCTCTTC
Trib3-miRNA222	top	TGCTGATCAAACTCCAACGGTTTCTTGTTTTGGCCACTGACTGA CAAGAAACCTGGAGTTTGAT
Trib3-miRNA222	bottom	CCTGATCAAACTCCAGGTTTCTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAA GAAACCGTTGGAGTTTGATC
Trib3-miRNA736	top	TGCTGCACAGTTGCTGAAGACAAAGCGTTTTGGCCACTGACTGA CGCTTTGTCCAGCAACTGTG
Trib3-miRNA736	bottom	CCTGCACAGTTGCTGGACAAAGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACG CTTTGTCTTCAGCAACTGTGC
Trib3-miRNA795	top	TGCTGATCTGATCCAGTCATCACGCAGTTTTGGCCACTGACTGA CTGCGTGATCTGGATCAGAT
Trib3-miRNA795	bottom	CCTGATCTGATCCAGATCACGCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACT GCGTGATGACTGGATCAGATC

4.4.1.2 Klonierung der pLenti6/V5-DEST Konstrukte

Die Klonierung der pLenti6/V5-DEST Kontrukte erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen, Block-iT™ Lentiviral PolII miR RNAi Expression System Manual) indem der pcDNA™6.2GW/EmGFP-miR Vektor zuerst mit dem pDONR221-Vektor und anschließend mit dem pLenti6/V5-DEST Vektor rekombiniert wurde.

4.4.1.3 Herstellung von Lentiviren

Die Herstellung von Lentiviren erfolgte nach Herstellerangaben (ViraPower™ Lentiviral Expression Systems, Version F 2005; Invitrogen) in HEK 293FT oder durch

die Koexpression von den lentiviralen Verpackungsvektoren (pMRDg/pRRE, pMD2.G, pRSVrev) und den pLenti6/V5 DEST-miR in HEK 293T Zellen.

4.4.1.3.1 Lentivirusherstellung mit lentiviralen Verpackungsplasmiden

Für die Herstellung von Lentiviren wurden $3x10^6$ 293T Zellen 24 h vor der Transfektion auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg des pLenti6/V5-DEST-miR Vektors zusammen mit den Verpackungsplasmiden (6,5 µg pMDL_g/p_RRE, 3,5 µg pMD2.G und 2,5 µg pRSVrev) mit der Kalziumphosphatmethode transfiziert. 12 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und 24 h später der Überstand mit den darin enthaltenden Viren geerntet, und bei -80°C gelagert.

4.4.1.4 Titration von Lentiviren in 3T3-L1 Zellen

Der virusenthaltende Zellkulturüberstand kann direkt zur Infektion der Zielzellen genutzt werden. Für eine Infektion mit einer bestimmten Virusmenge kann die Viruskonzentration wie folgt bestimmt werden. Der lentivirusenthaltende Überstand wurde in 3T3-L1 Fibroblasten titriert, indem $2x10^4$ 3T3-L1 Zellen pro Well im 6-Well Format mit eine Zehnfachverdünnungsreihe in 3T3-L1 Kulturmedium mit 6 µg/ml Polybrene transduziert wurden. Nach 24 h wurde das Medium erneuert. Nach vier Tagen wurden die transduzierten Zellen mit 4 µg/ml Blasticidin selektiert und für weitere 10 Tage in blasticidinhaltigem Selektionsmedium kultiviert. Die resistenten Zellklone wurden mit Kristallviolett angefärbt und der Titer anhand der gezählten Kolonien mal dem Verdünnungsfaktor bestimmt.

4.4.1.5 Transduktion von 3T3-L1 Zellen und Herstellung stabiler Klone

Für die Herstellung stabiler miRNA exprimierender 3T3-L1 Fibroblasten wurden $2x10^4$ Zellen pro well einer 6-Well-Platte ausgesät und mit einer 1:10 Verdünnung des durch Pelletierung auf ein Sucrosekissen ankonzentrierten Lentivirusüberstands und 6 µg/ml Polybrene in 3T3-L1 Kulturmedium transduziert. Nach 24 h wurde das Medium erneuert. Nach fünf Tagen wurde das Kulturmedium durch blasticidinhaltiges (5 µg/ml) Kulturmedium ersetzt und alle zwei Tage erneuert. Die antibiotikaresistenten Klone wurden in einer 96-Well Platte vereinzelt und in Selektionsmedium weitergezogen. Nach weiteren 12 Tagen wurden die Zellen auf 12-Well-Platten umgesetzt und bei einer Konfluenz von 80% auf eine 6-Well-Platte

transferiert. Die so erhaltenen Zellklone wurden auf eine 10 cm Platte umgesetzt und bei 80% Konfluenz ein Teil für die Differenzierung ausgesät und die restlichen Zellen kryokonserviert.

4.4.2 Herstellung von miRNA und shRNA exprimierenden Adenoviren

Adenoviren, die entweder die TRB1 spezifische miRNA oder shRNA exprimieren wurden mit Hilfe des Block-iT™ Adenoviral RNAi Expression System (Invitrogen) hergestellt. Mit diesen Adenoviren sollte eine transiente Inhibition des Zielgenprodukts erreicht werden.

4.4.2.1 Klonierung von pENTR/U6shRNA und pENTRmiR

Für die Klonierung der pENTR/U6-shRNA exprimierenden Vektoren wurde das Block-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet (Tab. 4.8). Für die Klonierung der pENTRmiR-Vektoren das Block-iT™ PolII miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) verwendet und die miR Sequenz aus dem Vektor pcDNA™6.2GW/EmGFP-miR durch PstI und XhoI Verdau geschnitten und in den modifizierten pENTR-CMV-MCS-TkPA Vektor ligiert wurde.

Tab. 4.8: shRNA und miRNA Sequenzen für Adenoviren

Name	Sequenz 5‘-3‘
TRB1-shRNA_1183_top	CACCGCCTGGAAGATACTCACATCACGAATGATGTGAGTATCTTCCAGGC
TRB1-shRNA_1183_bottom	AAAAGCCTGGAAGATACTCACATCATTCGTGATGTGAGTATCTTCCAGGC
TRB1-shRNA_1541_top	CACCGGGCTATGTTGACTCAGAAATCGAAATTTCTGAGTCAACATAGCCC
TRB1-shRNA_1541_bottom	AAAAGGGCTATGTTGACTCAGAAATTTCGATTTCTGAGTCAACATAGCCC
TRB1-shRNA_1543_top	CACCGCTATGTTGACTCAGAAATAGCGAACTATTTCTGAGTCAACATAGC
TRB1-shRNA_1543_bottom	AAAAGCTATGTTGACTCAGAAATAGTTCGCTATTTCTGAGTCAACATAGC
Trib1-miRNA_1604 top	TGCTGAGAAGAAGGAACTTATGTCACGTTTTGGCCACTGACTGACGTGACATATTCCTTCTTCT
Trib1-miRNA_1604bottom	CCTGAGAAGAAGGAATATGTCACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTGACATAAGTTCCTTCTTCTC

4.4.2.2 Klonierung von pAd-miRNA und pAd-shRNA-Vektoren

Die shRNA-Kassette der im GeneErase™Luciferase Suppression System (Stratagene) positiv getesteten pENTR/U6-shRNA Plasmide wurden über die LR-Rekombinationsreaktion in den pAd/Block-iT™ -DEST Vektor nach Herstellerangaben eingebracht (S.18; Block-iT™ Adenoviral RNAi Expression System, Invitrogen, Version B, 2004). Die rekombinierten Plasmide wurden in *E.coli* TOP10 (Invitrogen) transformiert und auf Ampicillin (50 mg/ml) LB-Agarplatten amplifiziert. Das rekombinierte Plasmid enthält nur noch eine Ampicillinresistenz und ist gegenüber Chloramphenicol sensitiv. Jeweils 10 ampicillinpositive Klone wurden jeweils auf Ampicillin und Chloramphenicol LB-Agarplatten ausplattiert. Klone, die nur noch auf den Ampicillinplatten wuchsen wurden als positiv angesehen und das Plasmid wurde über eine Plasmid Maxi-Präparation amplifiziert und aufgereinigt.

Die miRNA Kassette des pcDNA6.2 GW/EmGFP-miR wurde aus dem Vektor durch den Verdau mit PstI und XhoI geschnitten und in den modifizierten pENTR_CMV_MCS_TkpA Vektor ligiert. Die Herstellung des adenoviralen Plasmids erfolgte danach wie oben beschrieben.

4.4.2.3 Herstellung und Ernte von Adenoviren

Die humane Zelllinie HEK 293A trägt das virale E1 Protein *in trans*, das für die Expression der späten adenoviralen Gene und somit für die Virusreplikation notwendig ist. $5x10^5$ 293A Zellen wurden 24 h vor der Transfektion pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Diese Zellen wurden mit 1 µg des PacI verdauten pAd/Block-iT™-Dest miR/shRNA Expressionsplasmids mit Lipofectamine™2000 nach Herstellerangaben transfiziert (Block-iT™ Adenoviral RNAi Expression System, Invitrogen, Version B 2004). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen pro Well auf eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Nach 10-13 Tagen wurden Plaques in dem Zellrasen sichtbar und die virusenthaltenden Zellen wurden geerntet, indem sie von der Schale gespült und in ein 15 cm Röhrchen überführt wurden. Die Zellen wurden 10 min bei 1000 rpm pelletiert und das Pellet in 1 ml PBS-Tosh (30,8 mMol/l NaCl, 120,7 mMol/l KCl, 8,1 mMol/l NaH_2PO_4, 1,46 mMol/l KH_2PO_4, 10 mMol/l $MgCl_2$; pH 7,2) resuspendiert. Durch dreimaliges einfrieren in flüssigem Stickstoff und wieder auftauen wurden die Zellen aufgeschlossen. Das grobe Lysat wurde 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Infektion von weiteren 293A Zellen (40 µl pro

Platte; 20 x 15 cm 90% konfluent) verwendet. Nach 2-3 Tagen zeigten sich Plaques und die virusenthaltenden Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet. Das aufgeschlossene Lysat wurde zur Virusgewinnung über zwei CsCl-Gradienten aufgereinigt.

4.4.2.4 Aufreinigung von Adenoviren mittels CsCl-Gradient

Für die Aufreinigung und Ankonzentration des Adenovirus wurde das Virus-Zelllysat über zwei CsCl-Gradienten aufgereinigt. Das geerntete virusenthaltende Zelllysat wurde durch dreimaliges einfrieren in flüssigem N_2 und auftauen aufgeschlossen, 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit PBS/Tosh pH 7,2 auf 20 ml aufgefüllt. Der erste CsCl-Gradient wurde in SW28 Röhrchen (Beckmann) gegossen, in dem auf 9 ml 4 Mol/l CsCl, 9 ml 2,2 Mol/l CsCl geschichtet wurde und darauf die 20 ml Viruslösung. Der Gradient wurde 2 h bei 24000 rpm, 4°C in der Ultrazentrifuge (Beckmann) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine abgegrenzte Virusbande zu sehen. Der Überstand mit den Zellresten wurde entfernt und die Virusbande in ca. 3,5 ml in ein 15 ml Röhrchen überführt. Das Viruslysat wurde 1:1 mit gesättigter CsCl-Lösung gemischt und in ein SW40Ti Röhrchen überführt. Darüber wurden 1,5-2,5 ml 4 Mol/l CsCl geschichtet und darauf wurden 1-2,5 ml 2,2 Mol/l CsCl gegeben. Der Gradient wurde 3 h bei 35000 rpm zentrifugiert, 4°C.

