

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Gödecke

Die Bedeutung der p38 MAP-Kinase α bei der adipogenen Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nastassia Stella Kokinopulos

(2022)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

Für Doris und Dimitris

Zusammenfassung deutsch

p38MAP-Kinasen (*engl. Mitogen-Activated Protein Kinases*) stellen zentrale Schaltstellen für vielfältige zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Entzündungsreaktionen dar. Von den vier bisher bekannten Isoformen wird in Adipozyten vorwiegend die α -Isoform exprimiert. Der Einfluss der p38MAPK α auf den adipogenen Differenzierungsprozess ist noch nicht vollständig geklärt. Frühere Studien erzielten kontroverse Resultate hinsichtlich der adipogenen Differenzierung mittels pharmakologischer Inhibition der p38MAPK α .

In dieser Arbeit wurden mittels der CRISPR/Cas Methode und lentiviraler Transfektion 3T3-L1 Präadipozyten mit einem Cas9/gRNA-Konstrukt infiziert, das für die p38MAPK α spezifisch war. Nach der Infektion und Selektion der Puromycin-resistenten Zellen wurden Wildtyp- und Knock-out-Zellen zu Adipozyten differenziert. Der Erfolg des Knock-outs wurde mittels Western-Blot-Analyse bestätigt. Die Menge an p38MAPK α war in den 3T3-L1 Zellen gegenüber den 3T3-L1 Knock-out-Zellen 8-fach erhöht. Dieser Knock-out blieb auch nach der Differenzierung zu Adipozyten erhalten. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die p38MAPK α für die Adipogenese essenziell ist, wurden spezifische Adipozytenmarker mittels qRT-PCR (*engl. quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) analysiert.

Im Vergleich zum Wildtyp war in ausdifferenzierten p38MAPK α -Knock-out-Zellen die Expression der Adipozytenmarker Leptin, Adiponektin, FABP4 (*engl. Fatty Acid Binding Protein*) und Perilipin 5 reduziert.

Der Transkriptionsfaktor PPAR- γ (*engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma*) und der Transkriptions-Koaktivator PGC1 α (*engl. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*) waren in den Knock-Out-Zellen nur marginal exprimiert. Darüber hinaus zeigte sich die Expression des Insulinrezeptors um die Hälfte reduziert, während die Expression des IGF-1-Rezeptors (*engl. Insulin-like Growth Factor-1*) in Abwesenheit der p38MAPK α um das 100-fache anstieg.

GLUT4 (Glukose Transporter 4) kommt in Adipozyten, nicht jedoch in 3T3-L1 Zellen vor und wird so als metabolischer Adipozytenmarker bezeichnet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit der p38MAPK α zu einer deutlichen Reduktion der Expression und der Proteinmenge von GLUT4 in den Adipozyten führte, während die Expression von GLUT1 nicht durch die p38MAPK α beeinflusst wurde.

Die Expression des Entkopplungsproteins UCP1 (*engl. Uncoupling Protein*), welches insbesondere in braunem und in geringeren Mengen auch in weißem Fettgewebe vorkommt und primär der Wärmegenerierung dient, unterlag ebenfalls dem Einfluss der p38MAPK α und zeigte sich in den Knock-out-Zellen reduziert. Die Expression von UCP3 zeigte sich ebenfalls in den Knock-out-Zellen vermindert. Ein Einfluss der p38MAPK α auf die Expression von UCP2 wurde nicht festgestellt.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die p38MAPK α eine wichtige Rolle in der Adipogenese einnimmt und somit möglicherweise für die Entstehung von Adipositas mitverantwortlich ist. Der fördernde Effekt der p38MAPK α auf die Insulinrezeptor-Expression könnte darüber hinaus auf eine Rolle der p38MAPK α in der Pathogenese von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes Mellitus hindeuten.

Zusammenfassung englisch

p38 MAPK (mitogen-activated protein kinases) are key elements of intracellular signaling pathways that play an essential role in several cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, and inflammation. Out of the four isoforms known so far, the α -isoform is the one that is predominantly expressed in adipocytes. The effects of p38MAPK α in adipocyte differentiation are only partially understood. Several studies detected controversial results regarding alterations in adipocyte differentiation when the p38MAPK α was pharmacologically inhibited.

Using the CRISPR/Cas method and lentiviral transfection, 3T3-L1 preadipocytes were infected with a Cas9/gRNA construct which was specific for the p38MAPK α . After selection of the infected cells by puromycin, wildtype and knock-out cells underwent adipocyte differentiation. The success of the knock-out procedure was determined via western blot analysis. p38MAPK α content was eight times higher in 3T3-L1 cells than in 3T3-L1 knock-out cells. This knock-out remained stable after differentiation.

To prove the hypothesis that the p38MAPK α is essential for adipogenesis, specific adipocyte markers were analyzed by using qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction). The expression of the adipocyte markers leptin, adiponectin, FABP4 (fatty acid binding protein), and perilipin 5 was lower in knock-out adipocytes compared to the wildtype. The transcription factor PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma) and the transcription coactivator PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α) were only marginally expressed in the knock-out cells.

Furthermore, the expression of the insulin receptor was halved, while the expression of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor increased 100-fold in the absence of p38MAPK α .

GLUT4 (glucose transporter 4) is expressed in adipocytes, but not in 3T3-L1 cells and is thus called a metabolic adipocyte marker. In this work, the amount of both, GLUT4 protein and mRNA was reduced in knock-out adipocytes, while the expression of GLUT1 was not affected by the p38MAPK α knock-out.

The expression of the uncoupling protein UCP1, which occurs in brown and in smaller amounts in white adipose tissue and serves thermogenesis, was also subject to the influence of p38MAPK α and was reduced in the knock-out cells. The expression of UCP3 was also reduced in the knock-out cells. The UCP2 expression was not altered in the p38MAPK α knock-out cells.

In summary, these data indicate that the p38MAPK α plays an essential role in adipogenesis and could therefore represent a factor in the development of obesity. Due to the promoting effect of p38MAPK α on insulin receptor expression, it is conceivable that p38MAPK α may be involved in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ADRP	Adipose differentiation-related protein
aP2	Adipocyte protein 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF2	Activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Brown adipose tissue
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP Domäne	Basic Leucine Zipper Domain
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
Ca Cl ₂	Calziumchlorid
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
Cas-9	CRISPR-associated 9
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH ₃ COOH	Essigsäure
CREB	cAMP response element-binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA
CT	Threshold cycle, Schwellenwertzyklus
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ERK1/ERK2	Extracellular-signal-regulated kinase 1/2
ERK5/BMK1 protein Kinase 1	Extracellular-signal-regulated kinase 5/ Big mitogen activated
EtOH	Ethanol
FABP4	Fatty Acid Binding Protein
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GLUT	Glukosetransporter
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HDR	Homology-Directed Repair,
HSL	Hormonsensitive-Lipase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF1-R	Insulin like Growth Factor 1 Receptor
IL-1	Interleucin 1
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JNK/SAPK	c-Jun-amino-terminal kinase/Stress-Activated Phospho-Kinases
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock-Out
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharid
M6PRBP1	Mannose-6-Phosphate Receptor Binding Protein 1
MAPKAPK2	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase aktivierte Protein-Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinasen
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase
MEF	Myocyte Enhance Factor
MnCl ₂	Mangan (II) Chlorid
MNK1	Mitogen-activated protein-Kinase Interaction Protein Kinase
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MSK	Mitogen- and Stress activated Kinase
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

NEAA	Non-Essential Amino Acids
NHEJ	Non-homologous end joining
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PGC1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
PRAK	P38 regulated/activated Kinase
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate, Natriumdodecylsulfat
sgRNA	Single guide RNA
SV40	Simian virus 40
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline+Tween
TE	Tris/ EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFB	Transformation Buffer
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPS	Total Protein Stain
tracrRNA	Trans activating CRISPR RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCP	Uncoupling Protein
WAT	White adipose tissue
WBA	Western Blot Analysen
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung deutsch	I
Zusammenfassung englisch.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Funktion des Fettgewebes im Körper	1
1.1.1 Entkopplung der Atmungskette im braunen Fettgewebe.....	2
1.2 Entwicklung des Fettgewebes.....	3
1.2.1 Regulation der Adipogenese auf molekularer Ebene	4
1.2.2 Stoffwechselaktivität der Adipozyten.....	7
1.3 Signaltransduktion in Adipozyten	7
1.3.1 p38MAP-Kinasen	9
1.4 Klinische Bedeutung des Fettgewebes	12
1.5 Fragestellung	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Verwendete Geräte.....	14
2.2 Antikörper	15
2.2.1 Primäre Antikörper	15
2.2.2 Sekundäre Antikörper	15
2.3 Primer.....	15
2.4 CRISPR/Cas Methode	16
2.5 Herstellung von Lentiviren.....	18
2.5.1 Transfektion von HEK-293-T Zellen	19
2.5.2 Infektion von 3T3-L1 Zellen	19
2.6 Vektoren für die Herstellung von p38MAPKα KO-Zellen	20
2.6.1 Transformation kompetenter Escherichia Coli (E. coli) Bakterien	21
2.6.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien.....	22
2.7 Zelllinien.....	23
2.7.1 HEK-293-T Zellen.....	23
2.7.2 3T3-L1 Zellen	24
2.7.3 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen	24
2.7.4 3T3-L1 Zellen Differenzierung	24
2.7.5 Ölrot-O-Färbung	25
2.8 Proteinanalyse	26
2.8.1 Proteinisolierung.....	26

2.8.2	Konzentrationsbestimmung (BCA Assay).....	27
2.8.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer.....	27
2.8.4	Western Blot	28
2.8.5	Immundetektion von Proteinen.....	29
2.9	Transkriptionsanalyse	30
2.9.1	mRNA Isolierung und reverse Transkription	30
2.9.2	RT-qPCR	31
2.10	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Charakterisierung der p38MAPKα Knock-Out Zelllinien	33
3.2	Verminderte Differenzierung der 3T3-L1 Zellen in Abwesenheit der p38MAPKα.....	34
3.2.1	Reduzierte Expression von Adipozytenmarkern in p38MAPK α KO-Adipozyten.....	37
3.2.2	Reduzierte PPAR γ und PPAR γ C1a Expression in p38MAPK α KO-Adipozyten.....	44
3.2.3	Reduzierte Expression von UCP 1 und UCP 3 in p38MAPK α KO-Adipozyten.....	47
3.3	Expression der Glukose Transporter 4 und Glukose Transporter 1 in Abhängigkeit von der p38MAPKα in Adipozyten.....	51
3.3.1	54
3.4	Vermehrte IGF-1-Rezeptor Expression in Abwesenheit der p38MAPKα.....	56
3.5	Verminderte Expression des Insulinrezeptors in p38MAPKα KO-Zellen.....	58
4	Diskussion	60
4.1	Erfolgreicher p38MAPKα KO mittels CRISPR/Cas Methode in 3T3-L1 Präadipozyten.....	61
4.2	In Abwesenheit der p38MAPKα zeigte sich eine verminderte adipogene Differenzierung	62
4.2.1	Die Expression von Perilipin 5 wird von der p38MAPK α reguliert.	64
4.3	Die p38MAPKα reguliert die Expression von PPAR-γ in Adipozyten	64
4.3.1	Verminderte Expression von FABP4 bei Abwesenheit der p38MAPK α . ..	65
4.4	Die Abwesenheit der p38MAPKα ist mit einer reduzierten Expression des GLUT4 in Adipozyten assoziiert	66
4.5	Der Einfluss der p38MAPKα auf verschiedene Entkopp-lungsproteine ..	67
4.6	Regulation des IGF-1- und Insulinrezeptors über die p38MAPKα	69
5	Schlussfolgerungen	71
6	Literatur und Quellenverzeichnis	71
7	Danksagung	84

1 Einleitung

1.1 Funktion des Fettgewebes im Körper

Fettgewebe befindet sich an verschiedenen Stellen des Körpers und besteht hauptsächlich aus Adipozyten (Cinti 2012), aber auch Präadipozyten, sympathische Nervenzellendigungen, Gefäßstrukturen, mesenchymale Stammzellen und mononukleäre Zellen sind wichtige Bestandteile des Fettgewebes (Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004, Frontini and Cinti 2010).

Fettgewebe kann in weißes (*engl. white adipose tissue, WAT*), braunes (*engl. brown adipose tissue, BAT*) und beiges Fettgewebe (Wu, Bostrom et al. 2012) unterteilt werden. Dabei weisen die drei Fettgewebsarten unterschiedliche makro- und mikroskopische Merkmale auf und haben unterschiedliche Funktionen im Körper.

Weißes Fettgewebe besteht hauptsächlich aus univakuolären Fettzellen, welche sich zu 80% im subkutanen und 20% im viszeralen Fettgewebe verteilen. Es differenziert sich schon während der Embryonalentwicklung aus mesenchymalen Stammzellen und findet sich lebenslang im menschlichen Körper. Der Durchmesser einer weißen Fettzelle kann je nach Ernährungszustand variieren und beträgt somit zwischen 20- und 200µm (Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004).

Hauptaufgabe des weißen Fettgewebes ist die Energiespeicherung- und bereitstellung in Form von Triglyceriden. Seit der Entdeckung und Charakterisierung des Hormons Leptin im Jahre 1994 wird das Fettgewebe zusätzlich als endokrines Organ bezeichnet (Adamczak and Wiecek 2013), da das Fettgewebe durch die Sekretion von verschiedenen Peptiden, Enzymen und Fettsäuren eine Wirkung sowohl auf lokale (autokrine, parakrine) als auch systemische (endokrine) Signalwege des Körpers haben kann. Darüber hinaus besitzt das Fettgewebe an bestimmten Stellen des Körpers eine mechanische Schutzfunktion (Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004).

Braunes Fettgewebe findet sich beim Menschen v.a. während der embryonalen und neonatalen Entwicklung und dient über die Entkopplung der Atmungskette durch UCP1 (*engl. uncoupling protein 1*) v.a. der Thermogenese (Cypess, Lehman et al. 2009). Es ist im Gegensatz zum weißen Fettgewebe stärker vaskularisiert und besitzt mehrere intrazelluläre Fetttropfen. Durch den hohen Gehalt an Mitochondrien erscheinen die

Fettzellen braun. Charakteristisch für das braune Fettgewebe ist außerdem die direkte sympathische Innervation (Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004).

Beiges Fettgewebe weist sowohl Merkmale des braunen als auch des weißen Fettgewebes auf (Wu, Bostrom et al. 2012) und entsteht unter bestimmten Zuständen wie z.B. Kälteeinfluss (Wirth and Hauner 2013) innerhalb des weißen Fettgewebes. Es weist, wie auch braune Fettzellen eine bestimmte Menge an UCP1 auf (Chen, Pan et al. 2016).

1.1.1 Entkopplung der Atmungskette im braunen Fettgewebe

Damit eine suffiziente Muskelarbeit des Körpers gewährleistet werden kann, muss unter jedem Umstand die Bereitstellung von Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) sichergestellt sein. Im Organismus von Säugetieren werden grob zwei unterschiedliche Arten der Energiebereitstellung beobachtet: Der aerobe (Energiegewinn unter Verbrauch von Sauerstoff) und der anaerobe (Energieproduktion ohne Sauerstoffverbrauch) Stoffwechselweg. Kern der aeroben Energiegewinnung ist die oxidative Phosphorylierung. In diesem Prozess erfolgt die Herstellung eines Protonengradientens über die Komplexe der Atmungskette (innere Mitochondrienmembran) und anschließend die Umwandlung der protonenmotorischen Kraft in ATP (Chance and Williams 1956, Saraste 1999). Unter physiologischen Umständen in Ruhe oder konstanter körperlicher Anstrengung, stellt die oxidative Phosphorylierung die Hauptquelle der Energiebereitstellung dar.

Der anaerobe Stoffwechsel wird aktiviert, wenn der zelluläre Energiebedarf durch den aeroben Stoffwechsel aufgrund eines begrenzten Sauerstoffangebots oder ausgereizter Kapazität des aeroben Stoffwechsels nicht ausreichend gedeckt werden kann. Dabei ist zu beachten, dass der anaerobe Stoffwechsel unterstützend zum aeroben Stoffwechsel wirkt und unter Umständen mit einem Anstieg von Laktat einhergeht. Somit wird der anaerobe Stoffwechsel unter physiologischen Bedingungen z.B. während starker physischer Belastung beobachtet, aber auch unter pathologischen Umständen, wie z.B. kardialer Ischämie (Skinner and McLellan 2013, Oleinikov 2019).

Eine Sonderstellung in der Energiebereitstellung wird im braunen Fettgewebe beobachtet. Dabei dient das braune Fettgewebe v.a. der Thermogenese. Die Fähigkeit

des braunen Fettgewebes zitterfreie Wärme zu produzieren, wird durch das Protein UCP1 gewährleistet. Es handelt sich um einen Protonenkanal, welcher sich genau wie die Komplexe der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran befindet und weist eine hohe Protonenleitfähigkeit auf. Somit wird der durch die Atmungskette generierte Protonenfluss durch UCP1 umgeleitet und die durch Substratoxidation gewonnene Energie in Wärme umgewandelt (Abb. 1) (Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004). Einige Jahre nach der Entdeckung von UCP1 wurden weitere homologe Isoformen von UCP1 entdeckt (UCP2, UCP3, UCP4 und UCP5). UCP2 und UCP3 werden ebenfalls genau wie UCP1 im Fettgewebe exprimiert, während die anderen zwei Isoformen v.a. in Nervenzellen zu finden sind (Vidal-Puig, Solanes et al. 1997, Pedersen, Bruun et al. 2001, Thompson and Kim 2004, Ramsden, Ho et al. 2012). Die Funktion von UCP2 und UCP3 ist weitgehend unbekannt. Dennoch werden sie in verschiedenen Studien als potenzielle therapeutische Ziele bei degenerativen Erkrankungen, Adipositas und Diabetes diskutiert. Unter speziellen pharmakologischen Konditionen [z.B. durch Aktivierung von ROS (*engl. reactive oxygen species*)] können UCP2 und UCP3 auch zur Thermogenese beitragen (Brand and Esteves 2005).

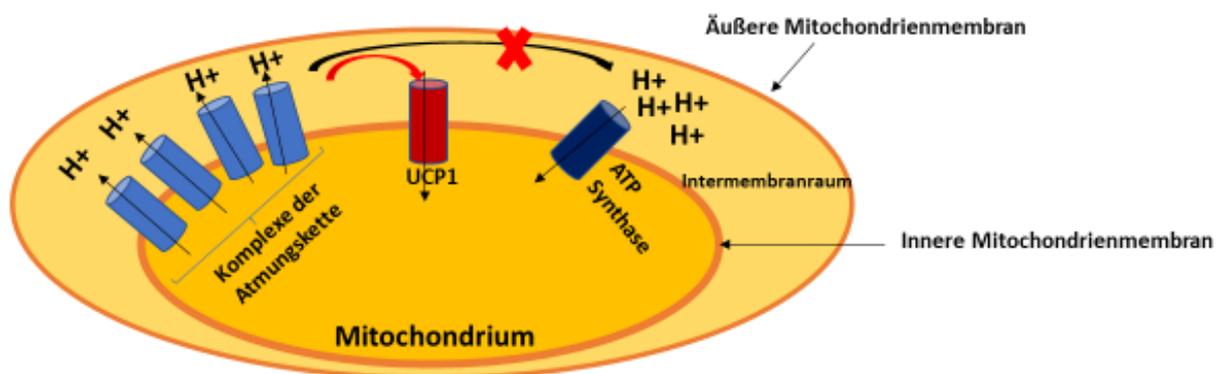


Abb.1: Schematische Darstellung der Atmungskette und der Funktion von UCP1 (*engl. uncoupling protein 1*). Die Komplexe der Atmungskette befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran. Durch einen konstanten Elektronentransfer zwischen den Komplexen wird durch Substratoxidierung Energie erzeugt, welche den Transfer von Protonen vom Zellinneren in den Intermembranraum ermöglicht. Physiologisch werden die Protonen über die ATP-Synthase (*Adenosintriphosphat-Synthase*) zurück in die Mitochondrienmatrix befördert. Dadurch wird mittels Phosphorylierung Energie in Form von ATP hergestellt. In den braunen Fettzellen wird der durch die Atmungskette generierte Protonenfluss über UCP1 umgeleitet, sodass die Energie der Elektronen nicht in ATP, sondern Wärme umgewandelt wird.

1.2 Entwicklung des Fettgewebes

Fettzellen sind bereits während der embryonalen Entwicklung sichtbar. Dabei ist bekannt, dass sich das Fettgewebe zunächst aus mesenchymalen Stammzellen

entwickelt und somit aus dem Bindegewebe hervorgeht. (Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004). Genauer entsteht aus einer pluripotenten Stammzelle eine mesenchymale Stammzelle, welche sich weiter in einen Präadipozyten differenziert. Während der genaue Mechanismus der Determinierung einer mesenchymalen Stammzelle in einen Präadipozyten noch weitgehend unbekannt bleibt, ist der Prozess der Differenzierung von Präadipozyten in reife Adipozyten (Adipogenese) relativ gut erforscht. Green et. al, konnten 1974 eine Zelllinie aus Mäusen isolieren (3T3-L1 Zellen), welche morphologisch den Fibroblasten zwar sehr ähnlich ist, allerdings schon zur Differenzierung in Adipozyten vorprogrammiert ist. So kann diese Zelllinie unter bestimmten Bedingungen [cAMP (*engl. cyclic adenosine monophosphate*), Insulin] in Fettzellen differenziert werden. Wichtig für die Differenzierung ist, dass die 3T3-L1 Zellen Ihre Proliferation einstellen, denn eine Akkumulation von Triglyzeriden ist nur in nicht proliferierenden Zellen möglich (Green and Kehinde 1974, Green and Meuth 1974).

1.2.1 Regulation der Adipogenese auf molekularer Ebene

Für die transkriptionelle Kontrolle der Adipogenese sind hauptsächlich die Transkriptionsfaktoren der C/EBP (*engl. CCAAT/Enhancer Binding Protein*) Familie und PPAR- γ (*engl. peroxisome proliferator activated receptor gamma*) verantwortlich (Gregoire, Smas et al. 1998). Es sind zwei Isoformen (PPAR- γ 1 und PPAR- γ 2) des Transkriptionsfaktors PPAR- γ bekannt (Fajas, Auboeuf et al. 1997). Es wird angenommen, dass beide Isoformen während der Adipozytendifferenzierung essentiell sind, ihr relativer Beitrag ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Aprile, Ambrosio et al. 2014). Es wird vermutet, dass v.a. PPAR- γ 2 an der Adipogenese beteiligt ist, da dieser im Vergleich zu PPAR- γ 1 exklusiv in Adipozyten exprimiert wird (Ren, Collingwood et al. 2002). Die Aktivität von PPAR- γ wird häufig über das Protein PGC1 α (*engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) reguliert. PGC1 α wird von dem PPARGC1 α Gen kodiert und bildet mit PPAR- γ ein Komplex, welcher die Transkription verschiedener Gene im Zellkern reguliert (Esterbauer, Oberkofler et al. 1999, Finck and Kelly 2007).

Die C/EBP Proteine gehören zu den Transkriptionsfaktoren mit bZIP Domäne (*engl. Basic Leucine Zipper Domain*), auch Leucin Zipper genannt und werden unter anderem

in Adipozyten exprimiert (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos 1998). Es sind insgesamt 6 C/EBP Transkriptionsfaktoren bekannt. Am Prozess der Adipogenese sind allerdings nur C/EBP α , C/EBP β und C/EBP δ beteiligt. Am Anfang des Differenzierungsprozesses finden sich hohe Proteinspiegel von C/EBP β/δ . C/EBP α dagegen wird erst in den letzten Schritten der Adipogenese beobachtet (Cao, Umek et al. 1991). Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass C/EBP β/δ die Expression von PPAR- γ induzieren und PPAR- γ wiederum für die Expression von C/EBP α verantwortlich ist (Rosen and Spiegelman 2000). PPAR- γ 2 ist für den Differenzierungsprozess unerlässlich (Tontonoz, Hu et al. 1994). Dagegen ist eine Differenzierung in Abwesenheit von C/EBP α zwar möglich, allerdings reagieren die differenzierten Zellen in Abwesenheit von C/EBP α nicht auf Insulin (Rosen 2005). Obwohl also PPAR γ ausreicht, um die adipogene Differenzierung zu initiieren, ist C/EBP α für die Etablierung eines insulinsensitiven Glukosetransports erforderlich. Für eine vollständige Differenzierung der Präadipozyten in Adipozyten ist somit das Zusammenspiel von PPAR- γ und C/EBP α notwendig (El-Jack, Hamm et al. 1999).

Eine wesentliche Rolle in der Adipogenese spielt auch das Protein FABP4 (*engl. fatty acid binding protein*), auch als aP2 (*engl. adipocyte protein 2*) bezeichnet, welches hauptsächlich in Adipozyten und myeloiden Zellen exprimiert wird (Garin-Shkolnik, Rudich et al. 2014). Dabei wird vermutet, dass FABP4 eine wichtige Rolle beim intrazellulären Fettsäuretransport zu Beginn der Differenzierung spielt (Samulin, Berget et al. 2008).

Wichtig für eine suffiziente Adipogenese ist auch das Hormon Insulin. Studien zufolge bewirkt Insulin in vitro die adipogene Differenzierung von mindestens 10-20% der Präadipozyten (Hauner, Entenmann et al. 1989, Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004, Maeda, Cao et al. 2005, Medina-Gomez, Gray et al. 2007, Wirth and Hauner 2013, Garin-Shkolnik, Rudich et al. 2014). Auch wenn Insulin eine 100fach höhere Bindungsaffinität für den Insulinrezeptor im Vergleich zum IGF-1-Rezeptor aufweist, wird vermutet, dass Insulin seine adipogene Wirkung v.a. über den IGF-1-Rezeptor entfaltet (Xu and Liao 2004). Der Insulinrezeptor scheint dagegen essenziell für die Determinierung der Adipogenese in Stammzellen zu sein (Gupta, De Jesus et al. 2018). Dies würde die höhere Menge an IGF-1-Rezeptor in 3T3-L1 Zellen im Vergleich zum Insulinrezeptor erklären (Smith, Wise et al. 1988). Während der adipogenen Differenzierung nimmt die Anzahl der Insulinrezeptoren zu, die Menge an IGF-1-

Rezeptor bleibt dagegen gleich (Reed and Lane 1980, Back and Arnqvist 2009). Somit ist die Menge an Insulinrezeptoren ca. 25fach erhöht in ausgereiften Adipozyten im Vergleich zu Präadipozyten (Smith, Wise et al. 1988), wohlmöglich weil der Insulinrezeptor in Adipozyten die Lipolyse und Glukoseaufnahme reguliert.

Fettgewebe besteht aus Zellen, welche Fetttropfen bilden. Diese werden in Säugetieren durch eine bestimmte Gruppe von Proteinen (Perilipin) umhüllt. Dabei dient die Umhüllung dem Schutz vor dem Abbau der Lipide durch die hormonsensitive Lipase (HSL). Es sind insgesamt fünf Proteine der Perilipin-Gruppe in Säugetieren bekannt. Während Perilipin 2 [ADRP (*engl. adipose differentiation-related protein*) oder adipophilin] und Perilipin 3 [M6PRBP1 (*engl. Mannose-6-phosphate receptor binding protein 1*), TIP47, PP17 oder PLIN3] fast ubiquitär auftreten, sind die restlichen Perilipin Formen, Perilipin 1 (*engl. lipid droplet-associated protein* oder PLIN), Perilipin 4 (PLIN4, KIAA1881, S3-12) und Perilipin 5 (Oxpatperilipin 5 oder PLIN5) eher für das Fettgewebe typisch (Sztalryd and Brasaemle 2017). Jede der fünf Perilipin Isoformen konnte auch in vitro in 3T3-L1 Adipozyten beobachtet werden (Brasaemle, Dolios et al. 2004).

Reife Adipozyten sezernieren Leptin und Adiponektin. Leptin und Adiponektin werden fast ausschließlich in Adipozyten exprimiert und werden somit allgemein als sog. Adipozytenmarker verwendet (MacDougald, Hwang et al. 1995, Nishizawa, Shimomura et al. 2002). Bei Leptin handelt es sich um ein Adipokin, welches die Blut-Hirn-Schranke durchschreiten kann und somit zentral im Bereich des Hypothalamus wirken kann. Dort reguliert es das Hunger -und Sättigungsgefühl im Körper. Zusätzlich dient Leptin allerdings auch als Mediator in zahlreichen endokrinen Prozessen des Körpers. Somit reguliert Leptin z.B. den Glukosemetabolismus und ist für die Reproduktion und das Immunsystem von großer Bedeutung (Wauters, Considine et al. 2000).

Adiponektin (*GBP-28, apM1, AdipoQ* und *Acrp30*) ist ein Peptidhormon, welches den Fett- sowie Glukosestoffwechsel beeinflusst und auch in der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Adipozyten möglicherweise involviert ist (Diez and Iglesias 2003, Fu, Luo et al. 2005).

1.2.2 Stoffwechselaktivität der Adipozyten

Fettgewebe spielt eine wichtige Rolle in der Energiespeicherung- und bereitstellung. Der Prozess der Herstellung von Triglyzeriden (Energiespeicherung) wird als Lipogenese bezeichnet, dieser des Abbaus von Triglyzeriden (Energiebereitstellung) als Lipolyse. Um diese Funktionen zu ermöglichen, müssen Fettzellen mit Energie versorgt werden. Eine der Hauptquellen des Energiestoffwechsels der Fettzellen stellt die Aufnahme von Glukose dar (Shepherd and Kahn 1999). Adipozyten nehmen Glukose über die GLUT1 (Glukosetransporter 1) und GLUT4 (Glukosetransporter 4) auf (Kilgour, Baldwin et al. 1995, Wirth and Hauner 2013). GLUT1 befinden sich in der Zellmembran der Zellen. Er wird fast ubiquitär exprimiert und ist für die konstante Glukoseaufnahme zuständig (Deng, Xu et al. 2014). Im Gegensatz dazu wird GLUT4 fast ausschließlich im Muskel- und Fettgewebe exprimiert. Er befindet sich gespeichert im Zytosol der Zellen und ist Teil eines tubulovesikulären Systems. Durch die Stimulierung mit Insulin transloziert GLUT4 an die Zellmembran und ist dort für die Glukoseaufnahme zuständig (Bryant, Govers et al. 2002). In Abwesenheit von Insulin transloziert GLUT4 von der Zellmembran zurück ins Zytoplasma (Jhun, Rampal et al. 1992). Präadipozyten verfügen über keinen GLUT4. Dieser Transporter wird erst während der Differenzierung zu Adipozyten exprimiert. Um eine erfolgreiche Expression von GLUT4 in Adipozyten zu gewährleisten sind sowohl PPAR- γ als auch C/EBP α notwendig (El-Jack, Hamm et al. 1999). Die aufgenommene Glukose wird von den Fettzellen in Form von Glykogen gespeichert oder der Energiegewinnung durch Glykolyse und mitochondrialer Oxidation zugeführt (Wirth and Hauner 2013).