Die abgegrenzte Virusbande wurde mit Hilfe einer Spritze und Kanüle aus dem Gradienten entfernt und in einen zuvor in H_2O äquilibrierten Dialyseschlauch (MWCO 15000) überführt. Das Virus wurde 1 h gegen PBS-Glyzerin (PBS, 10% Glyzerin) dialysiert und danach über Nacht gegen frisches PBS-Glyzerin dialysiert. Das dialysierte Viruspräparat wurde mit 1/10 Volumen Glyzerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

4.4.2.5 Titration von Adenoviren

Die Anzahl der Viren wurde durch den Plaqueassay mit Hilfe des $TCID_{50}$ (Tissue culture infectious dose 50) ermittelt. Je Virus wurden auf zwei 96-Well Flachbodenplatten $1x10^4$ HEK 293A Zellen/Well in Titrationsmedium (DMEM, 2% hitzeinaktiviertes FCS, 1% Pen/Strep, 1% NAA) ausgesät. Nach 2 h wurden die Zellen mit 100 µl der Virusverdünnungen/Well infiziert. Die Virusverdünnungen wurden von 10^{-1} bis 10^{-12} in Titrationsmedium angesetzt und von 10^{-5}-10^{-12} auf die Zellen gegeben, wobei pro Verdünnung 10 Wells infiziert wurden. Nach 10 Tagen

Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 wurden die Wells auf Plaques untersucht und gezählt. Nach zwei weiteren Tagen wurde das Ergebnis noch einmal kontrolliert. Die Auswertung erfolgte mit der folgenden Formel:

Titer (T): $T_a = 10^{1+(s-0,5)}$ /100 µl

$T = T_a * 10$ (ifu/ml)

S = Summe der Plaque positiven Wells, ausgehend von der 10^{-1} Verdünnung; 10 positive Wells pro Verdünnung = 1.

4.4.2.6 Transduktion von 3T3-L1 und primären Adipozyten mit Adenovirus

Für die Transduktion von 3T3-L1 Adipozyten oder primären Adipozyten wurde ein MOI (Multiplicity of infection) von 1000 eingesetzt. Das Virus wurde in serumfreiem OptiMEM mit 0,5 µg/ml Poly-L-Lysin für 100 min bei RT inkubiert [159]. Die entsprechende Menge wurde auf die Zellen gegeben und für 100 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die infizierten Zellen wurden mit Kulturmedium versetzt und nach 48 h stimuliert und geerntet.

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Herstellung von Proteinlysaten

4.5.1.1 mit 2x SDS-Puffer und 2x SDS-Urea-Puffer

Die Zellen oder Gewebe wurden mit PBS (10x PBS (1l: 80 g NaCl, 2 g KH_2PO_4; 16 g Na_2HPO_4, 2 g KCl, pH 7)) gewaschen und in 2x SDS-Probenpuffer (200 mMol/l DTT, 120 mMol/l Tris/HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glyzerin, 0,01% Bromphenolblau) oder 2x SDS-Ureapuffer (8 Mol/l Urea, 200 mMol/l DTT, 120 mMol/l Tris/HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glyzerin, 0,01% Bromphenolblau) aufgenommen, kurz sonifiziert oder Gewebe für 30 sec im Tissue-Lyser (Qiagen) bei 30 Hz homogenisiert, für 10 min bei 95 °C gekocht und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert

4.5.1.2 mit modifiziertem Radioimmunopräzipitationspuffer (RIPA)

Die Zellen wurden mit kalten PBS gewaschen und 30 min in kaltem RIPA-Puffer (50 mMol/l Tris/HCl pH 7,4, 1% Igepal, 0,25% Na-Deoxycholat, 150 mMol/l NaCl, 1 mMol/l EDTA; 0,5 mMol/l PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mMol/l Na_3VO_4, 1 mMol/l NaF) bei 4°C auf der Platte lysiert. Die Proben wurden anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und zweimal 5 sec sonifiziert und 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne das obenauf schwimmende Fett in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

4.5.1.3 aus der QIAzolphase nach der RNA-Isolation

Nach der RNA-Isolation können auch die Proteine aus der QIAzolphase isoliert werden. Dazu wurde die wässrige Phase restlos abgenommen und die unteren Phasen mit 0,3 ml absolutem Ethanol versetzt, gemischt, für 2-3 min bei RT inkubiert Die gefällte DNA wurde für 5 min bei 2000 g, 4°C, pelletiert. Der Phenol-Ethanol-Überstand wurde mit Isopropanol vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die gefällten Proteine wurden für 10 min bei 12000 g, 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet wurde dreimal für 20 min auf dem Drehrad bei RT mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol gewaschen. Das gewaschene Proteinpellet wurde in absolutem Ethanol gevortext und für 20 min auf dem Drehrad bei RT inkubiert und für 5 min bei 7500 g, 4°C, sedimentiert. Das Pellet wurde für 5-10 min bei RT getrockent und in 200 µl 1% SDS über Nacht bei RT auf dem Drehrad gelöst. Ungelöste Bestandteile wurden durch fünfminütige Zentrifugation (10000 g, 4°C) und Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß entfernt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

4.5.1.4 Herstellung von Kernextrakten

Für die Präparation der zytoplasmatischen und nukleären Extrakte aus Zellen wurden 3T3-L1 Zellen auf 15 cm Platten differenziert. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS und einmal mit dem hypotonischen Puffer ((10 mMol/l HEPES/KOH pH 7,9, 10 mMol/l KCl, 1,5 mMol/l $MgCl_2$, 0,2 mMol/l EDTA, 0,5 mMol/l DTT, 1x Proteaseinhibitor) gewaschen. Die Präparation erfolgte auf Eis, bzw bei 4°C. Die

Zellen wurden in 500 µl des hypotonischen Puffers abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 15 Stößen in einem Gewebehomogenisator (Dounce Tissue Grinder) vorsichtig homogenisiert. Die homogenisierten Zellen wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytoplasmatische Fraktion und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 13000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -20°C bis zu Analyse eingefroren. Das Pellet enthielt die Zellkerne und für die Extraktion derselben wurde das Pellet in Hochsalzpuffer (20 mMol/l HEPES/KOH pH 7,9, 1,5 mMol/l $MgCl_2$, 380 mMol/l KCl, 25% Glyzerin, 0,2 mMol/l EDTA, 1 mMol/l DTT und 1x Proteaseinhibitormix) resuspendiert und für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Das Lysat wurde für 30 min bei 13000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den Zellkernen bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.5.2.1 mittels 2D-Quant

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von in 2x SDS-Probenpuffer lysierten Zellen wurde das 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben verwendet.

4.5.2.2 mittels BCA™ Protein Assay Kit

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine 1:10 Verdünnung der Proteinlysate nach Herstellerangaben mittels des BCA™ Protein Assay Kit (Pierce) vermessen.

4.5.2.3 mittels Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen wurde die Methode nach Bradford angewandt. Dafür wurde die Bradfordreagenz 1:5 mit H_2O verdünnt, eine BSA-Standardreihe in H_2O angesetzt und jeweils 1 ml Bradfordreagenz mit 2 µl des Standards oder der Probe versetzt. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen und die Konzentration anhand der Standardreihe bestimmt.

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden denaturierte Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

Für die Auftrennung der Proteine wurden 20-30 µg der Zelllysate mit 2x-SDS-Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 95 °C denaturiert. und über SDS-PAGE aufgetrennt [160] (Tab. 4.9). Als Laufpuffer diente 1x SDS-Puffer (10x Laufpuffer: 30 g Trizma Base, 144 g Glyzin, 10 g SDS, 4,5 ml HCl, ad 1l H_2O). Für die Proteingrößenbestimmung wurden 5 µl eines Proteinstandards aufgetragen (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas)

4.5.4. Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Proteine können in SDS-Gelen bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 220-400 ng mit Coomassie Brilliant Blue Färbelösung angefärbt werden. Dazu wurden die Proteine mit Isopropanol-Essigsäure (25% Isopropanol, 10% Essigsäure) im Gel für 30 min fixiert und anschließend mit der Coomassiefärbelösung (PageBlue™Protein staining solution, Fermentas) über Nacht gefärbt. Überschüssige Farbe wurde durch Waschen mit H_2O entfernt.

Tab. 4.9: Zusammensetzung der SDS-Gele

Trenngel (5 ml)	**10%**	**12%**	**15%**	**4% Sammelgel (2 ml)**
H_2O	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	1,4 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	0,33 ml
1,5 Mol/l Tris/HCl pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
1 Mol/l Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	0,25 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,01 ml
10% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,5 ml	0,01 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml	0,001 ml

4.5.5 Immunoblot

Für die Immunodetektion von Proteinen wurden diese aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman) mittels Wet-Blot (BioRad) transferiert. Dabei wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran für 1h 10 min bei 80 V in Transferpuffer (10x Transferpuffer (0,25 Mol/l Trizma Base, 1,9 Mol/l Glyzin; 20% Methanol und 1% SDS) übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Poinceau S (Poinceau S Solution, Sigma) angefärbt, um den Transfer zu kontrollieren. Die mit

H_2O entfärbte Membran wurde entsprechend der Antikörper (Tab. 4.10) für 1 h bei RT blockiert (5% Milchpulver (Rapilait Magermilchpulver, Migros) in PBS oder TBS (10 x TBS (24,2 g Trizma Base, 80 g NaCl, ad 1l H_2O, pH 7,6) mit 0,1% Tween20, 5% BSA in PBS oder TBS mit 0,1% Tween20, oder Baileys). Der Antikörper wurde entweder in der Blockierlösung oder in PBS angesetzt und die Membran über Nacht bei 4°C damit inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges zehnminütiges Waschen mit PBS + 0,1% Tween20 entfernt und die Membran 1 h bei RT mit dem für den Primärantikörper speziesspezifischen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (Tab. 4.10). Durch dreimaliges zehnminütiges Waschen wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz (ECL, enhanced chemiluminescence, Western blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences) und Belichtung eines Films (ECL Hyperfilm, Amersham Biosciences) und anschließender Entwicklung.

Tab. 4.10 Antikörper

Primärantikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
VCP	Maus	1:10000	Abcam
Flag-M2	Maus	1:5000	Sigma
TRB1 polyklonal	Maus	1:1000	Abnova
TRB1 monoklonal	Maus	1:1000	Abnova
TRB1	rabbit	1:1000	Upstate
TRB1	rabbit	1:1000	Abcam
TRB1	rabbit	1:50	Abgent
TRB1 polyklonales Serum	Rabbit	1:2000	K.Du, Boston
6xHis	Maus	1:1000	Zentgraf, DKFZ

Sekundärantikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Maus-IgG-HRP	Ziege	1:5000	Biorad
Ratte		1:5000	Santa Cruz
Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:5000	Biorad
Meerschweinchen	Ziege	1:5000	Dianova

4.5.6 GST-Pulldown Assay

4.5.6.1 Herstellung von GST--Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Proteinen wurden *E.coli* Rosetta2<DE3> pLysS mit dem GST-Konstrukten (pGEX5.1, pGEX5.1_GST_p65, pGEX5.1_GST_p65 RHD_1-305; pGEX5.1_GST_p65_TA_441-551) transformiert. 400 ml LB-Medium wurden mit 3 ml einer Übernachtkultur angeimpft und bei einer optischen Dichte von 0,6 mit 0,5 mMol/l IPTG induziert. Die Induktion der Proteinexpression wurde bei 30°C für 3 h durchgeführt. Die Bakterien wurden für 10 min bei 4°C und 8000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Puffer (20 mMol/l Hepes pH 7,9, 75 mMol/l KCl, 2,5 mMol/l $MgCl_2$, 1 mMol/l DTT, 0,1% Igepal) lysiert und 10 x 10 sec sonifiziert. Zu dem Lysat wurden 250 µl 20% Triton X100 zugegeben und für 30 min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit in Puffer äquilibrierten 300 µl Glutathione Sepharose 4B (Amersham) 2 h bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Die Sepharose wurde 2 min bei 4°C und 1600 rpm abzentrifugiert und viermal mit Puffer gewaschen und in 2 ml Puffer aufgenommen.

Für die Proteinmengenbestimmung wurden 5 µl, 10 µl und 20 µl in 2x SDS-Puffer aufgekocht und mit einem BSA Standard von 1 µg, 2 µg und 5 µg BSA über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung verglichen.

4.5.6.2 Herstellung von TNT-Proteinen

Für die Herstellung der radioaktivmarkierten TNT-Proteine (TNT T7/T3 coupled reticulocyte lysate system, Promega) wurden 25 µl Kaninchenretikulozytenlysat, 2 µl TNT-Puffer, 1 µl TNT-Polymerase (T7), 1 µl Aminosäuren ohne Methionin, 1 µl (40 U/µl) Ribonuclease, 2 µl DNA (pcDNA3.1-TRB1-Flag (500 ng/µl)), 16 µl H_2O und 2 µl L-[^{35}S]-Methionin (Amersham) gemischt und für 90 min bei 30°C inkubiert. 2 µl der Proteine wurden mit 18 µl H_2O und 20 µl 2x SDS-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und als „Input“ aufgehoben.

4.5.6.3 GST-Pulldown

Für die Interaktionzwischen dem GST-Protein und dem TNT-Protein wurden 5 µl TNT-Protein mit 5 µg GST-Protein und 70 µl Sepharose gemischt und mit dem Puffer auf ein Volumen von 700 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad

inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 1 min) und viermal mit 1 ml Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 30 µl 2x SDS-Puffer für 5 min bi 95 °C aufgekocht und 20 ml des Überstands sowie des Inputs auf ein SDS-Gel geladen. Das Gel wurde 1 h in Fixierlösung (50% Methanol, 10% Essigsäure und 40% H_2O) fixiert, zweimal 5 min mit H_2O gewaschen und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Das Gel wurde mit 25% Isopropanol und 10% Essigsäure für 1 h entfärbt und für 5 min Trockenlösung (7% Methanol, 7% Essigsäure, 1% Glyzerin) geschwenkt und 1 h bei 80°C getrocknet. Die Detektion erfolgte über Autoradiographie eines Films (Kodak® BioMax™ MR Film, Sigma) bei -80°C für 48 h.

4.5.7 Flag-Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation und Koimmunopräzipitation von Proteinen wurden $3x10^6$ HEK 293 Zellen auf einer 10 cm Platte 6 h vor der Transfektion ausgesät. Die Zellen wurden jeweils mit 5 µg der Expressionsplasmide mit der Kalziumphosphatmethode transfiziert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium ersetzt. Die Proteine wurden 48 h nach der Transfektion extrahiert. Dazu wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 10 ml PBS resuspendiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 3000 rpm, 4°C pelletiert. Das PBS wurde entfernt und das Pellet in 1 ml Lysepuffer (20 mMol/l HEPES/KOH pH 7,4, 125 mMol/l NaCl, 0,5 mMol/l EDTA, 0,1% Igepal, 10% Glyzerin und 1x Proteaseinhibitormix) resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und zwischendurch stark gevortext. Die Zellreste wurden bei 13000 rpm, 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand enhielt den vollständigen Proteinextrakt. Dieser wurde mit 40 µl der ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel-Agarose (Sigma), die zweimal mit je 1 ml Lysepuffer äquilibriert wurden, versetzt. Die Proteinextrakt-Agarosemischung wurde für 1-2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Agarose wurde bei 6000 x g (7900 rpm) für 2 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand mit den ungebundenen Proteinen wurde abgenommen und die Agarose dreimal mit jeweils 1 ml Lysepuffer gewaschen. Der Puffer wurde verworfen und die gebundenen Proteine mit 50 µl des 3x-Flagpeptids (250 ng/µl) für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad eluiert. Die Agarose wurde bei 13000 rpm, 4°C für 5 min abzentrifugiert und die eluierten Proteine im Überstand abgenommen. Das Eluat wurde anschließend mit 2x SDS-Puffer versetzt und über SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

4.5.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden $5x10^5$ 3T3-L1 Fibroblasten auf eine 10 cm Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 5 µg des pcDNA3.1-TRB1-Flag Plasmids mittels Lipofectamine transfiziert. Nach 5 h wurde das Medium durch Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit LPS-konditioniertem (CM) und ohne LPS-konditioniertem RAW264.7 Makrophagenmedium (M) für 6 h stimuliert. Die Proteine wurden über die tropfenweise Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 1% und 10 minütiger Inkubation an die DNA fixiert. Die Bindung wurde mit der Zugabe von Glyzin bei einer Endkonzentration von 125 mMol/l gestoppt und für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer (für Proteinkomplexe: 50 mMol/l Tris pH 6,8, 150 mMol/l NaCl, 1 mMol/l EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS und Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma)) bei 4°C für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden abgekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 min im Ultraschallbad bei 4°C sonifiziert. Das Lysat wurde für 10 min bei 3000 g, 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und für 10 min bei 3000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zum vorherigen Überstand gegeben und das restliche Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA bestimmt. (Protein-Input)

4.5.8.1 Immunopräzipitation

250-500 µg Protein wurden in die Immunopräzipitation eingesetzt und mit 50 µl Salmon Sperm Agarose für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad vorgereinigt. Die Agarose wurde für 1 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit spezifischen Antikörpern versetzt (Tab.4.11) und mit 50 µl der Salmon Sperm Protein A/G Agarose/Sepharose (je nach Antikörper) über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Agarose wurde für 1 min bei 3000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit je 1 ml Waschpuffer (Puffer A: 50 mMol/l Tris, 150 mMol/l NaCl, 1mMol/l EDTA, 1% Igepal; Puffer B: 50 mMol/l Tris, 500 mMol/l NaCl, 1mMol/l EDTA; 1% Igepal, 0,1% SDS; Puffer C. 50mMol/l Tris, 250mMol/l LiCl, 1% Igepal, und zuletzt mit Puffer A) gewaschen und nach dem letzten Waschgang wurde der Puffer komplett entfernt. Die DNA-Komplexe wurden durch die Zugabe des ChIP Elutionspuffer (1% SDS, 100

mMol/l $NaHCO_3$) für 15 min bei 30°C eluiert, bei 3000 g, RT, 1 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
100 µg der Protein-Input Proben wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit PBS auf 500 µl aufgefüllt. 100 µg der Proteinase K wurde zu allen Proben gegeben und die Proben für 5 h oder über Nacht bei 65°C inkubiert um die DNA-Protein-Komplexe zu lösen. Die auf RT abgekühlten Proben wurden mit 800 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol versetzt, gut gemischt und für 5 min bei 12000 g bei RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 45 µl 3 Mol/l NaAc/HAc pH 5,3 versetzt. Durch die Zugabe von 900 µl Ethanol und Inkubation über Nacht bei -20°C wurde die DNA gefällt. Die gefällte DNA wurde für 30 min bei 12000 g, 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol für 1 h bei -20°C gewaschen, 10 min bei 12000 g, 4°C zentrifugiert, das Ethanol entfernt und das Pellet für 1 h bei RT getrocknet. Die Proben wurden in DNase freiem Wasser bei 4°C über Nacht resuspendiert. Die DNA Anreicherung der Proben wurde per Real Time PCR mit spezifischen Primern für die zu analysierenden Promotoren bestimmt (Tab. 4.12)

Tab. 4.11 Antikörper für Chromatin-Immunopräzipitation

Antikörper	**Hersteller**
Anti-Flag M2	Sigma
Anti-HA	Santa Cruz
Anti –Acetyl Histone H4	Upstate

Tab. 4.12 Primer für ChIP

Primer	**Sequenz 5‘-3‘**
CHIP_mIL6forw	TGTGTGTCGTCTGTCATGCG
CHIP_mIL6rev	AGCTACAGACATCCCCAGTCTC
CHIP_mIL6_A for (ohne NF-κB)	CCTACTTTCAAGCCTGGAATC
CHIP_mIL6_A rev (ohne NF-κB)	TCAAGTCTTCTAGGCTGGGTC
mIL-1b_ChIP2_for	TGCCCATTTCCACCACG
mIL-1b_ChIP2_rev	TGCTACCCTGAAATAATTTCTAATCCC
mIL-1b_ChIP3_for (ohne NF-κB)	CCCAAGGGAAAATTTCACAGC
mIL-1b_ChIP3_rev (ohne NF-κB)	ACCACTGCAGGGTTTGTTGTC
CHIPmTNFalphazwei_forw	CCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGA
CHIPmTNFalphazwei_rev	GCTAGTCCCTTGCTGTCCTCGCTGA

4.5.9 Analyse der Zellkulturüberstände – Milliplexassay

Für die Analyse des LPS konditionierten RAW264.7 Mediums und der Zellkulturüberstände der mit TRB1-shRNA transduzierten Adipozyten wurde das Milliplex (Millipore) System nach Herstellerangaben verwendet. Für die Analyse des konditionierten Mediums wurden die Mengen von IL-6, IL-1α, IL1-β, IL-12(p40), TNF-α, IFN-γ, MCP-1, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2 bestimmt. Für die Analyse der sekretierten Adipokine wurden die Mengen von IL-6, TNF-α, MCP-1, PAI-1, Adiponektin, Resistin und Leptin bestimmt.

4.5.10 Expression von rekombinantem TRB1-Protein zur Herstellung von TRB1 spezifischen Antikörpern

Für die Herstellung eines TRB1 spezifischen Antikörpers wurde das TRB1-Protein mit einem C-terminalen His-Tag rekombinant exprimiert und aufgereinigt.

4.5.10.1 Klonierung von TRB1-His Konstrukten

Die TRB1-DNA-Sequenz wurde zum einen in voller Länge, zum anderen in verschiedenen Teilstücken in den pET21d-Vektor kloniert (Tab. 4.13). Die pET21d-TRB1-Vektoren wurden in Rosetta2<DE3>pLysS Bakterien transformiert und auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausplattiert. Von jeweils einem positiven Klon wurde ein Glycerolstock (0,85 ml Übernachtkultur + 0,15 ml 100% Glyzerin) angelegt und bei -80°C gelagert.

Tab. 4.13 Primer für pET21d TRB1-Konstrukte

Name	Strang	Sequenz 5‘-3‘	Annealing Temperatur
TRB1_Hind_Nterm_rev	rev	CATGAAGCTTCACATGCTCGCGCTCAGC	69°C
TRB1_NcoI_Mitte_for	for	CATGCCATGGCGATCGCCGACTACCTGCTG	69°C
TRB1_Hind_Mitte_rev	rev	CATGAAGCTTGGCGGAAACAATCTGCTTGAA	
TRB1_NcoI_Cterm_for	for	CATGCCATGGCGGGGGTGATGCTCTATACG	69°C

Proteinsequenz TRB1 (NM_144549)

MRVGPVRFALSGASQPRGPGLLFPAARGTPAKRLLDTDDAGAVAAKCPRLSECSSPPDYLSP
PGSPCSPQPPPSTQGTGGSCVSSPGPSRIADYLLLPLAEREHVSRALCIHTGRELRCKEFPI
KHYQDKIRPYIQLPSHSNITGIVEVLLGESKAYVFFEKDFGDMHSYVRSRKRLREEEAARLF
KQIVSAVAHCHQSAIVLGDLKLRKFVFSTEERTQLRLESLEDTHIIKGEDDALSDKHGCPAY
VSPEILNTTGTYSGKAADVWSLGVMLYTLLVGRYPFHDSDPSALFSKIRRGQFCIPEHVSPK
ARCLIRSLLRREPSERLTAPQILLHPWFEYVLEPGYVDSEIGTSDQIVPEYQEDSDISSFFC

Proteinsequenz TRB1-N (AS 1-105)

MRVGPVRFALSGASQPRGPGLLFPAARGTPAKRLLDTDDAGAVAAKCPRLSECSSPPDYLSP
PGSPCSPQPPPSTQGTGGSCVSSPGPSRIADYLLLPLAEREHV

Proteinsequenz TRB1-M (AS 91-191)

IADYLLLPLAEREHVSRALCIHTGRELRCKEFPIKHYQDKIRPYIQLPSHSNITGIVEVLLG
ESKAYVFFEKDFGDMHSYVRSRKRLREEEAARLFKQIVS

Proteinsequenz TRB1-C (AS 270-372)

GVMLYTLLVGRYPFHDSDPSALFSKIRRGQFCIPEHVSPKARCLIRSLLRREPSERLTAPQI
LLHPWFEYVLEPGYVDSEIGTSDQIVPEYQEDSDISSFFC

4.5.10.2 Induktion der Expression

Die Expression der TRB1-Konstrukte wurde über Nacht in Autoinduktionmedium induziert. Dazu wurde jeweils 1 l Autoinduktionsmedium (1 l ZY-Grundmedium (1% N-Z-Amine AS, 0,5% Hefeextrakt), 20 ml 50x (1,25 Mol/l NaH_2PO_4, 1,25 Mol/l KH_2PO_4, 2,5 Mol/l NH_4Cl, 0,25 Mol/l Na_2SO_4), 20 ml 50x 5052 (25% Glyzerin, 2,5% Glukose, 10% α-Laktose-Monohydrat), 2 ml 1 Mol/l $MgSO_4$, 100 µl 0,1 Mol/l $FeCl_3$) mit ein paar Bakterien des Glycerolstocks versetzt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei 150 rpm inkubiert,

4.5.10.3 Aufschluss der Bakterien

Die Bakterienkultur wurde für 15 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in Lysepuffer (100 mMol/l NaH_2PO_4, 10 mMol/l Tris, 6 Mol/l Guanidinhydrochlorid, pH 8,0, 0,06% β-Mercaptoethanol) über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad aufgeschlossen.