1.3 Signaltransduktion in Adipozyten

Als Folge externer Veränderungen in der Umgebung eukaryotischer Zellen wird die Aktivierung eines komplexen Signaltransduktionsnetzwerkes beobachtet mit welchem, extrazelluläre Reize in eine Reihe von zellulären Reaktionen umgewandelt werden. Häufiges Motiv dieser Zellantwort auf extrazelluläre Reize ist die MAP-Kinase-Kaskade. MAP-Kinasen (*engl. mitogen activated protein kinases*) gehören zur Familie der Serin/Threonin Kinasen und regulieren als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Reize (Hormone, Wachstumsfaktoren, Stress) eine Vielzahl von Prozessen in einer Zelle. Ziel ist die Funktion der Zelle aufrechtzuhalten (Pearson, Robinson et al. 2001).

Genauer bilden MAP-Kinasen ein Netzwerk aus insgesamt drei sequenziell hintereinander geschalteten Protein Kinasen (MAP-Kinase-Kaskade) in welchem jede MAP-Kinase erst durch Phosphorylierung ihrer Serin oder/und Threonin Stellen aktiviert wird (Abb.2) (Obata, Brown et al. 2000). Dabei ist zu beachten, dass MAP-Kinasen Prolin-gerichtet sind und somit eine Serin oder Threonin Aminosäure nur phosphorylieren, wenn unmittelbar danach eine Prolin Aminosäure folgt (Pearson, Robinson et al. 2001). Insgesamt sind vier MAP-Kinase Kaskaden bekannt. Der ERK1/ERK2 (*engl. extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) Signalweg, der JNK/SAPK (*engl. c-Jun-amino-terminal kinase/stress-activated phospho-kinases*) Signalweg, der ERK5/BMK1 (*engl. extracellular-signal-regulated kinase 5/. Big MAP Kinase 1*) und der p38MAPK/RK/HOG Signalweg. Funktion dieser Kaskaden ist eine teilweise überlappende Regulation von Transkriptionsfaktoren, welche zur schnellen Aktivierung von Genen (v.a. zugehörig der Familie der *fos* und *jun*) führt (Hipskind and Bilbe 1998, Ono and Han 2000).

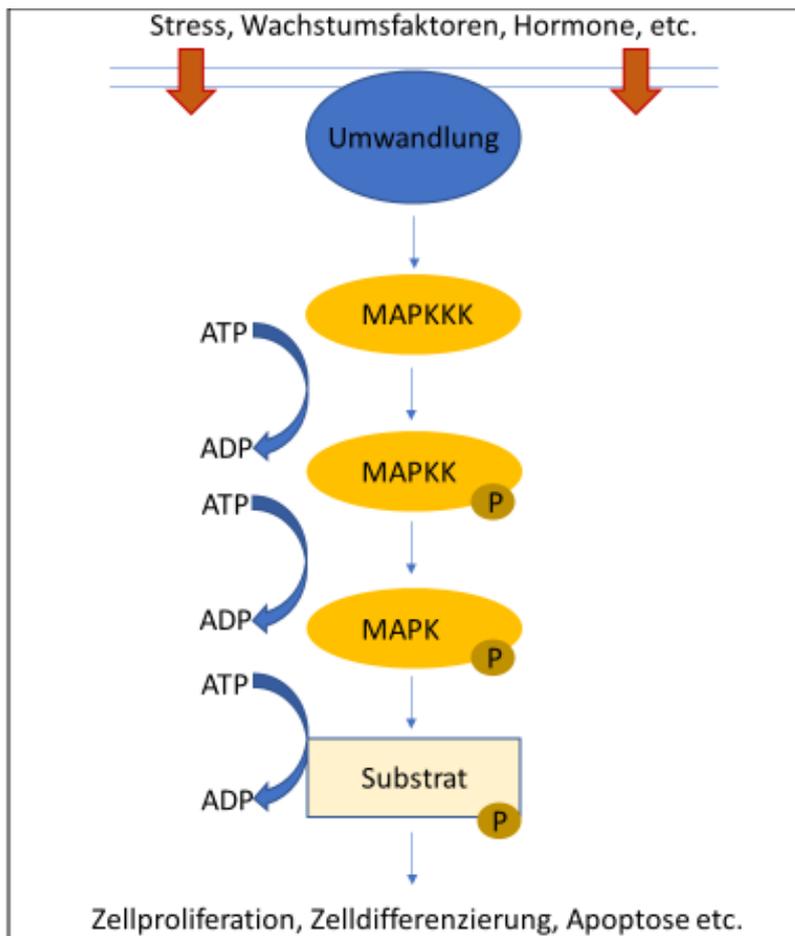


Abb. 2: Prinzip der Signalübertragung durch intrazelluläre Proteinkinase-Kaskaden. Die Intrazellulären Proteinkinasen verarbeiten Signale, welche durch zentrale Schaltstationen an der Innenseite der Zellmembran registriert und verarbeitet werden. Die MAP-Kinase-Kaskade (*engl. Mitogen Activated Protein Kinase*) umfasst drei Proteinkinasen, welche seriell hintereinandergeschaltet sind. Durch Aktivierung der verschiedenen

Kinasen über Phosphorylierung der jeweils vorgeschalteten Kinasen werden verschiedene Prozesse, wie z.B. Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose reguliert. Modifiziert nach (Krauss 1997)

1.3.1 p38MAP-Kinasen

p38MAP Kinasen sind an verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Entzündungsreaktionen beteiligt (Pearson, Robinson et al. 2001). Bisher sind von der p38MAP-Kinase vier Isoformen bekannt: α , β , γ und δ (Denise Martin, De Nicola et al. 2012). Die p38MAPK α (MAPK14= ubiquitär exprimiert) wurde erstmals im Rahmen einer Studie in Makrophagen isoliert, in denen nach Stimulation mit einem bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid oder LPS), Proteine identifiziert werden sollten, welche an ihren Tyrosin-Resten phosphoryliert werden (Han, Lee et al. 1994, Cuadrado and Nebreda 2010). Zeitgleich wurde die p38MAPK α von einer anderen Forschungsgruppe als spezifisches Ziel von Pyridinylimidazol-Derivaten gefunden, welche die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Monozyten hemmen (Lee, Laydon et al. 1994, Cuadrado and Nebreda 2010). Durch Klonierungsversuche wurden drei weitere Gene identifiziert, welche für die p38MAPK β (MAPK11) (ubiquitär exprimiert) (Jiang, Chen et al. 1996), p38MAPK γ (MAPK12, ERK6, SAPK3) (v.a. in Muskelgewebe exprimiert) (Lechner, Zahalka et al. 1996, Li, Jiang et al. 1996, Cuenda, Cohen et al. 1997) und p38MAPK δ (MAPK13, SAPK4) (exprimiert in Lunge, Niere, Hoden, Pankreas) (Jiang, Gram et al. 1997, Kumar, McDonnell et al. 1997) kodieren. Alle bekannten MAP-Kinasen enthalten ein für jeden Subtyp charakteristisches TXY-Motiv, welches sich in einer regulatorischen Schleife zwischen den Subdomänen 7 und 8 der Kinasen befindet (Jiang, Chen et al. 1996, Group, Ichimura et al. 2002). Die Länge der regulatorischen Schleife variiert zwischen den unterschiedlichen MAP-Kinase Typen (Jiang, Chen et al. 1996). Charakteristisch für alle Mitglieder der p38MAP-Kinase-Gruppe ist das Threonin-Glycin-Tyrosin (TGY) Motiv (Jiang, Chen et al. 1996). Dabei erfolgt eine Aktivierung der p38MAP-Kinasen nur durch Phosphorylierung beider Phosphorylierungsstellen (Threonin, Tyrosin) über eine spezifische MAPK-Kinase, welche die Fähigkeit zur doppelten Phosphorylierung besitzt (Raingeaud, Gupta et al. 1995, Pearson, Robinson et al. 2001). Auch die weiteren Gruppen der MAP-Kinasen weisen ein spezifisches TXY-Motiv auf. Somit verfügen die MAP-Kinasen der ERK1/2

Familie ein Threonin-Glutamin-Tyrosin-Motiv und die MAP-Kinasen der JNK/SAPK Familie ein Threonin-Prolin-Tyrosin-Motiv auf (Wilson, Fitzgibbon et al. 1996, Ono and Han 2000, Morrison 2012). Die Glycin Aminosäuren an der Stelle X des TXY Motives sowie die Länge der regulatorischen Schleife beeinflussen die Substratspezifität der p38MAP-Kinasen (Jiang, Li et al. 1997, Ono and Han 2000).

1.3.1.1 Aktivierung der p38MAP-Kinase-Kaskade

Die verschiedenen Isoformen der p38MAP-Kinasen Gruppe sind in Ihrer Sequenz zu nahezu 60% identisch und weisen somit zahlreiche Ähnlichkeiten bezüglich ihres Aktivierungsmusters auf (z.B. TGY Motiv s. 1.3.1). Eine in vitro Studie, in welcher alle p38MAP-Kinase Isoformen durch ein Epitop markiert und anschließend mit den gleichen Stimuli stimuliert wurden, zeigte, dass sich das Muster der aktivierenden Stimuli, zwischen den verschiedenen Isoformen kaum unterscheidet. Somit können durch TNF (*engl. tumor necrosis factor*), IL-1 (*engl. interleucin 1*), Anisomycin, Arsenite oder H₂O₂ alle vier Isoformen der p38MAP-Kinasen aktiviert werden (Raingeaud, Gupta et al. 1995, Jiang, Chen et al. 1996, Cuenda, Cohen et al. 1997, Jiang, Gram et al. 1997, Gulyaeva, Dempersmier et al. 2019). Eine Aktivierung der p38MAPK α ist außerdem über GM-CSF (*engl. granulocyte macrophage colony stimulating factor*), FGF (*engl. Fibroblast growth factor*), Erythropoetin und IL-3 möglich (Foltz, Lee et al. 1997, Nagata, Moriguchi et al. 1997, New and Han 1998). Da es sich bei den p38MAP-Kinasen um sog. Stresskinasen handelt, werden diese außerdem über Veränderungen der Osmolarität, UV-Licht und oxidativen Stress aktiviert. Dabei ist zu beachten, dass gleiche Stimuli in unterschiedlichen Zelltypen, unterschiedliche Reaktionen auslösen. Somit führt Insulin in 3T3-L1 Zellen zur Aktivierung der p38MAPK α (Carel, Kummer et al. 1996), in Nervenzellen von Hühnern dagegen zu einer verminderten Aktivität der p38MAPK α (Heidenreich and Kummer 1996). Die eigentliche Aktivierung der p38MAP-Kinasen erfolgt über eine Signalkaskade aus insgesamt drei Kinasen (Abb. 2). Am Anfang dieser Kaskade steht die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK). Dieser Signalweg vor der p38/MAPKK-Kaskade ist stark diversifiziert, was erklären kann, weshalb der p38MAP-Kinase-Signalweg durch eine Vielzahl an Stimuli aktiviert werden kann. Eine Überexpression der für den p38MAPK-Signalweg spezifischen MAPKK-Kinasen führt zusätzlich zu einer Aktivierung des JNK/SAPK Signalweges. Dies könnte erklären, weshalb der p38MAP-Kinase- und der JNK/SAPK Signalweg häufig parallel aktiviert werden (Ono

and Han 2000). Die MAPKK-Kinasen führen über den Prozess der Phosphorylierung zur Aktivierung von MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK), welche wiederum für die Aktivierung der p38MAP-Kinasen notwendig sind. Wie in 1.3.1 beschrieben ist zur Aktivierung der MAP-Kinasen eine Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Reste in ihrer regulatorischen Schleife notwendig. Dieser Vorgang der Phosphorylierung wird von einer MAPK-Kinase getätigt, da diese die Fähigkeit zur doppelten Phosphorylierung besitzt. Für die verschiedenen Gruppen der MAP-Kinasen sind unterschiedliche MAPK-Kinasen zuständig. Somit sind für die Phosphorylierung der p38MAP-Kinasen die MAPK-Kinasen Isoformen MKK3 und MKK6 verantwortlich. Während die MKK6 alle Isoformen der p38MAP-Kinasen phosphorylieren kann, bevorzugt die MKK3 die Phosphorylierung der p38 α , γ und δ MAP-Kinasen (Ono and Han 2000).

Die Aktivierung der p38MAP-Kinasen führt zur Aktivierung zahlreicher Substrate, welche verschiedene Funktionen (u.a. Zellteilung, Zelldifferenzierung, Apoptose) der Zelle regulieren. Das erste Substrat der p38MAPK α , welches als solches identifiziert wurde, ist die MAPKAPK2 (MAP-Kinase aktivierte Protein-Kinase) oder auch M2 genannt. Durch Phosphorylierung der M2 über die p38MAPK α wird diese aktiviert und ist dann in der Lage weitere Substrate zu phosphorylieren und somit zu aktivieren (Ono and Han 2000). Zu den Substraten, welche direkt über die p38MAP-Kinasen phosphoryliert werden, gehören zahlreiche weitere Kinasen, wie z.B. MNK1 (*engl. MAP-Kinase Interaction Protein Kinase*), welche sowohl über den ERK1/2 als auch den p38MAP-Kinase Signalweg aktiviert werden kann, nicht jedoch über den JNK/SAPK Signalweg (Fukunaga and Hunter 1997, Waskiewicz, Flynn et al. 1997). PRAK (*engl. p38 regulated/activated Kinase*) wurde vorwiegend als Substrat der p38MAPK β identifiziert (New, Jiang et al. 1998), MSK (*engl. Mitogen- and Stress activated Kinase*) wird dagegen v.a. über die p38MAPK α aktiviert (Ono and Han 2000). Des Weiteren wird eine Vielzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren über die p38MAP-Kinasen reguliert. Dazu zählen der ATF2 (*engl. activating transcription factor 2*), C/EBP β , MEF2C und MEF2A (*engl. myocyte enhance factor 2C/2A*) (Wang and Ron 1996, Huang, Ma et al. 1999, Zhao, New et al. 1999). Interessanterweise führen die unterschiedlichen p38 Isoformen zu einer unterschiedlich starken Aktivierung dieser Substrate. Somit wird ATF2 z.B. fast 20fach stärker durch die p38 β als durch p38 α aktiviert (Jiang, Chen et al. 1996, Jiang, Gram et al. 1997). Zudem wird ATF2 nicht nur über den p38MAPK-Signalweg, sondern auch über den ERK1/2-Signalweg aktiviert.