4.5.10.4 Proteinaufreinigung über Ni-NTA

Das mit einem His-Tag versehene rekombinant exprimierte Protein kann über die Bindung des Tags an Ni-NTA-Agarose aus dem Proteingemisch aufgereinigt werden. Dazu wurde 1 ml der Ni-NTA-Agarose Lösung auf eine 20 ml Säule (Biorad) gegeben und mit Lysepuffer ohne β-Mercaptoethanol äquilibriert. Das lysierte Pellet wurde abzentrifugiert (30 min, 15000 rpm, RT) und der Überstand auf die äquilibrieten Ni-

NTA-Agarose gegeben. Die Bindung des Proteins erfolgte für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad. Für die Elution des gebundenen Proteins wurden die Ni-NTA-Agarose mit 2x 5 ml Waschpuffer (100 mMol/l NaH_2PO_4, 10 mMol/l Tris, 8 Mol/l Urea, pH 6,3) gewaschen und das Protein mit 5x 1ml Elutionspuffer (100 mMol/l NaH_2PO_4, 10 mMol/l Tris, 8 Mol/l Urea, pH 5,9) und 4x 1 ml Elutionspuffer (100 mMol/l NaH_2PO_4, 10 mMol/l Tris, 8 Mol/l Urea, pH 4,5) eluiert. Die Fraktionen wurden zu 1 ml aufgefangen, auf einem SDS-Gel per Coomassiefärbung analysiert und bei -80 °C gelagert.

4.5.10.5 Herstellung von TRB1 spezifischen Antikörpern

4.5.10.5.1 In Mäusen mit einem TRB1-Peptid als Antigen

Für die Herstellung eines monoklonalen TRB1 spezifischen Antikörpers wurden zwei Mäuse mit dem KLH-gekoppelten TRB1-Peptids (AS167-AS182) `MHSYVRSRKRLREEEA-C-KLH` dreimal innerhalb von zwei Monaten immunisiert. Die B-Zellen wurden mit Myelomazellen fusioniert und Zellen, die TRB1-Antikörper in die Überstände sezernierten, wurden subkloniert. (AG Zentgraf, DKFZ).

4.5.10.5.2 In Kaninchen mit einem TRB1-Proteinfragment

Für die Herstellung eines polyklonalen TRB1 spezifischen Serums wurden zwei Kaninchen mit dem TRB1-M Proteinfragment dreimal innerhalb von drei Monaten immunisiert und 5 ml des positiven Serums aufgereinigt (Eurogentec).

4.5.10.5.3 In Ratten mit einem TRB1-Proteinfragment

Für die Herstellung eines monoklonalen TRB1 spezifischen Antikörpers wurden zwei Ratten mit dem TRB1-M-Proteinfragment dreimal innerhalb von zwei Monaten immunisiert. Die B-Zellen wurden mit Myelomazellen fusioniert und Zellen, die TRB1-Antikörper in die Überstände sezernierten, wurden subkloniert (AG Zentgraf, DKFZ).

4.5.10.5.4 In Meerschweinchen mit einem TRB1-Proteinfragment

Für die Herstellung eines polyklonalen Serums und eines monoklonalen TRB1 spezifischen Antikörpers wurden zwei Meerschweinchen mit dem TRB1-M Proteinfragment dreimal innerhalb von drei Monaten immunisiert. Die B-Zellen wurden mit Myelomazellen fusioniert und Zellen, die TRB1-Antikörper in die Überstände sezernierten, wurden subkloniert (AG Zentgraf, DKFZ).

4.5.10.5.5 Analyse der Antikörper

Der Gehalt an TRB1 spezifischen Antikörpern in den Zellkulturüberständen und die Kaninchenseren wurde mittels ELISA mit dem Antigen ermittelt. Überstände und Seren wurden mittels Immunoblot gegen TRB1-Flag auf ihre Spezifität getestet.

4.5.10.5.6 Ergebnis der TRB1-Antikörpergenerierung

In Ermangelung eines mausspezifischen TRB1-Antikörpers bis kurz vor dem Abschluß dieser Arbeit wurden alle Analysen (2.1-2.5) auf mRNA Ebene durchgeführt. Trotz einer Sequenzhomologie (Abb. 4.1 A) zwischen dem humanen und dem murinen TRB1-Protein erkannten die kommerziell erwerblichen Antikörper nicht das endogene murine TRB1-Protein in Fettzellen. Das überexprimierte Protein wurde hingegen von allen Antikörpern erkannt. Um auch die endogene Regulation von TRB1 auf Proteinebene zu untersuchen, sollte ein spezifischer polyklonaler oder monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Für diese Aufgabe wurden verschiedene Ansätze verfolgt.

Im ersten Ansatz wurde ein KLH-konjugiertes Peptid, das die Aminosäuren 167 bis 182 umfasste (Abb. 4.1 A, rot), in Mäuse injiziert, die B-Zellen mit Myelomazellen fusioniert (AG Zentgraf, DKFZ) und die Überstände im ELISA gegen das Peptid und mit einem Immunoblot gegen das in HEK 293 Zellen überexprimierte TRB1-Flag-Protein getestet. Das Mausserum war gegenüber dem überexprimierten Protein positiv, die Überstände der fusionierten Zellen nicht (Abb. 4.1 C).

Für die Herstellung eines polyklonalen Serums wurden die Aminosäuren des TRB1-Proteins (Abb. 4.1 A, gelb hinterlegt) mit His-Markierung in *E.coli* Rosetta2<DE3> pLysS rekombinant in Autoinduktionsmedium exprimiert und über Nickel-NTA–Agarose aufgereinigt. (Abb. 4.1 B). Das so gewonnene Protein wurde über SDS-PAGE von noch verbliebenen bakteriellen Proteinen gereinigt. Mit dem aus dem Gel herausgelösten Protein wurden Kaninchen mehrfach immunisiert (Firma Eurogentec) und das Serum dieser Tiere im ELISA gegen das Antigen und im Immunoblot gegen das überexprimierte TRB1-Flag Protein getestet (Abb 4.1 C). Das Serum nach der ersten Immunisierung erkannte das TRB1-Flag Protein, die Detektionskapazität wurde aber nach jeder Immunisierung geringer und nach der Aufreinigung des Antikörpers aus dem Serum war keine Detektion mehr nachweisbar.

Ein weiterer Versuch einen Maus-TRB1 spezifischen Antikörper zu generieren erfolgte durch die Immunisierung von Ratte und Meerschweinchen mit dem TRB1-Fragment (AS 91-191) ohne vorherige Reinigung im SDS-Gel (AG Zentgraf, DKFZ). Die Seren von Meerschweinchen und Ratte reagierten positiv mit dem TRB1-Flag Protein im Immunoblot (Abb. 4.1 C). Von beiden Tieren wurden B-Zellen mit Myelomazellen fusioniert um monoklonale Antikörper zu erhalten. Einige der erhaltenen Klone sezernierten TRB1 spezifische Antikörper (Abb. 4.1 C). Nach der Subklonierung diese positiven Klone verloren sie aber diese Kapazität (Daten nicht gezeigt).

In allen vier Ansätzen reagierte das Serum jeweils positiv auf das überexprimierte TRB1-Flag-Protein, aber nicht auf das endogene. Die TRB1 positiven Klone verloren nach der Subklonierung die Kapazität, TRB1 spezifische Antikörper zu sezernieren.

Der von K. Du generierte Antikörper erkannte das endogene TRB1 Protein und konnte letztendlich für die Immunodetektion verwendet werden.

A CLUSTAL 2.0.11 Mehrfacher Sequenzvergleich

```
sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       MRVGPVRFALSGASQPRGPGLLFPAARGTPAKRLLDTDDAGAVAAKCPRL 50
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      MRVGPVRFALSGASQPRGPALLFPAARGTPAKRLLDTDDAAAVAAKCPRL 50
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       MRVGPVRSAMSGASQPRGPALLFPATRGVPAKRLLDADDAAAVAAKCPRL 50

sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       SECSSPPDYLSPPGSPCSPQPPPSTQGTGGSCVSSPGPSRIADYLLLPLA 100
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      SECSNPPDYLSPPGSPCSPQPPPSAQGTGGSCVSAPGPSRIADYLLLPLA 100
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       SECSSPPDYLSPPGSPCSPQPPPAAPGAGGGSGSAPGPSRIADYLLLPLA 100

sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       EREHVSRALCIHTGRELRCKEFPIKHYQDKIRPYIQLPSHSNITGIVEVL 150
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      EREHVSRALCIHTGRELRCKVFPIKHYQDKIRPYTQLPSHRNITGIVEVI 150
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       EREHVSRALCIHTGRELRCKVFPIKHYQDKIRPYIQLPSHSNITGIVEVI 150

sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       LGESKAYVFFEKDFGDMHSYVRSRKRLREEEAARLFKQIVSAVAHCHQSA 200
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      LGESKAYVFFEKDFGDMHSYVRSRKRLREEEAARLFKQIVSAVAHCHQSA 200
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       LGETKAYVFFEKDFGDMHSYVRSRKRLREEEAARLFKQIVSAVAHCHQSA 200


sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       IVLGDLKLRKFVFSTEERTQLRLESLEDTHIIKGEDDALSDKHGCPAYVS 250
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      IVLGDLKLRKFVFSTEERTQLRLESLEDTHMIKGEDDALSDKHGCPAYVS 250
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       IVLGDLKLRKFVFSTEERTQLRLESLEDTHIMKGEDDALSDKHGCPAYVS 250

sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       PEILNTTGTYSGKAADVWSLGVMLYTLLVGRYPFHDSDPSALFSKIRRGQ 300
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      PEILNTTGTYSGKAADVWSLGVMLYTLLVGRYPFHDSDPSALFSKIRRGQ 300
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       PEILNTTGTYSGKAADVWSLGVMLYTLLVGRYPFHDSDPSALFSKIRRGQ 300

sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       FCIPEHVSPKARCLIRSLLRREPSERLTAPQILLHPWFEYVLEPGYVDSE 350
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      FCIPEHVSPKARCLIRSLLRREPSERLTAPEILLHPWFEYVLEPGYVDSE 350
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       FCIPEHISPKARCLIRSLLRREPSERLTAPEILLHPWFESVLEPGYIDSE 350

sp|Q8K4K4|TRIB1_MOUSE       IGTSDQIVPEYQEDSDISSFFC 372
sp|NM_023985|TRIB1_Rat      VGTSDQIVPEYQDDNDVSSFFC 372
sp|Q96RU8|TRIB1_HUMAN       IGTSDQIVPEYQEDSDISSFFC 372
```