Aus den zahlreichen Beispielen geht hervor, dass die p38MAP-Kinasen für die Aktivierung einer Vielzahl von Substraten verantwortlich sind, wodurch sich die Beteiligung der p38MAP-Kinasen an mehreren unterschiedlichen Prozessen der Zelle erklärt. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die Aktivierung der verschiedenen Substrate, teilweise durch Überlappung der verschiedenen MAP-Kinase Signalwege erfolgt. Zu den unterschiedlichen Funktionen, welche über den p38MAPK-Signalweg reguliert werden, gehören u.a. der Differenzierungsprozess verschiedener Zelltypen, (z.B. 3T3-L1 Zellen, PC12 Zellen) (Engelman, Lisanti et al. 1998, Morooka and Nishida 1998) sowie eventuell die Expression und Translokation von GLUT4 (Somwar, Kim et al. 2001, Montessuit, Rosenblatt-Velin et al. 2004). Die p38MAP-Kinasen sind allerdings nicht nur an physiologischen Prozessen der Zelle beteiligt, sondern auch für eine Vielzahl von Pathologien verantwortlich. Somit wird z.B. ein Zusammenhang der p38MAP-Kinase und der Entstehung von Diabetes Typ II, Herzinsuffizienz und Alzheimer vermutet (Carlson, Koterski et al. 2003, Kaiser, Bueno et al. 2004, Munoz and Ammit 2010).

1.4 Klinische Bedeutung des Fettgewebes

Adipozyten sind u.a. für den Energiehaushalt zuständig. Dazu speichern sie Energie in Form von Triglyzeriden. In Abhängigkeit des Ernährungszustandes kann der Umfang der Fettzellen variieren. Erreichen diese einen Durchmesser von 200µm (Hypertrophie) (Wirth and Hauner 2013), wird das Fett nicht weiter in Adipozyten gespeichert, sondern akkumuliert in verschiedenen Organen wie z.B. Leber, Herz, Muskel und Pankreas wodurch, die Entwicklung einer Insulinresistenz sowie weiterer metabolischen Defizite möglich wird. Dieser Prozess hat als Folge die mögliche Entstehung verschiedener Krankheitsbilder, wie z.B. Diabetes Mellitus Typ 2, Adipositas oder KHK (Koronare Herzkrankheit). Letztere tritt häufig auch als Komplikation der davor genannten Erkrankungen auf (Medina-Gomez, Gray et al. 2007). Die Entwicklung von Adipositas ist von verschiedenen Faktoren abhängig (Hyperkalorische Ernährung, Bewegungsmangel, genetische Faktoren). Zusätzlich wird vermutet, dass eine Fehlfunktion des Fettgewebes zur Entstehung und Therapieresistenz von Adipositas beiträgt (Blüher 2008). Adipositas ist häufig mit einer subklinischen chronischen Inflammation assoziiert. Dafür ist vermutlich eine höhere Infiltration v.a. des viszeralen

Fettgewebes mit Immunzellen, wie z.B. Makrophagen verantwortlich. Makrophagen werden über Zytokine und Stressmediatoren aktiviert (Harman-Boehm, Bluher et al. 2007). Im Fettgewebe von Adipositas Patienten sind diese Stressmediatoren häufig fehlreguliert was zu einer vermehrten Expression und Aktivität der Stress-assoziierten Kinasen (z.B. p38MAPK) führt. Durch vermehrte Aktivierung des p38MAPK-Signalweges ist eine vermehrte Entzündungsreaktion durch Makrophageninfiltration möglich, welche die Fettgewebisdysfunktion bei Adipositas unterhält (Bashan, Dorfman et al. 2007, Blüher 2008). Zudem scheint eine vermehrte Aktivierung der p38MAPK v.a. zu einer Zunahme des omentalen Fettgewebes zu führen (Bashan, Dorfman et al. 2007). Auch die Entstehung von Diabetes Mellitus Typ 2 ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Gekennzeichnet wird das Krankheitsbild allerdings durch eine vermehrte Insulinresistenz in Fettgewebe und Muskelzellen, sowie eine verminderte Insulinsekretion der β -Zellen im Pankreas. Eine Studie zeigte einen Zusammenhang der p38MAPK und der Entstehung einer Insulinresistenz in Muskelzellen (Archuleta, Lemieux et al. 2009). Ob die p38MAPK α allerdings tatsächlich zur Entstehung von Diabetes Mellitus Typ2 beiträgt, ist noch weitgehend unbekannt. Fettgewebe ist wie in 1.1 beschrieben nicht nur für pathologische Zustände im Körper zuständig, sondern reguliert als endokrines Organ zusätzlich verschiedene Stoffwechselprozesse des Körpers und dient der Energiespeicherung – sowie bereitstellung. Da die Funktion des Fettgewebes über verschiedene Signalwege reguliert wird u.a. über den p38MAPK-Signalweg könnte durch Modulation der p38MAPK α auch die Funktion des Fettgewebes bzw. deren regulatorischen Eigenschaften beeinflusst werden.

1.5 Fragestellung

Die Funktion der Adipozyten wird von zahlreichen Signaltransduktions- und regulationsmechanismen beeinflusst. Zu diesen Regulatoren gehört auch die p38MAPK α . Ziele dieser Arbeit sind:

1. Die Generierung von 3T3-L1 p38MAPK α KO (Knock-out) Zellen mittels der CRISPR/Cas Methode
2. Den Einfluss eines KO der p38MAPK α auf die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten zu beobachten

3. Die Bestimmung verschiedener Adipozytenmarker in WT und KO-Zellen mittels mRNA-Analysen
4. Den Einfluss eines KO der p38MAPK α auf die Expression von GLUT4 in Adipozyten zu erforschen
5. Den Einfluss eines KO der p38MAPK α auf die Expression von UCP1, UCP2, UCP3 zu analysieren.
6. Den Einfluss eines KO der p38MAPK α auf die Expression des Insulinrezeptors und IGF1-Rezeptors zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

Geräte und Bezeichnung	Firma
Zellkulturbank	Thermo Scientific
Zellkulturschrank	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Zeiss
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge	Eppendorf
Schüttelwasserbad	GFL 1083
Gefrierschrank -20°C	LIEBHERR Premium NoFrost
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific
Kühlschrank 4°C	LIEBHERR ProfiLine
Megazentrifuge	Heraeus SEPATECH
Zentrifuge	Eppendorf
Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss
Pierce G2 Fast Blotter	Thermo Scientific
Infrarot-Bildgebungssystem	LICOR
Wärmeschrank	Heraeus INSTRUMENTS
Mikroplattenleser	BIO-RAD
Elektrophoresis Power Supply	Fisher Scientific
Thermomixer	Eppendorf 1,5 ml
Mikrowelle	AEG
Mastercycler	Eppendorf
Real-Time PCR System	Applied Biosystems

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

2.2 Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti p38MAPK α	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Anti Glukose Transporter 4	Kaninchen	1:2500	Abcam
Anti-Glukose Transporter 1	Kaninchen	1:2500	Abcam

Tabelle 2: Primäre Antikörper zur Durchführung von Western Blot Analysen

2.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-Rabbit IR Dye [®] 800CW	Ziege	1:10.000	LICOR

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper zur Durchführung von Western Blot Analysen.

2.3 Primer

Gen Name		Sequenz 5'-3'
Slc2a4	Fwd	CAATGGTTGGGAAGGAAAAG
	Rev	AATGAGTATCTCAGGAGGC
Slc2a1	Fwd	AAGTCCAGGAGGATATTCAG
	Rev	CTACAGTGTGGAGATAGGAG
Plin2	Fwd	GCCTGATCTTGAATGTTCTG
	Rev	GCCGATCTTGAATGTTCTG
Csnk2b	Fwd	GATCTTAGACCTGGAACCTG
	Rev	CAACCCATAAAGCATCTCAG
Adipoq	Fwd	CCACTTCTCCTCATTCTG
	Rev	CTAGCTCTTCAGTTGTAGTAAC
Lep	Fwd	CTTTGGTCCTATCTGTCTTATG
	Rev	TCTTGGACAAACTCAGAATG
Pparg	Fwd	AAAGACAACGGACAAATCAC
	Rev	GGGATATTTTTGGCATACTCTG
Ppargc1a	Fwd	TCCTCTTCAAGATCCTGTTAC

	Rev	CACATACAAGGGAGAATTGC
Ucp1	Fwd	CTTTTCAAAGGGTTTGTGG
	Rev	CTTATGTGGTACAATCCACTG
Ucp2	Fwd	ACCTTTAGAGAAGCTTGACC
	Rev	TTCTGATTTCTGCTACCTC
Ucp3	Fwd	CAAGAAATGCCATTGTCAAC
	Rev	GAAGTTGTCAGTAAACAGGTG
FABP4	Fwd	GTAATGGGGATTTGGTCAC
	Rev	TATGATGCTCTTCACCTTCC
Perilipin 5	Fwd	TGTAGTGTGACTACCTGTG
	Rev	ATGTCACCACCATGTCTG
Insulinrezeptor	Fwd	ATTGGTGACTTTGGAATGAC
	Rev	GTGAAGATTCCATCTTTGAGG
IGF-1-Rezeptor	Fwd	AGAACCGAATCATCATAACG
	Rev	TTTTAAATGGTGCCTCCTTG

Tabelle 4: Primer zur Durchführung der quantitative Polymerasen Echtzeit Reaktion (engl. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction/ RT-qPCR)

2.4 CRISPR/Cas Methode

Bei der CRISPR/Cas-Methode (*engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated*) handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, mit welcher DNA-Sequenzen im Genom gezielt geschnitten und verändert werden können. Die Methode basiert auf dem physiologischen Abwehrmechanismus von Bakterien gegenüber fremder DNA. In Bakterien wurden bisher verschiedene CRISPR Systeme beobachtet (Haurwitz, Jinek et al. 2010). Es gibt insgesamt drei verschiedene CRISPR/Cas System-Typen. Typ I (7 Subtypen), Typ II (3 Subtypen) und Typ III (2 Subtypen). Gentechnologisch wird allerdings überwiegend der Typ II aus *Streptococcus pyogenes* verwendet, in welchem die Cas-9 (*engl. CRISPR-associated 9*) als Endonuklease genutzt wird. Dabei induziert die Cas-9 einen Doppelstrangbruch in einem bestimmten Abschnitt der DNA, um genetische Veränderungen der genetischen Erbinformation vorzunehmen. Zur Durchführung der CRISPR/Cas-Methode in einer Zelle müssen zwei Konstrukte in dieser über Vektoren exprimiert werden. Vektoren sind sog. Transportvehikel (Plasmide, Viren oder Bakteriophagen) welche fremde DNA in eine Zelle transportieren

können. Am häufigsten, werden Plasmide als Vektoren genutzt. Dabei handelt es sich um ringförmige, extrachromosomale und autonom replizierende, doppelsträngige DNA-Moleküle. Im Beispiel der CRISPR/Cas-Methode enthalten diese Plasmide die genetische Information um die für die Durchführung der CRISPR/Cas-Methode notwendige Cas-9 und die sgRNA (*engl. single guide RNA*) zu exprimieren. Die sgRNA ist ein Produkt aus crRNA (*engl. CRISPR RNA*) und tracrRNA (*engl. trans activating CRISPR RNA*). Dabei besteht die crRNA aus einer Sequenz mit 20 Nukleotiden, welche komplementär zur Zielsequenz der zu verändernden DNA ist. Damit die Cas-9 in der Zielsequenz dann einen Doppelstrangbruch induzieren kann, muss die sgRNA in unmittelbarer Nähe eines PAM (*engl. protospacer adjacent motif*) binden. Die PAM Sequenz für die Cas-9 besteht aus nGG, wobei n ein beliebiges Nukleotid kennzeichnet auf welches zwei Guanin Nukleotide folgen müssen. Die PAM muss sich in Richtung 5' direkt nach der Zielsequenz befinden. Die Cas-9 schneidet anschließend 3 Basenpaare in Richtung 5'-der PAM (Abb.3). Nachdem die Cas-9 ein Doppelstrangbruch erzeugt hat, versucht die Zelle entweder über nicht homologe Endverknüpfung (*engl. non-homologous end joining, NHEJ*) oder durch homolog gerichtete Reparaturmechanismen (*engl. homology-directed repair, HDR*) den Schaden zu beheben. Während die erste Möglichkeit zu Punktmutationen durch Insertion oder Deletion von wenigen Basenpaaren führen kann und somit zu einer Verschiebung des Leserasters, bietet die HDR die Möglichkeit einen gewünschten DNA-Abschnitt am Zielort einzufügen, da hierbei ein homologes DNA-Stück zur Reparatur notwendig ist. So kann ein homologer Donor-DNA-Strang, welcher den entsprechenden DNA-Abschnitt enthält, in die Zelle eingebracht werden (Jinek, Chylinski et al. 2012, Chylinski, Le Rhun et al. 2013, Ma, Zhang et al. 2014) .

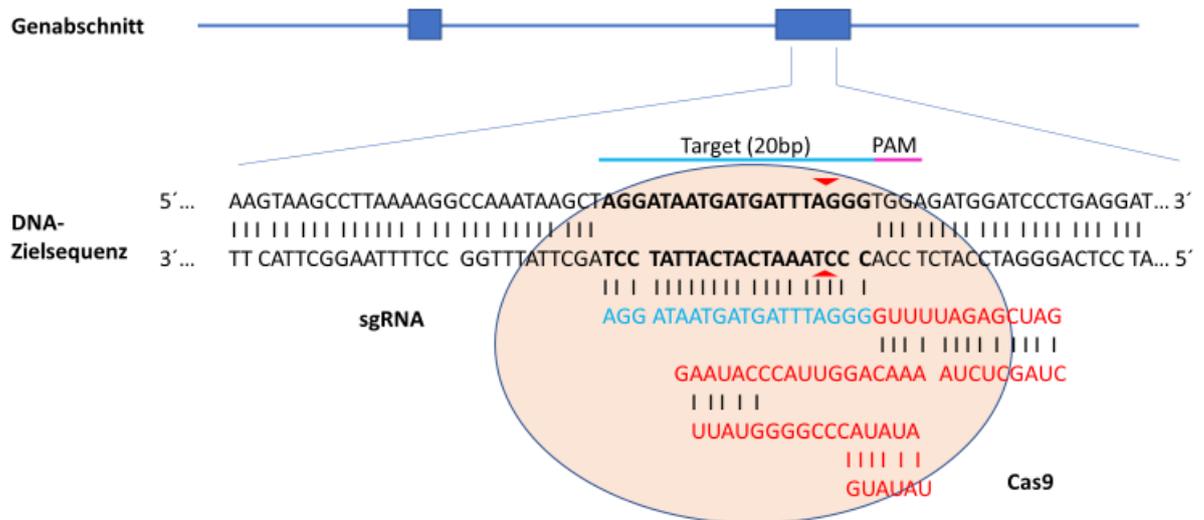


Abb. 3: Die Cas-9 (*engl. CRISPR-associated 9*) (gelb) wird über eine sgRNA (*engl. single guide RNA*), welche aus einer crRNA (*engl. CRISPR RNA*) aus 20-nt Nukleotiden (blau) und einer tracrRNA (*engl. trans activating CRISPR RNA*) (rot) besteht zu einer bestimmten DNA-Sequenz des Genoms geführt. Die sgRNA bindet an die Zielsequenz (blauer Balken) direkt vor der PAM (*engl. Protospacer adjacent motif*) (pink) Sequenz. Die Cas 9 induziert einen DSB (Doppelstrangbruch) 3 BP (Basenpaare) vor der PAM Sequenz (roter Pfeil). *modifiziert nach (Ran, Hsu et al. 2013)*

2.5 Herstellung von Lentiviren

Ziel dieser Arbeit ist zum einen den Einfluss der p38MAPK α auf die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten (s. Abschnitt 2.7.4) und zum anderen den Einfluss der p38MAPK α auf die GLUT4 Expression in Adipozyten zu untersuchen. Dazu wurde das Gen, welches für die Kodierung der p38MAPK α verantwortlich ist, mittels der CRISPR/Cas-9 Methode (s. Abschnitt 2.4) genetisch modifiziert, sodass keine funktionsfähige p38MAPK α mehr hergestellt werden konnte. Über lentivirale Infektion wurde eine Zellpopulation generiert in welcher die p38MAPK α nur gering exprimiert wurde. Zur Herstellung von Viruspartikeln wurden HEK-293-T Zellen (*engl. human embryonic kidney*) verwendet (s. Abschnitt 2.5.1). Im Folgenden wurden dann 3T3-L1 Zellen mit den hergestellten Viren infiziert und mittels Puromycin selektioniert. Die Transfektion der HEK-293-T Zellen erfolgte mittels Lipofektion. Bei diesem Verfahren bilden sich Komplexe zwischen kationischen Lipiden und dem genetischen Material, welche dann von der Zelle aufgenommen werden können (Felgner, Gadek et al. 1987). Für die Virusproduktion werden verschiedene Gene benötigt, welche sich aus Sicherheitsgründen auf drei verschiedenen Plasmiden befinden. Das Verpackungs-

Plasmid pCZVSV-G enthält das Gen, welches für das Hüllprotein des Glykoprotein G des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) kodiert und ermöglicht sowohl den Eintritt des Virus in die Wirtszelle als auch seine Knospung (Pietschmann et al., 1999). Das Helferplasmid enthält Gene welche für die Kodierung von Kapsidproteinen (gag), Expressionsregulatoren (rev, tata) und die Virion-assoziierten Enzyme (pol) notwendig sind (Mochizuki et al., 1998). Das Plasmid mit den zu verpackenden Konstrukten (sgRNA, Cas-9) (Abb. 4) enthält Gene für die reverse Transkription, die Integration und einen Selektionsmarker für Puromycin.

2.5.1 Transfektion von HEK-293-T Zellen

Zur Durchführung der Transfektion wurden nach dem Protokoll der Firma Invitrogen 1,5 ml Gibco™ Opti-MEM™ mit 45 µl Lipofektamin 2000 und 1,5 ml Gibco™ Opti-MEM™ mit jeweils 6 µg der 3 Plasmide für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer dreißigminütigen Ko-Inkubation der beiden Lösungen wurde eine 10 cm Zellkulturschale mit HEK-293-T Zellen mit 10 ml HEK Medium (Tabelle 8) und der hergestellten Lösung transfiziert. Die HEK-293-T Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu mindestens 50% konfluent. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medium Wechsel mit IMDM (*engl. Iscove's Modified Dulbeccos Medium*). Nach 48 Stunden wurde der Virusüberstand abgenommen, filtriert und konzentriert.

2.5.2 Infektion von 3T3-L1 Zellen

Der von den transfizierten HEK-293-T Zellen abgenommene Virusüberstand wurde mittels 0,45 µm Filtern von Zellresten gereinigt und konzentriert. Zur Konzentrierung wurden die Virusüberstände zusammen mit einem Konzentrator (Lenti-X™ Concentrator) (3:1) für 1 bis 24 Stunden bei 4 °C inkubiert und danach für 45 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 3T3-L1 Medium (Tabelle 9) aufgenommen und auf eine 10 cm Zellkulturschale mit 3T3-L1 Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und mit der Selektion begonnen. Zur Selektion wurden 3 µg/ml Puromycin zum Medium hinzugegeben. Die Selektion erfolgte so lange bis auf einer parallelen, nicht infizierten Kontrolle keine lebenden 3T3-L1 Zellen mehr nachzuweisen waren. Dieser Zeitraum betrug 5-7 Tage.

2.6 Vektoren für die Herstellung von p38MAPK α KO-Zellen

Zur Herstellung der p38MAPK α KO-Zellen wurde der pLV-U6G-EPCG Vektor (Abb. 4) der Firma Sigma Aldrich verwendet. Dieser trägt die zur Durchführung der CRISPR/Cas-Methode notwendigen Konstrukte (sgRNA, Cas-9) und besitzt zusätzlich einen Selektionsmarker für Puromycin und Ampicillin. Dieser verleiht Zellen, welche mit dem Vektor infiziert wurden, eine Resistenz gegenüber Puromycin und Ampicillin. Auf diesen Weg können über die Gabe von Puromycin infizierte von nicht infizierten Zellen getrennt werden. Die Gene zur Expression der sgRNA und Cas-9 stehen unter der Kontrolle des U6 Promotors. Die beiden Selektionsmarker werden wiederum unter die Kontrolle des T7 (Puromycin) bzw. des b-Lactamase Promotors (Ampicillin) gestellt. Die sgRNA besteht aus 19 Nukleotiden (Sequenz) und ist komplementär zu einer bestimmten Sequenz des p38MAPK α Gens. Da sich die Sequenz weder auf dem ersten noch dem letzten Exon befindet, wird die Wahrscheinlichkeit dafür, dass kein funktionsfähiges Protein translatiert wird, höher. Durch den bakteriellen Replikationsursprung pUCori wird außerdem die Herstellung doppelsträngiger Plasmidkopien in *E. coli* (*lat. Escherichia coli*) ermöglicht. Die Erstellung von einzelsträngigen Plasmidkopien übernimmt der F1 ori.

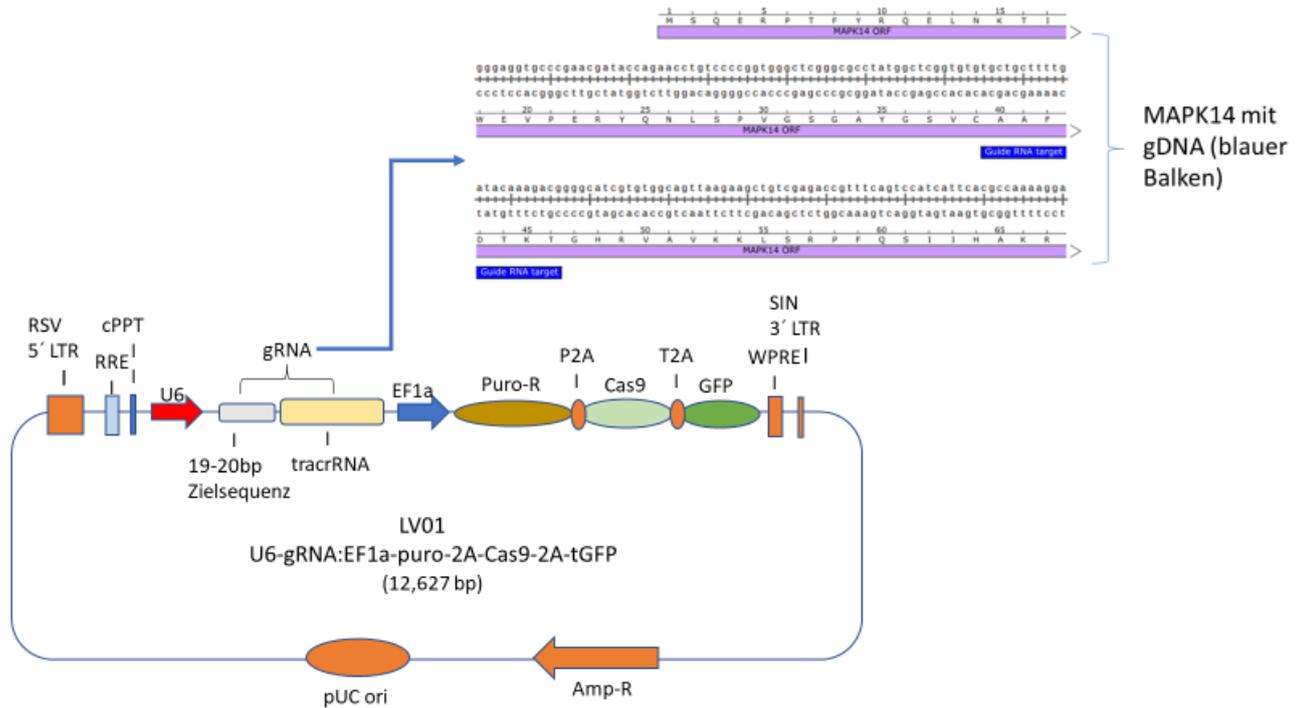


Abb. 4: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas (*engl. engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated*) (pLV-U6G-EPCG) Plasmids. Das Plasmid verfügt über eine sgRNA (*engl. single guide RNA*) (blauer Balken) und der Cas-9 (*engl. CRISPR associated-9*). Diese Konstrukte sind zur Durchführung der CRISPR/Cas Methode notwendig. Als Selektionsmarker dienen eine Puromycin- und Ampicillin-Resistenz. Das Vermehren des Plasmids in kompetenten Zellen wird über den Replikationsursprung pUCori gewährleistet.

2.6.1 Transformation kompetenter Escherichia Coli (E. coli) Bakterien

Wie in 2.6 bereits erwähnt besitzt das pLV-U6G-EPCG Plasmid die Fähigkeit sich zu Vermehren. Diese Vermehrung findet in Zellen statt. Um eine erfolgreiche Vermehrung der Plasmide sicherstellen zu können, müssen die Zellen zuerst entsprechend aufgearbeitet werden. Um diese Transformation der eingefrorenen (- 80 °C) kompetenten XL-1Blue Zellen durchführen zu können, wurden diese zunächst auf eine LB (*engl. Lysogeny broth*) Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie in 5 ml sterilem LB in Röhrchen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach ca. 18 Stunden wurden 1 ml Vorkultur in ca. 100 ml LB Medium geschüttelt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kultur in sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4000 x g 2x für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TFB I (*engl. Transformation Buffer I*) Puffer (Tabelle 5) resuspendiert und 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Kultur erneut bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml TFB II (*engl.*

Transformation Buffer II) Puffer (Tabelle 5) gelöst und in sterile Mikroreaktionsgefäße aliquotiert (25-50 µl). Die Aliquots wurden dann mit 100 ng der Plasmid DNA versetzt. Um eine erfolgreiche Transformation der Zellen zu gewährleisten, wurden die mit Plasmid DNA versetzten Zellen zuerst für 10 min auf Eis gelegt und danach sofort für 60 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gestellt (Hitzeschock). Es erfolgten weitere 2 min Inkubation auf Eis. Danach wurden 500 µl LB-Medium (Tabelle 6) hinzugefügt und die Zellen wurden bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf eine mit Antibiotikum versetzten LB-Agar (Tabelle 6) Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert

TFB I Puffer	TFB II Puffer
30 mM Kaliumacetat (pH 5,8)	10 mM MOPS (pH 7)
50 mM MnCl ₂	75 mM CaCl ₂
100 mM NaCl	10 mM NaCl
15% Glycerin	15 % Glycerin

Tabelle 5: Mengenangaben zur Herstellung von TFB I und TFB II Puffer.

LB Medium 1L	LB Agarplatte
10 g Bacotrypton	15 g Agar/ 1L LB-Medium
5 g Bacto-Hefe-Extrakt	
10 g Natriumchlorid (pH 7,5)	

Tabelle 6: Mengenangaben zur Herstellung von 1L LB Medium

2.6.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien

Nachdem sich das Plasmid in den in 2.6.1 beschriebenen kompetenten Zellen vermehrt hatte, mussten die vermehrten Plasmide zur weiteren Nutzung aus den Zellen isoliert werden. Die Plasmidpräparation erfolgte mit Hilfe des NucleoBond PC500 Maxi-DNA-Kit (Macherey & Nagel, Düren). Dazu wurde eine Kolonie aus transformierten Zellen über Nacht in ca. 3 ml LB Medium mit Antibiotikum bei ca. 37 °C geschüttelt und am nächsten Tag in 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und bei 14.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde danach gemäß den Vorschriften des Herstellers in alkalischer Lösung lysiert und neutralisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der Plasmid DNA über Anionen-Austauscher Säulen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde

mit Isopropanol bei 4 °C gefällt, in 70 % Ethanol gewaschen und in 1x TE (Tris/EDTA) Puffer (Tabelle 7) aufgenommen.

TE Puffer pH 7,4
10mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (pH 7,4)
1mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat) (pH 8,0)

Tabelle 7: Mengenangaben zur Herstellung von TE Puffer

2.7 Zelllinien

2.7.1 HEK-293-T Zellen

Die Humanen embryonalen Nierenzellen (*engl. Human Embryonic Kidney/ HEK*) 293 T sind genetisch modifizierte Zelllinien, welche in der Molekularbiologie v.a. als Wirt für die Vermehrung von Viren genutzt werden. Zur Herstellung der immortalisierten Zelllinie wurde eine menschliche embryonale Nierenzelle mit einem DNA-Fragment, des Adenovirus 5 transformiert (Graham, Smiley et al. 1977, DuBridg, Tang et al. 1987). Durch das Vorhandensein des SV40 large T Antigens können Viren in die Zelle eindringen und sich in dieser vermehren. Außerdem wird es von Plasmiden, welche ein SV40 origin of Replikation besitzen für die Replikation ihrer eigenen DNA genutzt. Zur Kultivierung von HEK-293-T Zellen wurden diese zuerst aus flüssigem Stickstoff genommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden die Zellen in HEK Medium aufgenommen und auf eine 10 cm Zellkulturschale gegeben. Die Schale wurde davor mit 10 ml HEK Medium befüllt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 2-3 Tagen erreichten die Zellen eine hundertprozentige Konfluenz und wurden passagiert. Dazu wurde das Medium zuerst abgenommen und durch 2 ml Trypsin ersetzt. Die Zellen wurden dann für 5 min zurück in den Inkubationsschrank gestellt. Nach den 5 min wurden 5 ml HEK-Medium auf die Schale hinzugegeben. Die Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen entweder 1:5 passagiert oder in Einfriermedium aufgenommen und in flüssigen Stickstoff gelagert. Die passagierten Zellen wurden danach wie in Abschnitt 2.5 beschrieben für die Produktion von Lentiviren genutzt.