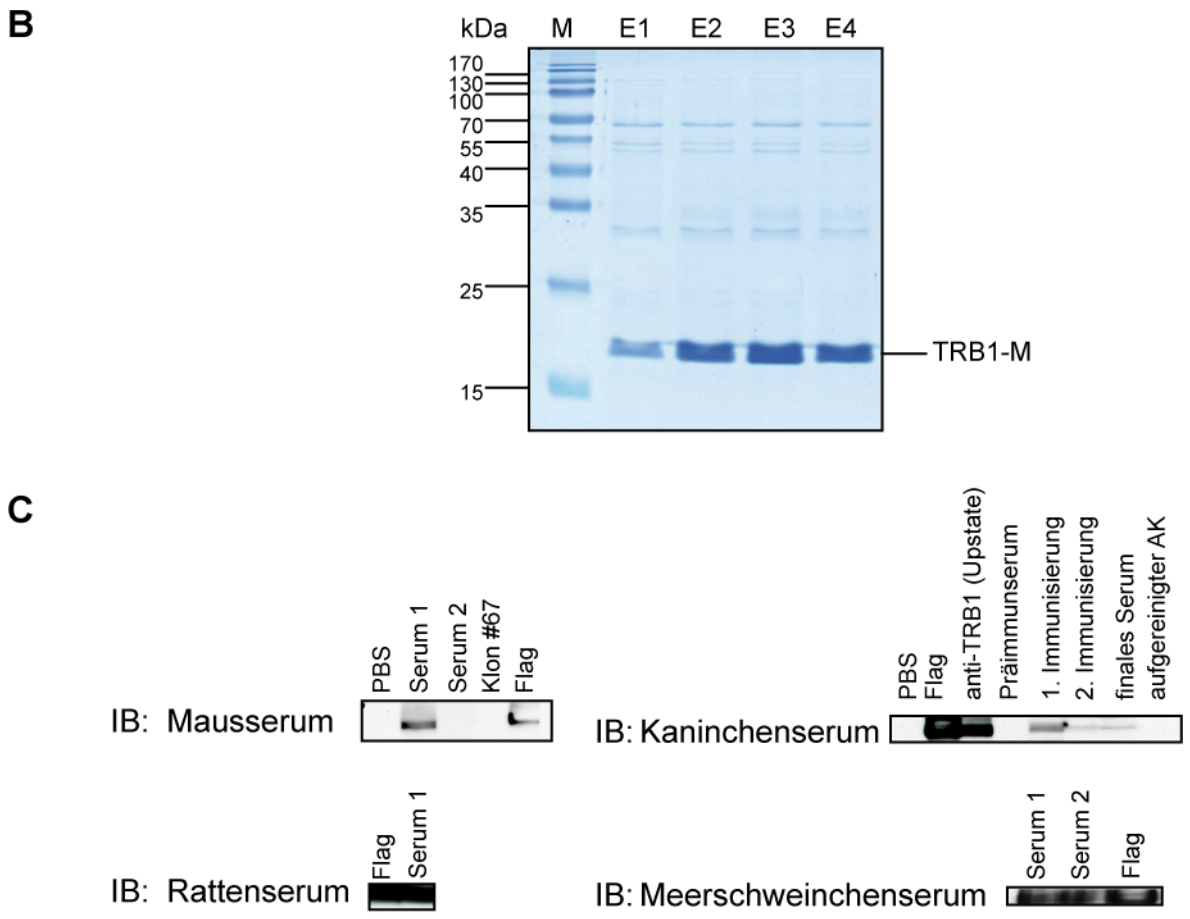


Abb. 4.1: Herstellung eines gegen das murine TRB1 gerichteten Antikörpers. A: ClustalW Alignment der TRB1-Proteinsequenzen von Maus, Ratte und Mensch **B**: 15% SDS-Gel, Elutionsfraktionen E1-E4 der Aufreinigung des TRB1-Fragments. **C**: Immunoblots gegen TRB1-Flag mit Seren aus immunisierten Tieren (Maus, Kaninchen, Ratte Meerschweinchen) und Überständen von Hybrodomazellen. In HEK 293 überexprimiertes TRB1-Flag-Protein wurde in einem 10%igen SDS-Gel über SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und das TRB1-Flag-Protein mit den Seren und Überständen detektiert.

4.6 Tierexperimente

Die Tiere wurden nach internationalen Standardbedingungen mit einem 12 h Dunkelheit und 12 h Lichtzyklus gehalten. Sie hatten unbegrenzten Zugang zu Futter, wenn nicht anders beschrieben und allzeit Zugang zu Wasser. Alle Versuche wurden offiziell durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt.

4.6.1 Metabolisches Syndrom

4.6.1.1 Monogenes Adipositas/Diabetes Modell: C57BKS und db/db-Mäuse

Für die Analyse der veränderten Genexpression unter Hungerbedingungen und Futtergabe wurden männliche, 10 Wochen alte C57BKS und die leptindefizienten db/db-Mäuse 48 h gehungert und 24 h wieder gefüttert (P. Narvekar, DKFZ). Die Tiere hatten während des Versuchs freien Zugang zu Wasser. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet und die Gewebe (Leber, Muskel, Fett) wurden präpariert.

4.6.1.2 Monogenes Adipositas/Diabetes-Modell C57BL/6J- und ob/ob-Mäuse

Für die Analyse der veränderten Genexpression in männlichen 10 Wochen alten Wildtyp C57BL/6J- und leptinrezeptordefizienten ob/ob-Mäuse wurden die Tiere 24 h gehungert und 6 h wieder gefüttert (M. Berriel-Diaz, DKFZ). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und die Gewebe (Leber, Muskel, Fett) präpariert.

4.6.1.3 Polygenes Adipositasmodell: NZO/NZB

Für die Analyse der veränderten Genexpression in männlichen 10 Wochen alten NZB (New Zealand Black) und dem polygenen Adipositasmodell NZO (New Zealand obese) Mäusen wurden die Tiere 24 h gehungert und 6 h wieder gefüttert (M-Berriel-Diaz, DKFZ). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und die Gewebe (Leber, Muskel, Fett) präpariert.

4.6.1.4 Hochfettdiät

Für das Modell der futterinduzierten Gewichtszunahme wurden männliche C57BL/6J Mäuse im Alter von 10 Wochen für 12 Wochen mit eine Hochfettdiät (60% Fett) gefüttert (S. Kersten, Wageningen, Niederlande). Die Kontrollgruppe erhielt das normale Kontrollfutter (15% Fett). Die Tiere wurden regelmäßig gewogen, um den Verlauf der Gewichtszunahme zu kontrollieren. Nach 12 Wochen wurden die Tiere getötet und die Gewebe (Fett, Muskel, Leber) präpariert

4.6.2 Sepsismodell

Für die Induktion einer Sepsis in Mäusen wurden männliche 10 Wochen alte C57BL/6J 12 h vor Versuchsbeginn gehungert, die Blutzuckerwerte gemessen und die Tiere gewogen. Pro kg Körpergewicht wurden 20 mg LPS injiziert. Zum Vergleich wurde das gleiche Volumen PBS in Kontrolltiere injiziert. Alle Tiere wurden während der Dauer des Versuchs gehungert. Nach 8 h wurde der Blutzuckergehalt der Tiere gemessen und die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, dekapitiert und Blut sowie Gewebe (Fett, Leber, Muskel,) entnommen.

Der gleiche Versuch wurde mit TNFR1/R2-Doppelknockout-Mäusen, sowie $TRB1^{+/-}$-Mäusen durchgeführt.

4.6.3 Kachexiemodell Colon26

Für die Induktion eines Tumors mit anschließender Entwicklung einer Tumorkachexie wurdne 1,5x 10^6 Colon26 Zellen subkutan in 10 Wochen alte CD2F1 Mäuse injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt nur PBS (A. Vegiopoulos, DKFZ). Die Mäuse entwickelten Tumore und eine kachektischen Phänotyp nach 10-12 Tagen und wurden 16-17 Tage nach Injektion getötet und präpariert.

4.6.4 $TRB1^{+/-}$ Mäuse

Die heterozygoten TRB1-Knockoutmäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden für die Charakterisierung der TRB1-Funktion unter inflammatorischen Bedingungen verwendet. Für die allgemeine Charakterisierung wurden sie 14 h gehungert und anschließend 6 h gefüttert. Das Gewicht, der Blutzuckergehalt und die Körperfettmasse wurden bestimmt.

4.7 Analyse der metabolischen Parameter von Mäusen

4.7.1 Körperfettmessung mit ECHO-MRI

Die Mäuse wurden gewogen und anschließend mittels Magnetresonanz (Echo-MRI; Echo Medical Systems,Houston USA) die Menge an Fettgewebe zu übrigem Gewebe ermittelt.

4.7.2 Blutwerte

Das aus der Schwanzvene oder nach Dekapitation erhaltene Blut wurde 2 h bei RT inkubiert und anschließend 30 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Serum wurde abgenommen und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren.

4.7.2.1 Blutzucker

Der Blutzuckerspiegel der Tiere wurde mit Teststreifen (One Touch Ultra Teststreifen, Johnson & Johnson) und Blutzuckermessgerät (One Touch Ultra Lifescan, Johnson & Johnson) bestimmt. Das Blut wurde dafür aus der Schwanzvene entnommen.

4.7.2.2 Insulin

Die Insulinkonzentration im Serum der Mäuse wurde mit einem Mausinsulin ELISA (Mercodia Mouse insulin ELISA) nach Herstellerangaben gemessen.

4.7.2.3 Cholesterin

Der Cholesteringehalt im Serum der Mäuse wurde per enzymatischer Endpunktmethode (Randox) nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei wurde die Menge an Cholesterin durch enzymatische Hydrolyse mit anschließender Oxidation über den entstehenden Indikator Chinonimin bestimmt. Die Reaktion verlief dabei nach folgendem Schema:

$$\text{Cholesterinester} + H_2O \xrightarrow[\text{Cholesterinesterase}]{} \text{Cholesterin und Fettsäuren}$$

$$\text{Cholesterin} + O_2 \xrightarrow[\text{Cholesterinoxidase}]{} \text{Cholesten-3-on} + H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 + \text{Phenol} + \text{4-Aminoantipyrin} \xrightarrow[\text{Peroxidase}]{} \text{Chinonimin} + 4\ H_2O$$

4.7.2.4 Triglyzeride

Die Menge an Triglyzeriden im Serum wurde mit dem Serum Triglyceride Determination Kit (Sigma) bestimmt. Dabei werden die Triglyzeride enzymatisch hydrolysiert und anschließend wird das freie Glyzerin in einer enzymatischen Reaktion über den entstehenden Indikator Chinonimin nachgewiesen und photometrisch bei 540 nm gemessen.

$$\text{Triglyzeride} \xrightarrow[\text{Lipoproteinlipase}]{} \text{Glyzerin + freie Fettsäuren}$$

$$\text{Glyzerin + ATP} \xrightarrow[\text{Glyzerinkinase}]{} \text{Glyzerin-1-Phophat + ADP}$$

$$\text{Glyzerin-1 Phophat + } O_2 \xrightarrow[\text{G1P-Oxidase}]{} \text{Dihydroxyacetonphosphat + } H_2O_2$$

$$H_2O_2 \text{ + 4-Aminoantipyrin + N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m-Anisidin} \xrightarrow[\text{Peroxidase}]{} \text{Chinonimin + } H_2O$$

4.7.2.5 Nichtveresterte freie Fettsäuren (NEFA)

Die Menge an nichtveresterten freien Fettsäuren wird über die enzymatische Umsetzung der freien Fettsäuren in Acetyl-CoA und anschließender Oxidation über die Bestimmung der Absorption bei 550 nm des entstehenden Indikator Chinonimin gemessen (WAKO).

$$\text{RCOOH-+ ATP + CoA-SH} \xrightarrow[\text{Acetyl-CoA-Synthetase}]{} \text{Acetyl-CoA + AMP + PPi}$$

$$\text{Acetyl-CoA + } O_2 \xrightarrow[\text{Acetyl-CoA-Oxidase}]{} \text{2,3-trans-Enoyl-CoA + } H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 \text{ + 4-Aminophenazone + MEHA} \xrightarrow[\text{Peroxidase}]{} \text{Chinonimin + 4 } H_2O$$

(MEHA: 3-Methyl-N-Ethyl-N (β-Hydroxyethyl)-Alanin)

4.8 Statistik

Die Daten wurden statistisch mit der GraphPad Prism Software ausgewertet. Je nach Versuch wurde der Student’s TTest, oder One-Way ANOVA mit dem Bonferroni Multicomparison Post Test oder dem Dunnet’s Post Test ausgewertet.