HEK Medium
Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO)
10 % Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom)
2 mM L-Glutamin (Invitrogen)
1 % NEAA (non-essential amino acids, Invitrogen)
100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

Tabelle 8: Mengenangaben für die Zubereitung von HEK Medium

2.7.2 3T3-L1 Zellen

3T3-L1 Zellen wurden von Mäusen isoliert. Es handelt sich dabei um einen Fibroblasten ähnlichen Phänotyp, welcher in der Forschung v.a. zur Untersuchung von Fettgewebe dient, da sich 3T3-L1 Zellen unter bestimmten Umständen (s. Abschnitt 2.7.4) zu Adipozyten ähnliche Zellen differenzieren können (Green and Kehinde 1974, Green and Meuth 1974). Wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, wurden auch 3T3-L1 Zellen zuerst aufgetaut und in 3T3-L1 Medium für 2-3 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen entweder passagiert oder eingefroren. Die passagierten Zellen dienten zur Differenzierung der Zellen in Adipozyten. Das Einfrieren diente dem Erhalt von Zellen mit einer möglichst geringen Passagenzahl, da sich solche Zellen besonders gut differenzieren lassen.

2.7.3 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen

Mit Hilfe der CRISPR/Cas Methode, welche bereits in 2.4 beschrieben wurde, konnte in 3T3-L1 Zellen, das Gen, welches für die Kodierung der p38MAPK α (MAPK14) notwendig ist, genetisch modifiziert werden (s. Abschnitt 2.5.2)

2.7.4 3T3-L1 Zellen Differenzierung

Zur Differenzierung von 3T3-L1 und 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen in einen Adipozyten ähnlichen Phänotyp, wurden diese auf einer unbeschichteten 6-Well Platte ausplattiert und in 3T3-L1 Medium kultiviert. Nachdem die Zellen eine hundertprozentige Konfluenz erreicht hatten, fand nach zwei Tagen ein Medium Wechsel mit 3T3-L1 Differenzierungsmedium (Tabelle 9) statt. Am zweiten Tag des Differenzierungsprozesses wurde das Differenzierungsmedium durch 3T3-L1 Medium

ersetzt. Ein Medium Wechsel fand danach in Abständen von zwei Tagen statt. Zwischen dem achten und zehnten Tag erreichten die Zellen den höchsten Differenzierungsgrad.

3T3-L1 Medium	3T3-L1 Differenzierungsmedium
Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO)	3T3-L1 Medium
10 % Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom)	Insulin 1 µg/ml
2 mM L-Glutamin (Invitrogen)	Dexamethason 1µM
100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)	IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) 0,5 mM
	2 µM Rosiglitazone

Tabelle 9: Mengenangaben für die Herstellung von 3T3-L1 Medium und 3T3-L1 Differenzierungsmedium

2.7.5 Ölrot-O-Färbung

Die Ölrot-O-Färbung dient zur allgemeinen Lipiddarstellung. Dabei wird die bessere Löslichkeit des Sudan-Farbstoffes in Lipiden gegenüber dem Lösemittel zur Nutze gemacht. Zur Durchführung des Färbungsprozesses wurden die Zellen zuerst mit einer Formol-Calcium Lösung (Tabelle 10) fixiert. Dazu wurden für 10 min 1 ml der Lösung in jedes Well der 6-well Platte gegeben. Anschließend wurden die Adipozyten 3x 10 min mit doppelt destillierten Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen 5 min mit 60 % Isopropanol eingestellt und anschließend 10 min in der vorgefertigten filtrierte Farblösung gefärbt. Die Farblösung muss mind. 24 Stunden im Vorfeld vorbereitet werden. Dazu wird eine vorgefertigte Stammlösung (Tabelle 10) mit doppelt destilliertem Wasser versetzt (6:4). Die Lösung wird dann unmittelbar vor Gebrauch filtrierte.

Formol-Calcium Lösung nach Baker (pH 7,0)	Ölrot-O-Färbung Stammlösung
1 g Ca Cl ₂	0,5 g Oil-Red-O (Sigma-Aldrich)
80 ml Aqua	100 ml Isopropanol 99%
10 ml Formalin (37%)	
Ca ₂ HCO ₃ (<u>neutralisieren</u>)	

Tabelle 10: Mengenangaben für die Herstellung von Formol- Calcium Lösung und Ölrot-O-Stammlösung Färbung

2.8 Proteinanalyse

2.8.1 Proteinisolierung

Zur Isolierung von Proteinen aus Zellen wurden 500 µl Lysispuffer (Tabelle 11) auf eine 10 cm mit Zellen bewachsene Zellkulturschale gegeben. Für eine 6-Well Platte wurden entsprechend 100 µl Lysispuffer pro Well genutzt. Um die Struktur der Proteine sowie verschiedene Funktionen dieser (z.B. Phosphorylierung) nach der Lyse zu erhalten, wurde der Lysispuffer zusätzlich mit Protease/Phosphatase Inhibitor (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free 100X) versetzt (1:100). Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber von der Platte entfernt und bei 14.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 Mikroreaktionsgefäß pipettiert und für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay (s. Abschnitt 2.8.2) genutzt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit 4x Lämmli Puffer und 100 mM DTT (*engl. Dithiothreitol*) versetzt und bei 95°C für 15 min aufgeköcht. Dadurch wurden Wasserstoff- und Disulfidbrücken gespaltet und die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufgebrochen. Proben zur Bestimmung von GLUT4 wurden nicht gekocht, da unter starker Hitze die vorhandenen GLUT4 aggregieren und bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt 2.8.3) nicht in das Sammelgel einlaufen können. Die Proben wurden anschließend auf eine Konzentration von 2 mg/ml gebracht, bei -80 °C gelagert und für spätere WBA (Western Blot Analysen) genutzt.

Lysispuffer	Lämmli Puffer
10 mM Tris (pH 7,5)	0,25 M Tris (pH 6,8),
150 mM NaCl	8 % (w/v) SDS
0,1% IGPAL CA-630	20 % (v/v) Glycerol
	100 mM DTT
	0,1 g/l Bromphenolblau

Tabelle 11: Mengenangaben zur Herstellung von Lysispuffer und Lämmli Puffer

2.8.2 Konzentrationsbestimmung (BCA Assay)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Smith et al. (Smith et al., 1985) und wurde mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Mit dieser Methode können unter Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) Proteine in einem Bereich von 20-2000 µg/ml photometrisch dargestellt werden. Dabei werden in einem alkalischen Medium zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) durch die Bindung an Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert (Cu). Diese bilden einen Chelatkomplex mit der Bicinchoninsäure, was in einem Farbumschlag zu violett resultiert. Dieser Farbkomplex ermöglicht den kolorimetrischen Nachweis der Proteinmenge bei einer Wellenlänge von 562 nm. Dabei steigt die Absorption des Farbkomplexes proportional zur Proteinmenge. Zur Durchführung des BCA Testes wurden von jeweils einer Proteinprobe drei Replikate (jeweils 3 µl) auf eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert mit 200 µl Reagenzlösung versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im Photometer bei einer 570 nm Wellenlänge gemessen. Mit Hilfe einer BSA (Bovine Serum Albumin) Eichkurve (20-2000 µg/ml) konnte so die Proteinmenge der jeweiligen Proben bestimmt werden.

2.8.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer

Zur Auftrennung der Proteine wurde die diskontinuierliche Elektrophorese in Hoefer Elektrophorese Kammern durchgeführt (Tulchin et al., 1976). Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Trennung von Proteinen nach Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Diese Trennung erfolgt in einem Acrylamidgel, welches je nach Größe der zu bestimmenden Proteine 7,5 %, 10 % oder 12,5 % Acrylamid enthält. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem 20 % SDS Laufpuffer (*engl. SDS sodium*

dodecyl sulphate). Durch das SDS werden die Proteine negativ geladen, wodurch sie sich gegenseitig abstoßen. Dieses Abstoßen führt zu einer zusätzlichen Auftrennung der zuvor gefalteten Proteine. Die Auftrennung erfolgt proportional zur Molekülmasse, da größere Proteine im Gel stärker zurückgehalten werden. Somit können Proteine unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Zur Durchführung der Methode wurden jeweils 25 µg Protein auf ein SDS-Gel geladen und bei einer konstanten Spannung von 200 kV über 1 h aufgetrennt. Dabei bestand das SDS-Gel aus einem 10%-igen Trenngel (Tabelle 12), welches zur Auftrennung der Proteine diente und aus einem 2,5%-igen Sammelgel (Tabelle 12), welches das gleichmäßige Einlaufen der Proteine in das Trenngel gewährleistete. Um die Proteinlokalisierung im Gel der Proteingröße, nach der Trennung zuordnen zu können, wurde zusätzlich ein Proteingrößenstandard mitaufgetragen (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific).

10 %-iges Trenngel	2,5 %-iges Sammelgel
2,5 ml 40 % Acrylamid	625 µl Acrylamid
2,5 ml 1 M Tris (pH 8,8)	625 µl 1,5 M Tris (pH 6,8)
100 µl 10 % SDS	50 µl 10 % SDS
30 µl TEMED	15 µl TEMED
15 µl 10 % APS	10 µl 10 % APS
5 ml H ₂ O	3,7 ml H ₂ O

Tabelle 12: Zusammensetzung für 2x SDS-Gele

SDS-PAGE-Laufpuffer	Anodenpuffer	Kathodenpuffer
25 mM Tris (pH 7,4)	30 mM Tris	300 mM Aminocaprinsäure
250 mM Glycin (pH 8,3)	100 mM Tricin (pH 8,8)	30 mM Tris (pH 8,7)
0,1 % (w/v) SDS		

Tabelle 13: Mengenangaben zur Herstellung von SDS-Page Laufpuffer, Anodenpuffer und Kathodenpuffer

2.8.4 Western Blot

Um die Proteine später mittels bestimmter Antikörper (s. Abschnitt 2.8.5) (Tabelle 2) nachweisen zu können, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Elektronentransfer im Thermo Scientific™ Pierce™ G2 Fast Blotter. Dabei wandern die durch das SDS negativ

geladenen Proteine durch das Anlegen einer Spannung vom negativ geladenen Pol (Kathode) zum positiv geladenen Pol (Anode). Dazu wurde auf der Kathoden Kassette ein in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier gelegt, auf welches das SDS-Gel in einem zweiten Schritt platziert wurde. Die Nitrozellulosemembran und ein weiteres Filterpapier wurden mit Anodenpuffer benässt und auf das Gel gelegt. Bei einer Spannung von 1,3mA erfolgte innerhalb von 7 Minuten der Proteintransfer. Eine Schematische Darstellung des Aufbaus einer zum Transfer fertigen Blotting Kassette wird in Abb. 5 dargestellt.

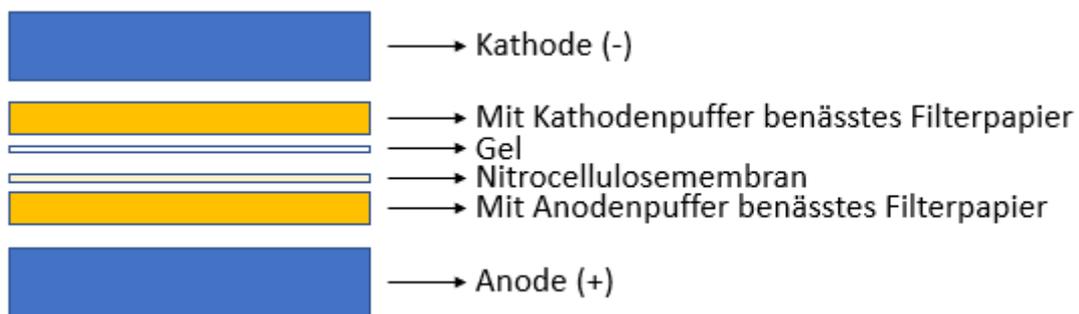


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus einer zum Transfer fertigen Blotting Kassette

2.8.5 Immundetektion von Proteinen

Um die Proteine auf der Zellmembran nachweisen zu können, musste diese mit Antikörpern (Tabelle 2) gegen die zu nachweisenden Proteine versetzt werden. Um unspezifische Wechselwirkungen der eingesetzten Antikörper zu verhindern, wurde die Nitrozellulosemembran zunächst in TBS (*engl. tris buffered saline*)/Odyssey[®] Blocking Buffer (1:1) (Tabelle 14) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch konnten unspezifische Bindungsstellen der Proteine blockiert werden. Die Primärantikörper wurden in einer Lösung aus TBST (*engl. tris buffered saline + Tween*) (Tabelle 14) und 5 % Albumin angesetzt und gemäß den Herstellerangaben verdünnt (Tabelle 2). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Zellschüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit TBST auf dem Zellschüttler gewaschen. Die sekundären Antikörper (Tabelle 3) wurden in einer Lösung aus TBST/Odyssey[®] Blocking Buffer (1:1) 1:10.000 verdünnt und bei Raumtemperatur auf dem Zellschüttler für 45 min inkubiert. Da die sekundären Antikörper fluoreszenzgekoppelt sind, war es wichtig die Membran in einer lichtgeschützten Box zu inkubieren. Die Membran wurde danach 2x für 10 min mit

TBST und 1x mit TBS gewaschen, um das Tween zu entfernen. Die Auswertung der fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System (Licor Biosciences), welches sowohl Signale einer Wellenlänge von 700 nm (rot) als auch von 800 nm (grün) erfassen kann. Zusätzlich konnte somit auch eine quantitative Auswertung der Proteinbanden erfolgen. Dieser Schritt ist wichtig um das Signal, welches vom sekundären Antikörper emittiert wird, später auf die gesamte Menge der aufgetragenen Proteine normieren zu können. Dazu wurde die Membran vor der Blockierung mit Washing Revert Lösung/Total Protein Stain revert (LICOR) (10:1) für 5 min in einer lichtgeschützten Box auf dem Zellschüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 700 nm gemessen. Nach der Messung war es wichtig den Total Protein Stain (TPS) vollständig zu entfernen, damit sich die Signale von Antikörper und Total Protein Stain nicht überlappen. Dazu wurde die Membran 10 min mittels einer Entfärbe-Lösung und anschließend 3x mit Wasser gewaschen.

TBS	TBST	Washing Revert	Reversal Revert
150 mM NaCl	150 mM NaCl	CH ₃ COOH 6.7 %	0,1 M NaOH
50 mM Tris Cl pH (7,5)	50 mM Tris Cl	EtOH 30 %	EtOH 30 %
	Tween 20 0,1 %		

Tabelle 14: Mengenangaben zur Herstellung von TBS, TBST, Washing Revert und Reversal Revert

2.9 Transkriptionsanalyse

2.9.1 mRNA Isolierung und reverse Transkription

Um die Expression verschiedener Gene in Adipozyten messen zu können wurde aus diesen die mRNA isoliert. Dazu wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die mRNA wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers aufgearbeitet. Die Qualität und Konzentration der mRNA wurden mittels Nanodrop getestet. Wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben, wurde nicht die mRNA (*engl. messenger RNA*), sondern komplementäre DNA (*engl. complementary (cDNA) DNA*) zur Messung des Expressionsgrades verwendet. Da bei einer quantitativen Echtzeit Polymerasenkettenreaktion (*engl. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction /RT-qPCR*) die Replikation von DNA stattfindet und dafür doppelsträngige DNA notwendig ist. Das Umschreiben der

mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Zunächst wurde die mRNA durch Zugabe des gDNA wipeout Puffers bei 42 °C für 10 min von einer möglichen genomischen DNA-Kontamination gereinigt. Nachfolgend wurden je 1 µg mRNA mit Quantiscript RT Buffer, Quantiscript Reverse Transkriptase und RT Primer Mix bei 42 °C für 20 min inkubiert. Im letzten Schritt der Transkription erfolgte für 5 min bei 95 °C die Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Die cDNA Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert und zur Durchführung einer RT-qPCR verwendet.

2.9.2 RT-qPCR

Zur Quantifizierung des Expressionsgrades der zu untersuchenden Gene wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Dafür wurden die in Tabelle 15 aufgelisteten Substanzen auf eine lichtdurchlässige 96-Well Platte pipettiert und mittels Real-Time PCR System gemessen. In einer ersten Phase wurde für 10 min bei 95 °C die Taq Polymerase aktiviert. Darauf folgten 40 Zyklen der DNA-Verdopplung (95 °C 30 s, 45 s Primerannealing). Während der Messung interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green mit der neu synthetisierten doppelsträngigen cDNA. Ein Anstieg der cDNA Menge führt dabei zu einem Anstieg der Fluoreszenzemission, wodurch eine Quantifizierung der cDNA ermöglicht wird. Dabei ist zu beachten, dass die Fluoreszenzemission nur in der logarithmischen Phase proportional zur cDNA Menge ansteigt. In den ersten Zyklen der PCR ist die Fluoreszenzemission noch gering, da auch die Menge an cDNA noch sehr gering ist. Der Übergang von der logarithmischen in die lineare Phase, wird durch den CT-wert (*engl. threshold cycle Schwellenwertzyklus*) auf der x-Achse und dem sogenannten Schwellenwert (*engl. Threshold*) auf der y-Achse gekennzeichnet. In dieser Phase sollte sich die cDNA mit jedem Zyklus verdoppeln. Anhand des CT-Wertes und des Schwellenwertes konnte mittels der X_0 Methode die cDNA Menge quantifiziert werden. Dafür wurde folgende vereinfachte Gleichung angewandt: $X_0 = X_1 / 2^n$, wobei X_0 die neu synthetisierte cDNA, X_1 den CT-Wert und n den Threshold entspricht.

Material	Menge
cDNA	1 µl
Sybr Green	12,5 µl
Primer reverse	0,5 µM
Primer forward	0,5 µM
Nuklease freies Wasser	Ad 25 µl

Tabelle 15: Ansatz einer 1x RT-qPCR Reaktion

2.10 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der ungepaarte t-test verwendet. Um eine statistische Signifikanz zwischen mehreren Gruppen nachzuweisen, wurde eine Varianzanalyse (*analysis of variance, one-way ANOVA*) mit paarweisen post-hoc-Tests nach Tukey zwischen den verschiedenen Gruppen angewandt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha < 0,05$ definiert. Daten in Diagrammen werden, wenn nicht anders beschrieben als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. In allen Diagrammen und Abbildungen dieser Arbeit werden, wenn nicht anders bezeichnet, die 3T3-L1 Zellen in der Farbe Gelb, die 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen in der Farbe Grün, die p38MAPK α KO-Adipozyten in der Farbe Pink und die Adipozyten in der Farbe Blau dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der p38MAPK α Knock-Out Zelllinien

Wie bereits in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, reguliert die p38MAPK α verschiedene Signalwege in einer Zelle. Es wird vermutet, dass auch die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Adipozyten über die p38MAPK α reguliert wird (Aouadi, Jager et al. 2007). Auch ein Zusammenhang zwischen der GLUT4 abhängigen Glukose Aufnahme und der p38MAPK α wurde diskutiert (Somwar, Koterski et al. 2002). In diesen Studien wurde die Aktivität der p38MAPK α zwar durch verschiedene Inhibitoren gehemmt, diese aber nicht auf Genebene modifiziert. Aus diesem Grund wurde mittels der CRISPR/Cas Methode (s. Abschnitt 2.4), das Gen, welches für die p38MAPK α kodiert genetisch modifiziert. So wurde die Herstellung einer funktionsfähigen p38MAPK α unterbunden. Dazu wurden die notwendigen Konstrukte (sgRNA, Cas9) über lentivirale Transfektion in 3T3-L1 Zellen eingebracht. Nach der Infektion und Selektion der Puromycin-resistenten Zellen wurden die Proteinmengen der p38MAPK α in WT (Wildtyp) und KO (Knock-Out) Zellen, mittels Western Blot Analysen (WBA) gemessen. Wie in Abb. 6 dargestellt betrug die verbliebene Menge der p38MAPK α in 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen etwa 10% der Kontrollzellen. (MW \pm SD [p38MAPK α /TPS] 3T3-L1: 0,04 \pm 0,007 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: 0,005 \pm 0,0004). Auch nach der Differenzierung zu adipozytenähnlichen Zellen der 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen blieb der KO weiterhin bestehen. Wie in Abb. 6 zu erkennen besteht auch zwischen den Adipozyten und den p38MAPK α KO-Adipozyten ein signifikanter Unterschied (Adipozyten: 0,15 \pm 0,08, p38MAPK α KO-Adipozyten: 0,0025 \pm 0,001).

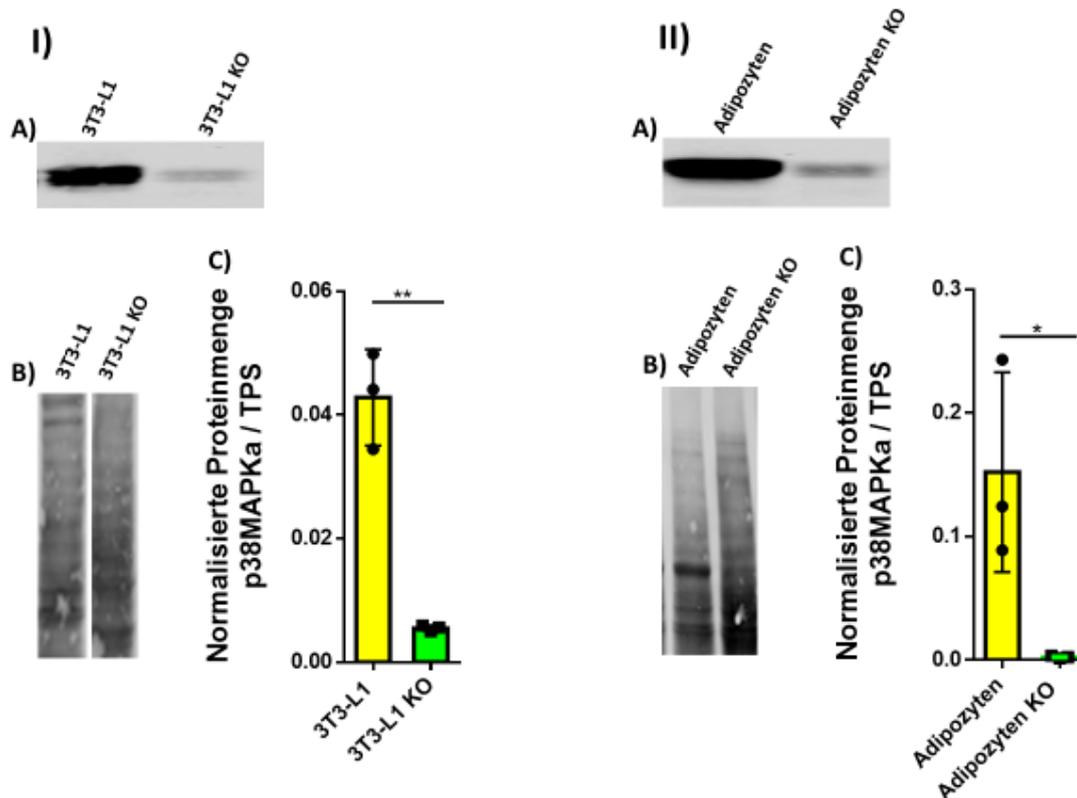


Abb. 6: Proteinmenge der p38MAPK α . I) A) Exemplarische WBA (Western Blot Analyse) von p38MAPK α in 3T3-L1- und 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen B) Als Ladekontrolle wurde ein Total Protein Stain (TPS) durchgeführt. C) Quantitative Auswertung der p38MAPK α mittels WBA. II) A) Exemplarische WBA (Western Blot Analyse) von p38MAPK α in Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten B) Als Ladekontrolle wurde ein Total Protein Stain (TPS) durchgeführt. C) Quantitative Auswertung der p38MAPK α mittels WBA. Alle Daten werden als MW \pm SD abgebildet, n=3. Die statistische Signifikanz zwischen den Gruppen wurde mittels ungepaarten t-test bestimmt *=p<0,05, **=p<0,01. Alle Werte wurden auf das TPS normiert.

3.2 Verminderte Differenzierung der 3T3-L1 Zellen in Abwesenheit der p38MAPK α

Die Differenzierung der 3T3-L1- und 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen zu Adipozyten erfolgte wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben. Dabei wurden beide Zelltypen unter gleichen Bedingungen kultiviert und behandelt. Dennoch konnte keine Differenzierung der 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen zu Adipozyten erzielt werden. Der Differenzierungsgrad der Kontroll- und KO-Zellen an unterschiedlichen Tagen ist in Abb. 7 und Abb. 8 dargestellt. Während der Differenzierung wurde beobachtet, dass sich die 3T3-L1 Zellen am ersten und zweiten Tag der Differenzierung lediglich voneinander entfernten, während die 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen agglomerierten. Dies weist daraufhin, dass in den 3T3-L1 Zellen im Vergleich zu den 3T3-L1

p38MAPK α KO-Zellen die Zellteilung eingestellt und der Differenzierungsprozess begonnen hat, denn eine Differenzierung ist nur in nicht proliferierenden Zellen möglich. Außerdem konnten in den 3T3-L1 Zellen schon ab Tag vier des Differenzierungsprozesses Adipozytenvesikel beobachtet werden. Solche waren in den 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen in keinem Schritt der Differenzierung zu sehen. Ab Tag fünf bildeten sich in den 3T3-L1 Zellen die ersten Fetttropfen, welche nach dem neunten Tag in ihrer Anzahl und ihrem Differenzierungsgrad relativ konstant blieben. An Tag zehn des Differenzierungsprozesses wurden beide Zelllinien mittels Ölrot-O-Färbung gefärbt. Die Ölrot-O-Färbung ist wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben eine Methode, mit welcher Triglyceride in fixierten Zellen dargestellt werden können. In Abb. 9 sind Adipozyten (A) und p38MAPK α KO-Adipozyten (B) nach der Färbung dargestellt. Während die Adipozyten in Abb. 9A deutlich Farbe aufnehmen, sieht man in Abb. 9B nur wenige rote Zellen. Da die Ölrot-O-Färbung eine hohe Fettspezifität aufweist ist davon auszugehen, dass sich in Abb. 9B im Vergleich zur Abb. 9A nur wenige Adipozyten gebildet haben. Dies weist auf eine eingeschränkte Differenzierung der p38MAPK α KO-Adipozyten hin.

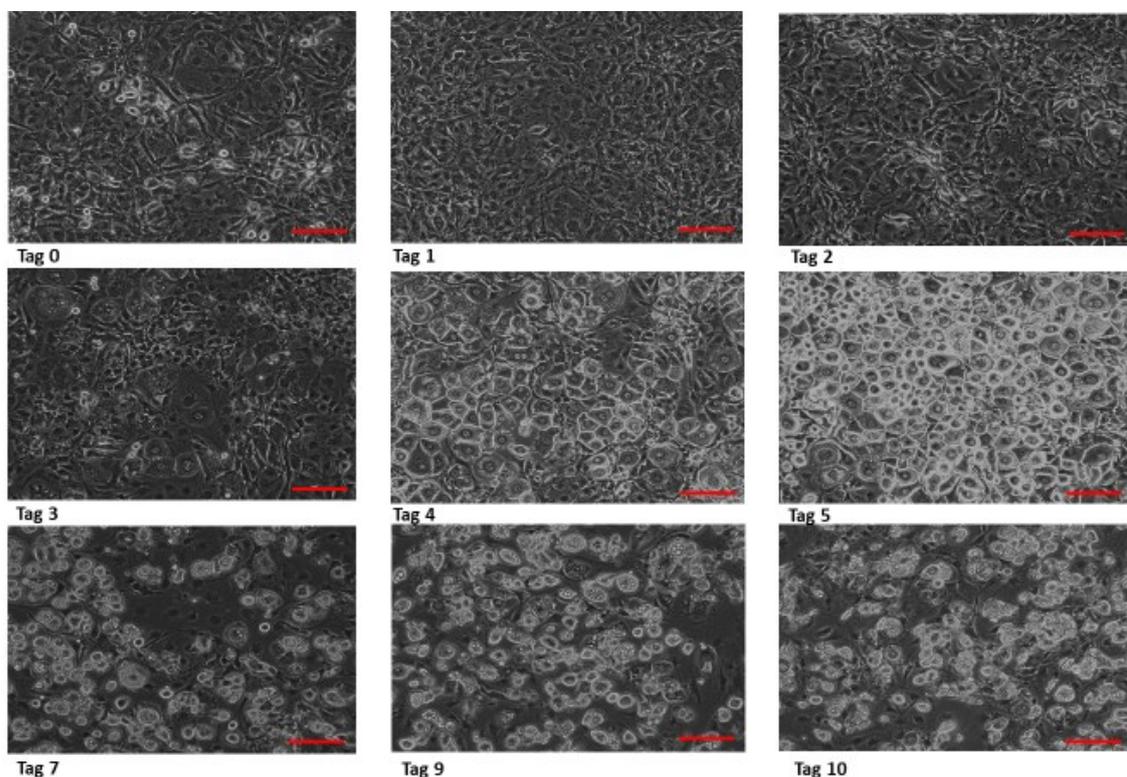


Abb. 7: Differenzierung von 3T3-L1 Zellen. An den Tagen 1 und 2 findet die Vorbereitung auf die Differenzierung statt. An Tag 4 sieht man bereits die ersten Vesikel. An Tag 5 werden Lipid Tropfen sichtbar. Zwischen Tag 8 und 10 erreichen die Zellen ihren höchsten Differenzierungsgrad. Lichtmikroskop Zeiss, Software: Axiovision, 10x Objektiv, roter Balken entspricht 100 μ m.