5 Material

5.1 Software

Software	Hersteller
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Endnote	Thomson, Carlsbad, USA
GraphPad Prism 4	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Unterschleißheim
MultAlin	bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin. html
Adobe Photoshop	Adobe, San Jose, USA
Adobe llustrator	Adobe, San Jose, USA
Pubmed	http://www.pubmedcentral.nih.gov
Quantity One	Bio-Rad, München
SDS 7300 System Software	Applied Biosystems, Darmstadt
Vector NTI Advance Software	Invitrogen, Karlsruhe
Clustal W2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html

5.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well Zellkulturschalen	Falcon, Gräfeling-Lochham
24-Well Zellkulturschalen	Falcon, Gräfeling-Lochham
12-Well Zellkulturschalen	Costar
6-Well Zellkulturschalen	Falcon, Gräfeling-Lochham
96-well MicroAmp plates	Applied Biosystems, Darmstadt
96-Well Platten	Falcon, Gräfeling-Lochham
Autoradiographie Film	Kodak® BioMax™MR Film, Sigma, München
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dialyseschlauch (MWCO 15000)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DNase / RNase freies Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten	Steinbrenner, Wiesenbach
Filter (0.22 µm)	Millipore, Eschborn
Filter (0.45 µm)	Millipore, Eschborn
Handschuhe (Gentle Skin)	Meditrade, Kiefersfelden
Handschuhe (Safe Skin Purple Nitrile)	Kimberly Clark, BE
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Mundschutz	Meditrade, Kiefersfelden
Mikro Hämatokrit Kapillaren	Brand, Wertheim
Nitrocellulosemembran	Schleicher and Schüll, Dassel
One Touch Ultra Lifescan	Johnson &Johnson, Milpitas, CA, USA
One Touch Ultra Lifescan Teststreifen	Johnson &Johnson, Milpitas, CA, USA
Parafilm	Pechinery Inc., Wisconsin, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR tubes (200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Greiner, Kremsmünster, AU

Pipettenspitzen (0.1 – 1000 µl)	Starlab, Helsinki, FI
Pipettenspitzen (0.1 – 1000 µl) (Tip One Filter Tips)	Starlab, Helsinki, FI
Pipettenspitzen (Elektrophorese / Protein)	BioRad, München
Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2 ml)	Steinbrenner, Wiesenbach
Safelock micro test tubes (1.5 ml and 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Saran cling film	Dow Chem. Co., Schwalbenbach
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, USA
Skalpell	Feather, Cuome, JP
Spritzen (10 ml Luer Lock, 50 ml Luer Lock)	Terumo, Leuven
Teströhrchen (15 ml and 50 ml)	Falcon, Gräfeling-Lochham
Ultrazentrifugationsröhrchen (35 ml)	Beckmann, München
Whatman Filterpapier	Whatman Int., UK
Zellkulturschalen (10 cm and 15 cm)	Falcon, Gräfeling-Lochham
Zellschaber(Costar)	Corning Inc., NY, USA

5.3 Material

Chemikalie	Hersteller
3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
α-Laktose-Monohydrat	Sigma, München
Acetic acid (99%) (Essigsäure)	Sigma, München
Adenosine triphosphate (ATP)	Sigma, München
Agarose	Sigma, München
Antibiotika (Ampicillin, Chloramphenicol, Spectinomycin)	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Baileys	R&A Bailey and Co, Ireland
BES (N,N-bis [2Hydroxyethyl]2-Aminoethansulfonsäure)	Sigma, München
Borsäure	Sigma, München
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, München
Bromophenol blau	Sigma, München
Chloroform	
Coomassie Brilliant Blue	Fermentas
d-Biotin	Sigma, München
Blasticidin	Sigma, München
Desoxynucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche, Mannheim
Dexamethasone	Sigma, München
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Sigma, München
D-Pantothenic acid hemicalcium salt	Sigma, München
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, München
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma, München
EGTA	Sigma, München
Ethanol (99%)	
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetal calf serum (FCS); Fötales Kälberserum	Invitrogen, Karsruhe
Formaldehyd	

Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon Rot
Glyzerin	Baker, Deventer, NL
Hyperfilm ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Freiburg
3-Isobuthyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	Sigma, München
Insulin human (recombinant yeast)	Sigma, München
Isopropanol	Sigma, München
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, München
Kristallviolett	
Lipofectamine2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid E.coli (LPS)	Sigma, München
Loading dye solution (6x)	Fermentas, St. Leon Rot
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Sigma, München
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka, München
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma, München
(+)-Natrium L-Ascorbat	Sigma, München
Natriumorthovanadat	Sigma, München
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Öl-Rot O	Sigma, München
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma, München
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon Rot
Penicillin / Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum qPCR SuperMix	Invitrogen, Karlsruhe
Polybrene	Sigma, München
Poly-L-Lysin	Sigma, München
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
RiboLock Ribonuclease Inhibitor	Fermentas, St. Leon Rot
ROX Reference Dye	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 37%	Acros Organics, New Jersey, USA
Trichloressigsäured (TCA)	Sigma, München
Tripotassium phosphate (K_3PO_4)	Merck, Darmstadt
Tris base	Sigma, München
Triton X-100	Sigma, München
Trypsin-EDTA solution	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, München
β-Mercaptoethanol (98%)	Sigma, München
Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen	

5.4 Instrumente

Instrument	Hersteller
Analytische Feinwaage	Satorius, Göttingen
Bakterienschüttler	Infors AG, Böttmingen, CH
CO_2-Inkubator	Sanyo, Munich
CO_2-Inkubator (Forma Scientific)	Labotect, Göttingen

Electrophoresekammer	Steinbrenner, Wiesenbach
Electrophoresis power supply (Power Pack Basic)	BioRad, Munich
Electrophoresis power supply (Power Pack HC)	BioRad, Munich
Elektroporator (Gene PulserII)	BioRad, Munich
Filmentwicklermaschine	Amersham, Freiburg
Filmkassette	Amersham, Freiburg
Gasbrenner (GASI)	Schütt, Göttingen
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank, -80°C (Hera Freeze)	Heraeus, Heilbronn
Geldokumentationsstation	BioRad, Munich
Heizblock	VWR, Darmstadt
Heizblock (Thermostat Plus)	Eppendorf, Hamburg
Horizontalschüttler(Duomax 1030)	Heidolph, Kehlheim
Inkubator (Function Line)	Heraeus, Hanau
Kamera (Power Shot G6)	Canon, Krefeld
Kühlschrank, 4°C	Liebherr, Biberach
Magnetrührer	VWR, Darmstadt
Mikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Mithras Multilabel Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Multisteppipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Meter	VWR, Darmstadt
Photometer (NanoDrop ND-1000)	Peqlab Biotechnology, Erlangen
Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipetten (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Real time PCR System 7300	Applied Biosystems, Darmstadt
Drehrad	Neolab, Heidelberg
Scanner	Epson, Meerbusch
SDS Elektrophoresekammer	BioRad, Munich
Sonifizierer 250	Branson, Danburry, Co., USA
Ständer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sterilwerkbänke (Class II type A/B3)	Sterilgard, Sanford, USA
Stickstofftank	Thermo Electron corp., Erlangen
Tabletop centrifuges (Mini Spin Plus)	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler (PTC-200)	Biozym, Oldendorf
Tissue Lyser	Qiagen, Hilden
Ultrazentrifuge XL 70	Beckmann, Munich
Vakuumpumpe	Neolab, Heidelberg
Vortexmixer (REAX 2000)	Heidolph, Kehlheim
Waage	Kern und Sohn GmbH, Balingen
Waage (BL 1500 S)	Satorius, Göttingen
Wasserbad	Neolab, Heidelberg
Wasserbad (WBS)	Fried Electric, Haifa, IL
Western Blot Kammer	BioRad, Munich
Zentrifuge (2K15)	Sigma, Munich
Zentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus, Hanau

Zentrifuge (Function Line)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Micro 22R)	Hettich GmbH & Co, Tuttlingen
Zentrifuge (Super T21)	Heraeus Sorvall, Langenselbold

5.5 Mäuse

Mausstamm	Firma
C57BL/6J	DKFZ, Jackson Laboratories
C57BKS	Jackson Laboratories
B6.129SF2/J	Jackson Laboratories
B6.129-Mapk8<tm1FLv>/J	Jackson Laboratories
B6.Cg-NfκB1<tm1Bal>/J	Jackson Laboratories
B6.129S-Tnfrsf1a<tm1Imx>Tnfrs	Jackson Laboratories
B6.129-Tnfrsr1a<tmJImx>IL1r<tm1Imx>/J	Jackson Laboratories
C57BL/10ScNJ (TLR4ko)	Jackson Laboratories
C57BL/6-TRB1$^{+/-}$	Osaka Universität, Japan

5.6 Accession Numbers

Gen	Accession Number
TRB1	NM_144549
TRB2	NM_144551
TRB3	NM_175093

6 Appendix

6.1 Literatur

1. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 2002, de Gruyter.
2. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome pandemic.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 629-36.
3. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.* Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.
4. WHO. *http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html*. [cited 2009 2009 08 11].
5. Renehan, A.G., J. Frystyk, and A. Flyvbjerg, *Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis.* Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(8): p. 328-36.
6. Cornier, M.A., et al., *The metabolic syndrome.* Endocr Rev, 2008. **29**(7): p. 777-822.
7. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance.* Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.
8. Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source.* Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
9. Wozniak, S.E., et al., *Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article.* Dig Dis Sci, 2009. **54**(9): p. 1847-56.
10. Gustafson, B., et al., *Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2276-83.
11. Chowdhury, B., et al., *A multicompartment body composition technique based on computerized tomography.* Int J Obes Relat Metab Disord, 1994. **18**(4): p. 219-34.
12. Yang, X. and U. Smith, *Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer?* Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1127-39.
13. Gierke, E.v., *Über Fett Metabolismus.* Der Deutsch Ges Path., 1906(10): p. 182–185.
14. Gavrilova, O., et al., *Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice.* J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 271-8.
15. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
16. Greenberg, A.S. and M.S. Obin, *Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism.* Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 461S-465S.
17. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.* Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
18. Jo, J., et al., *Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth.* PLoS Comput Biol, 2009. **5**(3): p. e1000324.
19. Zeyda, M. and T.M. Stulnig, *Adipose tissue macrophages.* Immunol Lett, 2007. **112**(2): p. 61-7.
20. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
21. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes.* J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
22. Lacasa, D., et al., *Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes.* Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 868-77.
23. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects.* J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45777-84.
24. Gimeno, R.E. and L.D. Klaman, *Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances.* Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(2): p. 122-8.

25. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance.* Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
26. Neal, M.D., et al., *Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier.* J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3070-9.
27. Tilg, H., A.R. Moschen, and A. Kaser, *Obesity and the microbiota.* Gastroenterology, 2009. **136**(5): p. 1476-83.
28. Vachharajani, V. and S. Vital, *Obesity and sepsis.* J Intensive Care Med, 2006. **21**(5): p. 287-95.
29. Wisse, B.E., *The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(11): p. 2792-800.
30. Michie, H.R., *Metabolism of sepsis and multiple organ failure.* World J Surg, 1996. **20**(4): p. 460-4.
31. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.* Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
32. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
33. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
34. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases.* J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
35. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.* Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
36. Bogoyevitch, M.A., *The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting.* Bioessays, 2006. **28**(9): p. 923-34.
37. Mizukami, Y., et al., *A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion.* J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16657-62.
38. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway.* Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 14-21.
39. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.* Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
40. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome.* Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
41. Caenepeel, S., et al., *The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11707-12.
42. Plowman, G.D., et al., *The protein kinases of Caenorhabditis elegans: a model for signal transduction in multicellular organisms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13603-10.
43. Goldberg, J.M., et al., *The dictyostelium kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism.* PLoS Genet, 2006. **2**(3): p. e38.
44. Hunter, T. and G.D. Plowman, *The protein kinases of budding yeast: six score and more.* Trends Biochem Sci, 1997. **22**(1): p. 18-22.
45. Boudeau, J., et al., *Emerging roles of pseudokinases.* Trends Cell Biol, 2006. **16**(9): p. 443-52.
46. Kiss-Toth, E., et al., *Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades.* J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42703-8.
47. Sung, H.Y., et al., *Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific.* Immunol Lett, 2006. **104**(1-2): p. 171-7.
48. Hegedus, Z., A. Czibula, and E. Kiss-Toth, *Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects.* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(14): p. 1632-41.
49. Grosshans, J. and E. Wieschaus, *A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in Drosophila.* Cell, 2000. **101**(5): p. 523-31.
50. Mata, J., et al., *Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in Drosophila by regulating string/CDC25 proteolysis.* Cell, 2000. **101**(5): p. 511-22.

51. Rorth, P., K. Szabo, and G. Texido, *The level of C/EBP protein is critical for cell migration during Drosophila oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 23-30.
52. Wilkin, F., et al., *Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells.* Eur J Biochem, 1997. **248**(3): p. 660-8.
53. Kiss-Toth, E., et al., *Functional mapping and identification of novel regulators for the Toll/Interleukin-1 signalling network by transcription expression cloning.* Cell Signal, 2006. **18**(2): p. 202-14.
54. Yamamoto, M., et al., *Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency.* J Exp Med, 2007. **204**(9): p. 2233-9.
55. Sung, H.Y., et al., *Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways.* J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18379-87.
56. Storlazzi, C.T., et al., *MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene.* Hum Mol Genet, 2006. **15**(6): p. 933-42.
57. Rothlisberger, B., et al., *TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia.* Cancer Genet Cytogenet, 2007. **176**(1): p. 58-60.
58. Ashton-Chess, J., et al., *Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection.* J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(6): p. 1116-27.
59. Willer, C.J., et al., *Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease.* Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 161-9.
60. Kathiresan, S., et al., *Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia.* Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 56-65.
61. Tai, E.S., et al., *Polymorphisms at newly identified lipid-associated loci are associated with blood lipids and cardiovascular disease in an Asian Malay population.* J Lipid Res, 2009. **50**(3): p. 514-20.
62. Bisoffi, M., et al., *Expression profiles of androgen independent bone metastatic prostate cancer cells indicate up-regulation of the putative serine-threonine kinase GS3955.* J Urol, 2004. **172**(3): p. 1145-50.
63. Takasato, M., et al., *Trb2, a mouse homolog of tribbles, is dispensable for kidney and mouse development.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **373**(4): p. 648-52.
64. Keeshan, K., et al., *Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia.* Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 401-11.
65. Keeshan, K., et al., *Tribbles homolog 2 (Trib2) and HoxA9 cooperate to accelerate acute myelogenous leukemia.* Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(1): p. 119-21.
66. Argiropoulos, B., et al., *Linkage of Meis1 leukemogenic activity to multiple downstream effectors including Trib2 and Ccl3.* Exp Hematol, 2008. **36**(7): p. 845-59.
67. Zhang, Y., J.L. Davis, and W. Li, *Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display.* Mol Immunol, 2005. **42**(11): p. 1275-81.
68. Eder, K., et al., *Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes.* Int Immunol, 2008. **20**(12): p. 1543-50.
69. Lin, K.R., et al., *Survival factor withdrawal-induced apoptosis of TF-1 cells involves a TRB2-Mcl-1 axis-dependent pathway.* J Biol Chem, 2007. **282**(30): p. 21962-72.
70. Mayumi-Matsuda, K., et al., *Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **258**(2): p. 260-4.
71. Klingenspor, M., et al., *Altered gene expression pattern in the fatty liver dystrophy mouse reveals impaired insulin-mediated cytoskeleton dynamics.* J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23078-84.
72. Xu, J., et al., *TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1770**(2): p. 273-8.
73. Schwarzer, R., et al., *TRB3 is a PI 3-kinase dependent indicator for nutrient starvation.* Cell Signal, 2006. **18**(6): p. 899-909.

74. Selim, E., J.T. Frkanec, and R. Cunard, *Fibrates upregulate TRB3 in lymphocytes independent of PPAR alpha by augmenting CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) expression.* Mol Immunol, 2007. **44**(6): p. 1218-29.
75. Chinnadurai, G., *CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminaries.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1765**(1): p. 67-73.
76. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
77. Koo, S.H., et al., *PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3.* Nat Med, 2004. **10**(5): p. 530-4.
78. Du, K., et al., *TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver.* Science, 2003. **300**(5625): p. 1574-7.
79. Matsushima, R., et al., *Effect of TRB3 on insulin and nutrient-stimulated hepatic p70 S6 kinase activity.* J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29719-29.
80. Kao, W.H., et al., *Alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes mellitus: atherosclerosis risk in communities study.* Am J Epidemiol, 2001. **154**(8): p. 748-57.
81. Wei, M., et al., *Alcohol intake and incidence of type 2 diabetes in men.* Diabetes Care, 2000. **23**(1): p. 18-22.
82. Yao, X.H. and B.L. Nyomba, *Hepatic insulin resistance induced by prenatal alcohol exposure is associated with reduced PTEN and TRB3 acetylation in adult rat offspring.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(6): p. R1797-806.
83. Koh, H.J., et al., *Skeletal muscle-selective knockout of LKB1 increases insulin sensitivity, improves glucose homeostasis, and decreases TRB3.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8217-27.
84. Prudente, S., et al., *The functional Q84R polymorphism of mammalian Tribbles homolog TRB3 is associated with insulin resistance and related cardiovascular risk in Caucasians from Italy.* Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2807-11.
85. Prudente, S., et al., *The TRIB3 Q84R polymorphism and risk of early-onset type 2 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 190-6.
86. Andreozzi, F., et al., *TRIB3 R84 variant is associated with impaired insulin-mediated nitric oxide production in human endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1355-60.
87. Okamoto, H., et al., *Genetic deletion of Trb3, the mammalian Drosophila tribbles homolog, displays normal hepatic insulin signaling and glucose homeostasis.* Diabetes, 2007. **56**(5): p. 1350-6.
88. Qi, L., et al., *TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism.* Science, 2006. **312**(5781): p. 1763-6.
89. Naiki, T., et al., *TRB2, a mouse Tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting AKT and C/EBPbeta.* J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24075-82.
90. Bezy, O., et al., *TRB3 blocks adipocyte differentiation through the inhibition of C/EBPbeta transcriptional activity.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(19): p. 6818-31.
91. Takahashi, Y., et al., *TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARgamma transcriptional activity.* J Lipid Res, 2008. **49**(4): p. 880-92.
92. Sherman, M.Y. and A.L. Goldberg, *Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases.* Neuron, 2001. **29**(1): p. 15-32.
93. Paschen, W. and A. Frandsen, *Endoplasmic reticulum dysfunction--a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain?* J Neurochem, 2001. **79**(4): p. 719-25.
94. Tajiri, S., et al., *CHOP is involved in neuronal apoptosis induced by neurotrophic factor deprivation.* FEBS Lett, 2006. **580**(14): p. 3462-8.
95. Feldman, D.E., V. Chauhan, and A.C. Koong, *The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors.* Mol Cancer Res, 2005. **3**(11): p. 597-605.
96. Zou, C.G. and R. Banerjee, *Homocysteine and redox signaling.* Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(5-6): p. 547-59.

97. Li, J., B. Lee, and A.S. Lee, *Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53.* J Biol Chem, 2006. **281**(11): p. 7260-70.
98. Bowers, A.J., S. Scully, and J.F. Boylan, *SKIP3, a novel Drosophila tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia.* Oncogene, 2003. **22**(18): p. 2823-35.
99. Ord, D., K. Meerits, and T. Ord, *TRB3 protects cells against the growth inhibitory and cytotoxic effect of ATF4.* Exp Cell Res, 2007. **313**(16): p. 3556-67.
100. Ohoka, N., et al., *TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death.* EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1243-55.
101. Corcoran, C.A., et al., *Genotoxic and endoplasmic reticulum stresses differentially regulate TRB3 expression.* Cancer Biol Ther, 2005. **4**(10): p. 1063-7.
102. Wu, M., et al., *SINK is a p65-interacting negative regulator of NF-kappaB-dependent transcription.* J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 27072-9.
103. Zhou, Y., et al., *E3 ubiquitin ligase SIAH1 mediates ubiquitination and degradation of TRB3.* Cell Signal, 2008. **20**(5): p. 942-8.
104. Prachiti, N., *Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice.* 2009.
105. Chichelnitzkiy, E., *HORMONAL-INFLAMMATORY INTERFERENCE IN THE CONTROL OF DE NOVO GLUCOSE PRODUCTION BY THE LIVER* in *DKFZ*. 2009, Ruprecht Karls Universität Heidelberg: Heidelberg.
106. Frost, S.C., R.A. Kohanski, and M.D. Lane, *Effect of phenylarsine oxide on insulin-dependent protein phosphorylation and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes.* J Biol Chem, 1987. **262**(20): p. 9872-6.
107. Reed, B.C. and M.D. Lane, *Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(1): p. 285-9.
108. Susan K. Fried2, N.M.-M. and *Adipose Tissue Protocols Culture of Adipose Tissue and Isolated Adipocytes.* Series: Methods in Molecular Biology, 2001. **Volume: 155** p. 197-212
109. Lindstrom, P., *The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice].* ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 666-85.
110. Laboratories, J. *http://jaxmice.jax.org/*. 2009 [cited.
111. Bertrand, F., et al., *Insulin activates nuclear factor kappa B in mammalian cells through a Raf-1-mediated pathway.* J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 24435-41.
112. Iwasaki, Y., et al., *Insulin exhibits short-term anti-inflammatory but long-term proinflammatory effects in vitro.* Mol Cell Endocrinol, 2009. **298**(1-2): p. 25-32.
113. Waki, H. and P. Tontonoz, *Endocrine functions of adipose tissue.* Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 31-56.
114. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway.* Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.
115. Nieto-Vazquez, I., et al., *Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha.* Arch Physiol Biochem, 2008. **114**(3): p. 183-94.
116. Jager, J., et al., *Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression.* Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 241-51.
117. Sur, R., et al., *Anti-inflammatory activity of parthenolide-depleted Feverfew (Tanacetum parthenium).* Inflammopharmacology, 2009. **17**(1): p. 42-9.
118. Kralisch, S., et al., *Proinflammatory adipocytokines induce TIMP-1 expression in 3T3-L1 adipocytes.* FEBS Lett, 2005. **579**(28): p. 6417-22.
119. Kato, S. and K. Du, *TRB3 modulates C2C12 differentiation by interfering with Akt activation.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(4): p. 933-8.
120. O'Brien, R.M. and D.K. Granner, *Regulation of gene expression by insulin.* Biochem J, 1991. **278 (Pt 3)**: p. 609-19.

121. Farooqi, I.S. and S. O'Rahilly, *Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis.* Am J Clin Nutr, 2009. **89**(3): p. 980S-984S.
122. Carroll, L., J. Voisey, and A. van Daal, *Mouse models of obesity.* Clin Dermatol, 2004. **22**(4): p. 345-9.
123. Clee, S.M. and A.D. Attie, *The genetic landscape of type 2 diabetes in mice.* Endocr Rev, 2007. **28**(1): p. 48-83.
124. Brun, P., et al., *Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(2): p. G518-25.
125. Amar, J., et al., *Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men.* Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1219-23.
126. Erridge, C., et al., *A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation.* Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1286-92.
127. Vitseva, O.I., et al., *Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 932-7.
128. Skipworth, R.J., et al., *Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumour interaction?* Clin Nutr, 2007. **26**(6): p. 667-76.
129. Tisdale, M.J., *Molecular pathways leading to cancer cachexia.* Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 340-8.
130. Argiles, J.M., et al., *Catabolic mediators as targets for cancer cachexia.* Drug Discov Today, 2003. **8**(18): p. 838-44.
131. Lundholm, K., et al., *Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors.* Cancer Res, 1994. **54**(21): p. 5602-6.
132. Permana, P.A., C. Menge, and P.D. Reaven, *Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(2): p. 507-14.
133. Sabapathy, K., et al., *Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation.* Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 713-25.
134. Nam, N.H., *Naturally occurring NF-kappaB inhibitors.* Mini Rev Med Chem, 2006. **6**(8): p. 945-51.
135. Hehner, S.P., et al., *Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta.* J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1288-97.
136. Hehner, S.P., et al., *The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex.* J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5617-23.
137. Rungeler, P., et al., *Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action.* Bioorg Med Chem, 1999. **7**(11): p. 2343-52.
138. Gilmore, T.D. http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/index.html. 2009 [cited 2009 20.8.2009].
139. Basak, S. and A. Hoffmann, *Crosstalk via the NF-kappaB signaling system.* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 187-97.
140. O'Shea, J.M. and N.D. Perkins, *Regulation of the RelA (p65) transactivation domain.* Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 4): p. 603-8.
141. Pujol, N., et al., *Distinct innate immune responses to infection and wounding in the C. elegans epidermis.* Curr Biol, 2008. **18**(7): p. 481-9.
142. Kathiresan, S., et al., *Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans.* Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 189-97.
143. Cadoudal, T., et al., *Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome.* Biochimie, 2005. **87**(1): p. 27-32.
144. Wakil, S.J. and L.A. Abu-Elheiga, *Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome.* J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S138-43.

145. Kim, K.H., *Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase.* Annu Rev Nutr, 1997. **17**: p. 77-99.
146. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors.* Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.
147. Steppan, C.M. and M.A. Lazar, *The current biology of resistin.* J Intern Med, 2004. **255**(4): p. 439-47.
148. Kusminski, C.M., P.G. McTernan, and S. Kumar, *Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes.* Clin Sci (Lond), 2005. **109**(3): p. 243-56.
149. Rajala, M.W., et al., *Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule-alpha in adipose tissue.* Mol Endocrinol, 2002. **16**(8): p. 1920-30.
150. Lu, S.C., et al., *Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro.* FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 158-62.
151. Kim, K.H., et al., *A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11252-6.
152. Gualillo, O., et al., *Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation.* Life Sci, 2000. **67**(20): p. 2433-41.
153. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.* Nature, 2002. **415**(6869): p. 339-43.
154. Kamohara, S., et al., *Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment.* Nature, 1997. **389**(6649): p. 374-7.
155. Covey, S.D., et al., *The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis.* Cell Metab, 2006. **4**(4): p. 291-302.
156. Barkett, M. and T.D. Gilmore, *Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors.* Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6910-24.
157. Graham, B. and S.B. Gibson, *The two faces of NFkappaB in cell survival responses.* Cell Cycle, 2005. **4**(10): p. 1342-5.
158. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
159. Orlicky, D.J. and J. Schaack, *Adenovirus transduction of 3T3-L1 cells.* J Lipid Res, 2001. **42**(3): p. 460-6.
160. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

6.2 Abbildungen

Abb. 1.1: Weltkarte der Prävalenz von Adipositas nach Erhebung der WHO 2005. S. 1

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Gründe für und Auswirkungen von Adipositas. S. 4

Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über JNK und NF-κB. S. 7

Abb. 1.4: Sequenzhomologie der murinen TRB1, TRB2 und TRB3-Proteinsequenz. S. 8

Abb. 2.1: Tribbles-Genexpression in peripheren Geweben von C57BLKS Mäusen S. 18

Abb. 2.2: Tribbles-Genexpression in Wildtyp- (Wt), db/db- und ob/ob-Mäusen unter Hunger und Futter. S. 19

Abb. 2.3: Tribbles-Genexpression im polygenetischen Adipositas Mausmodell NZO S. 20

Abb. 2.4: Tribbles-Genexpression in epididymalem Fettgewebe von C57BL/6 Mäusen nach 12 Wochen Hochfettdiät (HFD) und normaler Diät (NFD). S. 21

Abb. 2.5: Einfluss von Leptin auf die TRB1-Expression in Wt- und ob/ob-Tieren und 3T3-L1 Adipozyten. S. 22

Abb. 2.6: Tribbles-Genexpression im epdidymalen Fettgewebe unter septischen Bedingungen. S. 23

Abb. 2.7: Expression von TRB1 unter kachektischen Bedingungen im Fettgewebe. S. 25

Abb. 2.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von differenzierten 3T3-L1 und primären inguinalen Adipozyten nach Öl-Rot-O Färbung. S. 26

Abb. 2.9: TRB1-Expression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit Insulin S. 27

Abb. 2.10: Expression der Tribbles-Gene in Makrophagen und Adipozyten nach proinflammatorischer Stimulation. S. 29

Abb. 2.11: Tribbles-Genexpression in primären Wt- und TLR4-ko-Adipozyten nach Stimulation mit LPS, M und CM. S. 30

Abb. 2.12: TRB1-Expression in 3T3-L1 Zellen nach der Stimulation mit denaturiertem konditioniertem Medium. S. 31

Abb. 2.13: Milliplex Analyse des CM und M. S. 33

Abb. 2.14: TRB1-Expression nach Stimulation mit TNF-α und IL-1β in Adipozyten. S. 34

Abb. 2.15 Der Einfluss von JNK1 auf die TRB1-Expression S. 35

Abb. 2.16: Einfluss der Inhibition aller drei JNK-Proteine auf die Induktion der TRB1-Expression. S. 36

Abb. 2.17: Einfluss von p50 auf die Induktion der TRB1-Expression nach Stimulation mit CM. S. 37

Abb. 2.18: Einfluss der Inhibition von NF-κB auf die Induktion von TRB1 nach Stimulation mit CM. S. 38

Abb. 2.19: Einfluss der PI-3K (A), p38 (B), Erk (C) und PKA (D) auf die Expression von TRB1. S. 39

Abb. 2.20: Analyse der miRNAs. S. 40

Abb. 2.21: Herstellung miRNA1604 stabil exprimierender 3T3-L1 Zellen. S. 43

Abb. 2.22: Analyse des Einflusses der shRNA auf die TRB1 Expression. S. 45

Abb. 2.23: Analyse des durch shRNA exprimierende Adenoviren vermittelten Knockdowns auf die TRB1-Expression in Adipozyten. S. 46

Abb. 2.24: Expression von proinflammatorischen Genen und Sekretion von Zytokinen in und von primären und 3T3-L1 Adipozyten nach TRB1-Knockdown. S. 48

Abb. 2.25: Expression von am Stoffwechsel beteiligter Gene in primären und 3T3-L1 Adipozyten nach TRB1-Knockdown S.51

Abb. 2.26: Sekretion von Adipokinen von mit TRB1 shRNA behandelten Adipozyten. S. 53

Abb. 2.27: Analyse des Körperfettanteils in TRB1$^{+/-}$-Mäusen. S. 54

Abb. 2.28: Genexpressionsprofil nach LPS Behandlung im Fettgewebe von TRB1$^{+/-}$-Mäusen S. 55

Abb. 2.29. Blutzucker-, Seruminsulinkonzentration und Blutfettwerte der TRB1$^{+/-}$- und Wt-Mäuse nach LPS-Behandlung. S. 57

Abb. 2.30 Analyse der Funktion von TRB1 S. 62

Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Regulation der TRB1 Expression und dessen Einfluss auf die NF-κB abhängige Transkription S. 76

Abb. 4.1: Herstellung eines gegen das murine TRB1 gerichteten Antikörpers S.110

6.3 Tabellen

Tab. 2.1 Serumanalyse der mit PBS bzw. LPS behandelten Wt- und TRB1$^{+/-}$-Mäuse S. 57

Tab. 2.2 Chromatin-Immunopräzipitation von TRB1-Flag an Cytokinpromotoren S. 59

Tab. 4.1 Primer und Zielvektoren S. 77

Tab. 4.2 Restriktionsenzyme und Puffer (New England Biolabs, NEB) S. 78

Tab. 4.3 Plasmide und verwendete Sequenzierungsprimer S. 81

Tab. 4.4 qPCR Sonden S. 83

Tab. 4.5 Zytokine und proinflammatorische Stimulantien S. 89

Tab. 4.6 Inhibitoren S. 90

Tab. 4.7 miRNA-Sequenzen S.91

Tab. 4.8: shRNA und miRNA Sequenzen für Adenoviren S. 93

Tab. 4.9: Zusammensetzung der SDS-Gele S. 99

Tab. 4.10 Antikörper S.100

Tab. 4.11 Antikörper für Chromatin-Immunopräzipitation S.104

Tab. 4.12 Primer für ChIP S.104

Tab. 4.13 Primer für pET21d-TRB1-Konstrukte S.105

6.4 Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten, sowie der Einbuchstabencode für Aminosäuren verwendet.

Abkürzung	Begriff
°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarrad
µg	Mikrogramm
12-LOX	12-Lipoxygenase
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABP	Aprotinin, Biotin, Pantothensäure
ACC	Acetyl-Coenzym Carboxylase
AcLDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein
a-FABP	Fatty acid binding protein
AML	Akute myeloide Leukämie
AMP	antimicrobial peptide
AP-1	Activating protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATF4	Activating transcriptionfactor 4
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar
C	Cytosin
C/EBP	CCAAT/Enhancer binding protein
cdk-1	Cyclin-dependent kinase-1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHOP	C/EBP homologue protein
CIP	Calf intestine phosphatase
CM	conditioned medium
COP1	Constitutive photomorphogenic protein 1
CAD	coronary artery disease
CRP	C-reactive Protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CtIP	CtBP-interacting protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethyleneglykoltetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
Erk	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FAS	Fatty acid synthase
fld	fatty liver dystrophy
FCS	Fetal calf serum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
G	Guanidin
h	Stunde
HEK	human embryonic kidney

HFD	High fat diet (Hochfettdiät)
HDL	High density lipoprotein
HoxA9 (	Homöobox A9
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
Hz	Hertz
IB	Immunoblot
IBMX	3-Isobuthyl-1-methylxanthin
IFN-γ	Interferon gamma
IKK-()	Inhibitor κB Kinase
IL-12(p40),	Interleukin 12 (p40)
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IκB	Inhibitor κB
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
JNK	c-jun NH2-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
ko	knockout
kV	Kilovolt
LB	Luria Broth
LIF	Leukocyte inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	Molar
MAPK	Mitogen activated kinase
MAPKK	Mitogen activated kinase kinase
MAPKKK	Mitogen activated kinase kinases kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Million
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP-1β	Macrophage inflammatory protein 1 beta
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
miRNA	MikroRNA
MOI	Multiplicity of Infection
MCP-1	Monocyte chemotatic protein-1
MRI	magnet resonance imaging
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NAA	nicht essentielle Aminosäuren
NaAc/HAc	Natriumacetat/Essigsäure
NEFA	nicht veresterte Fettsäuren
NFD	Normalfettdiät
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
NZB	New Zealand Black
NZO	New Zealand Obese
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
S6K1	p70 S6 Kinase
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PBS	Phophate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
pH	Pondus hydrogenii
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI-3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PPAR-α	Peroxisome proliferator activator receptor alpha
qPCR	quantitative Real Time PCR
RHD	Rel homology Domain
RIPA	Radioimmunopräzipitationspuffer
RLU	relative Luciferase Unit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minutes
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s	Sekunde
S	Svedberg, Sedimentationskoeffizient
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SEM	Standard Error of Mean
shRNA	short Hairpin RNA
SIAH1	Seven in absentia homolog 1
SKT11	Serin/Threonin Kinase 11
slbo	slow-border
SNP	Single nucleotide polymorphism
SVF	Stromale vaskuläre Fraktion
Tab.	Tabelle
TAD	Transactivation domain
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TCID50	Tissue culture infectious dose 50
TG	Trigyzerid
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line
TLR	Toll like Rezeptor
TNFR1/R2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 und 2
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRB1	Tribbles 1
TRB2	Tribbles 2
TRB3	Tribbles 3
U	Unit
UV	Ultraviolett
VCP	Valosin containing protein
VSMC	vascular smooth muscle cells
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
Ω	Ohm