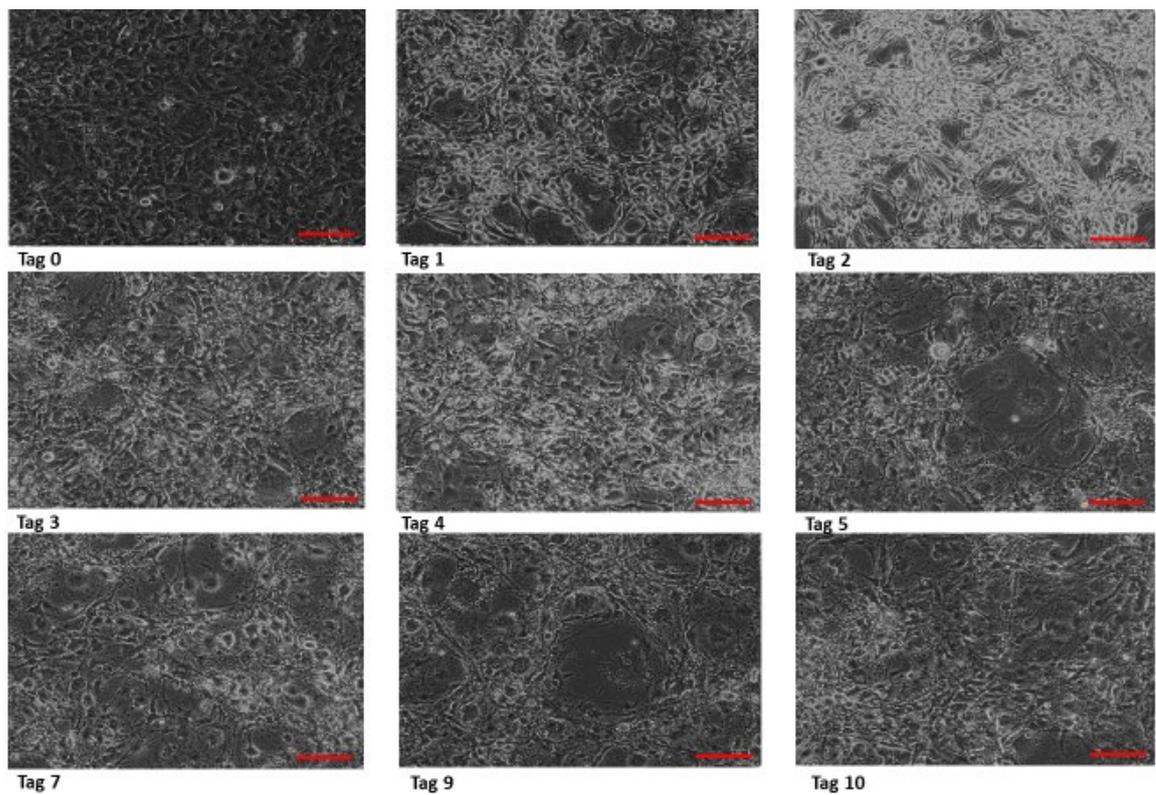


Abb. 8: Differenzierung von 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen. An den Tagen 1 und 2 ist eine deutliche Vermehrung der Zellen und eine Ansammlung dieser in Gruppen zu sehen. Die Zellteilung scheint sich ab Tag 3 einzustellen. Dennoch ist an allen Tagen ein Auseinanderziehen und somit eine Vermehrte Zellansammlungen an einem bestimmten Ort zu beobachten. Eine Bildung von Vesikeln oder Fetttropfen ist nicht zu sehen. Lichtmikroskop Zeiss, Software: Axiovision, 10x Objektiv, roter Balken entspricht 100 μ m.

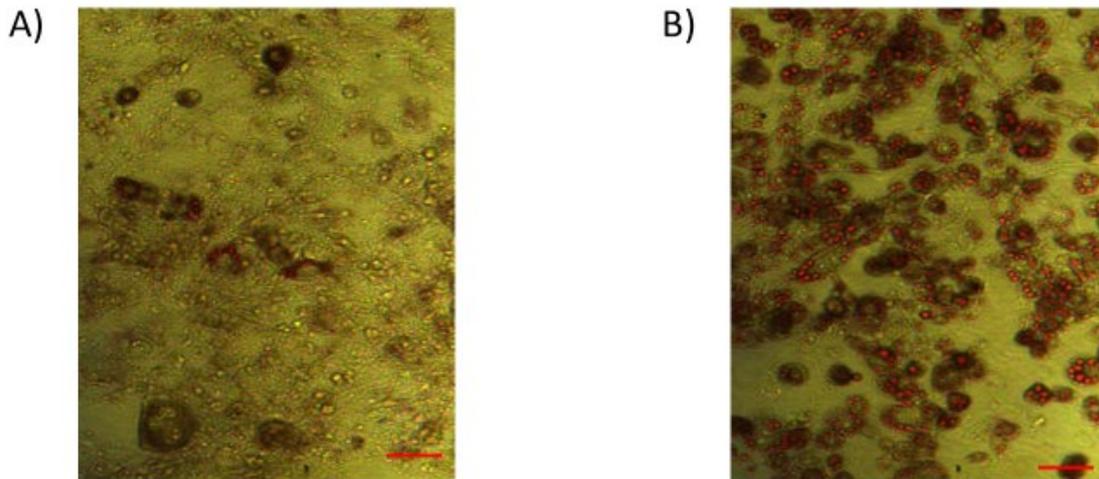


Abb. 9: Färbung der Adipozyten mit Ölrot-O Färbung. A) Adipozyten nach der Färbung mit einer Ölrot-O-Lösung. B) p38MAPK α KO-Adipozyten nach der Färbung mit einer Ölrot-O-Lösung. Im Gegensatz zu A) sind in B) nur vereinzelt Fetttropfen zu erkennen. Lichtmikroskop Zeiss, Software: Axiovision, 10x Objektiv, roter Balken entspricht 50 μ m.

3.2.1 Reduzierte Expression von Adipozytenmarkern in p38MAPK α KO-Adipozyten

Zur weiteren Charakterisierung eines adipozytenähnlichen Phänotyps nach der Differenzierung von 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen wurden mRNA Analysen von verschiedenen Adipozytenmarkern durchgeführt. Adipozytenmarker sind Proteine, welche fast ausschließlich in Adipozyten exprimiert werden. Mittels RT-qPCR wurde die Expression von Adiponektin, Leptin, FABP4, Perilipin 2 und Perilipin 5 gemessen. Diese wurden ausführlich in 1.2.1 beschrieben. Als Kontrolle wurde das Gen *CSNK2b* eingesetzt, welches fast ubiquitär vorkommt. Da wie in Abb. 10 zu sehen ist kein Unterschied der Amplifikationskurven des *CSNK2b* Gens in den verschiedenen Zellgruppen besteht, eignete sich dieses gut als Kontrollgen. In Abb. 11 sind die relativen mRNA Mengen von Adiponektin, Leptin, FABP4 und Perilipin 5 graphisch dargestellt. Die Werte wurden wie oben erwähnt auf die Expression des Kontrollgens *CSNK2b* normiert. Dabei ist ein signifikanter Unterschied der Expression der Adipozytenmarker in den Adipozyten zu den restlichen Zelllinien zu sehen. Die Adiponektinexpression ist in den Adipozyten ca. 50mal höher als in den p38MAPK α KO-Adipozyten (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 4,2 \pm 2,4, p38MAPK α KO-Adipozyten: 0,08 \pm 0,03). Auch Leptin ist in den Adipozyten 5mal stärker exprimiert als in den p38MAPK α KO-Adipozyten (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 0,0002 \pm 0,00016, p38MAPK α KO-Adipozyten: 4E-05 \pm 3,2E-05). FABP4 wird 24mal stärker in

Adipozyten als in p38MAPK α KO-Adipozyten (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 128 \pm 86, p38MAPK α KO-Adipozyten: 5,4 \pm 3,) exprimiert und Perilipin 5 zeigt eine 40fach höhere Expressionsrate in Adipozyten als in p38MAPK α KO-Adipozyten (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 7,6E-06 \pm 2,6E-06, p38MAPK α KO-Adipozyten: 1,8E-07 \pm 3,2E-07). Dies weist daraufhin, dass keine Differenzierung in den 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen stattgefunden hat. Diese Unterschiede werden auch in den in Abb. 12 dargestellten Amplifikationskurven sichtbar. In Abb. 12D ist zusätzlich zu erkennen, dass Perilipin 5 erst sehr spät amplifiziert wird. Dies weist daraufhin, dass auch wenn die Expression von Perilipin 5 in den Adipozyten höher ist als diese in den p38MAPK α KO-Adipozyten, die Menge an Transkripten des Perilipin 5 Gens in den Adipozyten insgesamt gering ist. Perilipin 2 weist nicht das gleiche Muster, wie die restlichen Adipozytenmarker auf. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, besteht kein signifikanter Unterschied des Expressionsgrades von Perilipin 2 zwischen den vier Zellgruppen (MW \pm SD [X0], 3T3-L1 Zellen: 0,7 \pm 0,08, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: 1,3 \pm 0,4, Adipozyten: 0,8 \pm 0,1, p38MAPK α KO-Adipozyten: 1,5 \pm 1,0). Auch die Amplifikationskurven, welche in der gleichen Abbildung zu sehen sind, stellen sich nahezu identisch dar.

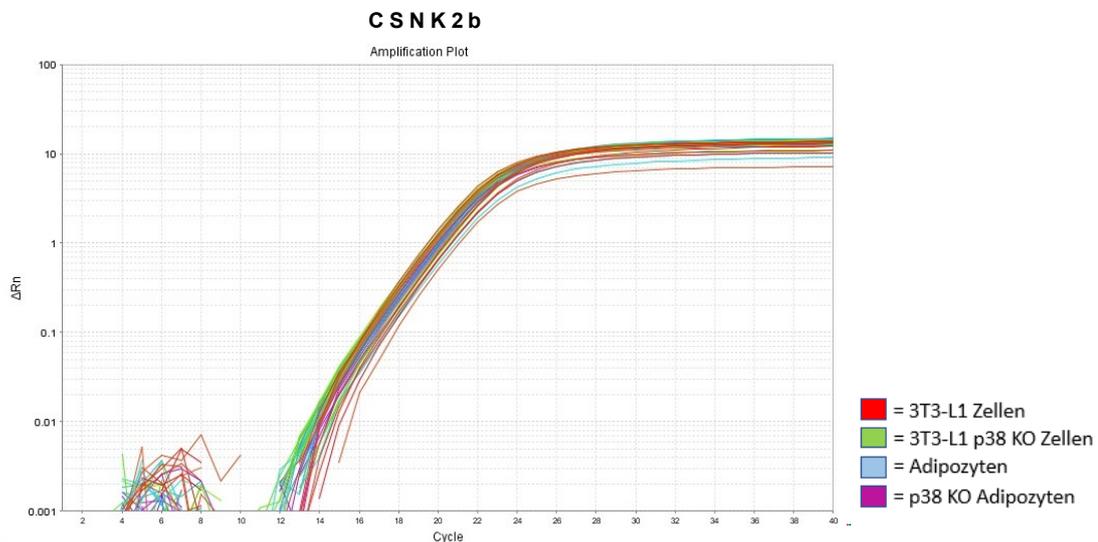


Abb. 10: Amplifikationskurve von Cnsk2b. Rot: 3T3-L1 Zellen, Grün: 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Violett: p38MAPK α KO-Adipozyten, Blau: Adipozyten Die Amplifikationskurven der verschiedenen Zelllinien stellen sich deckungsgleich dar.

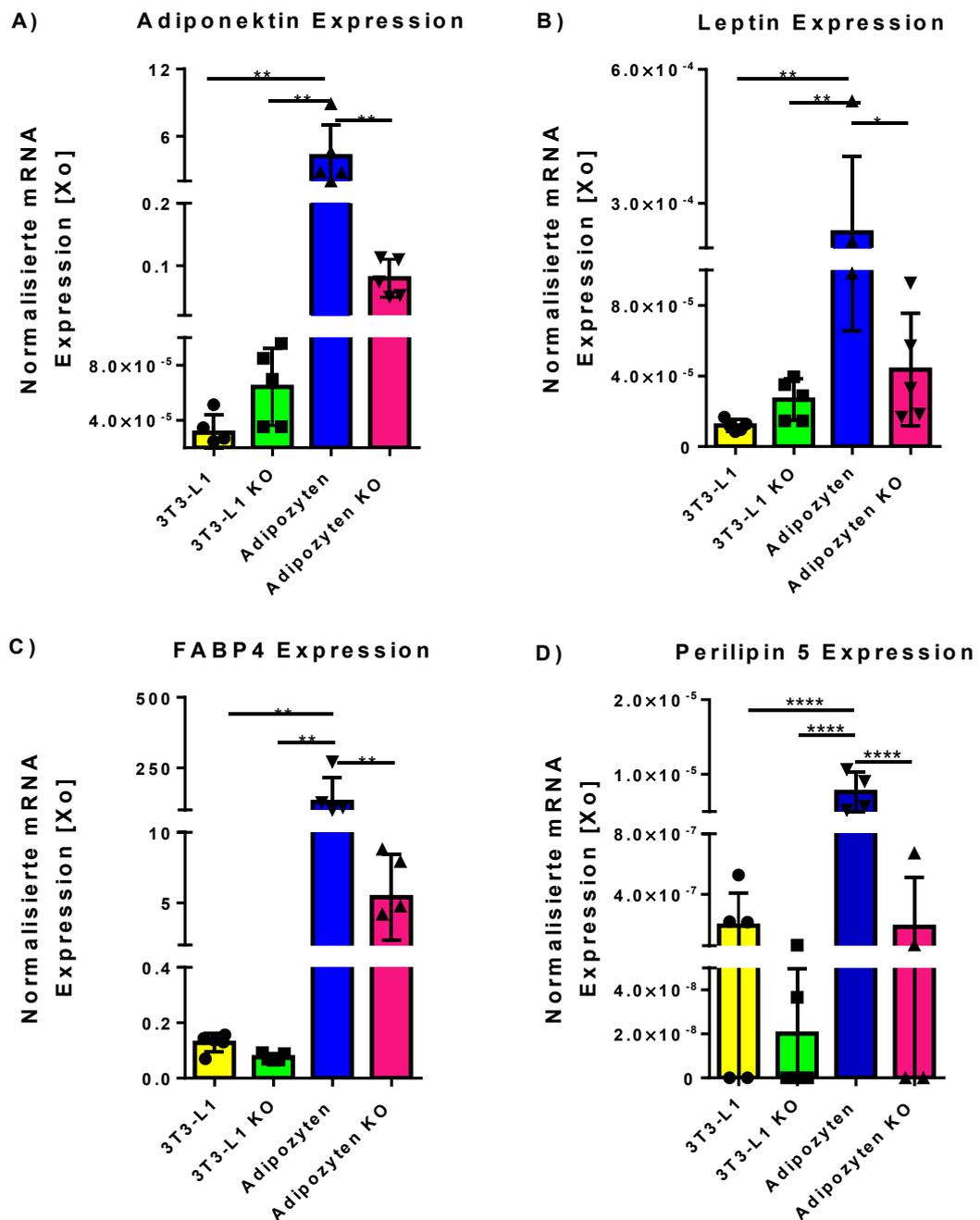
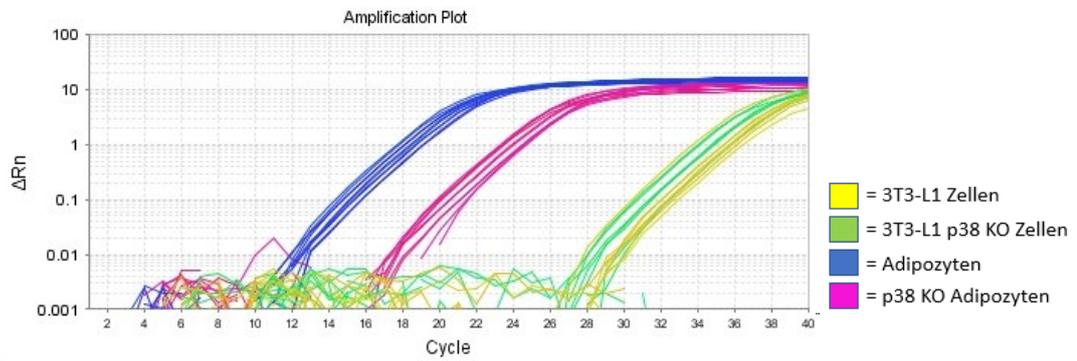


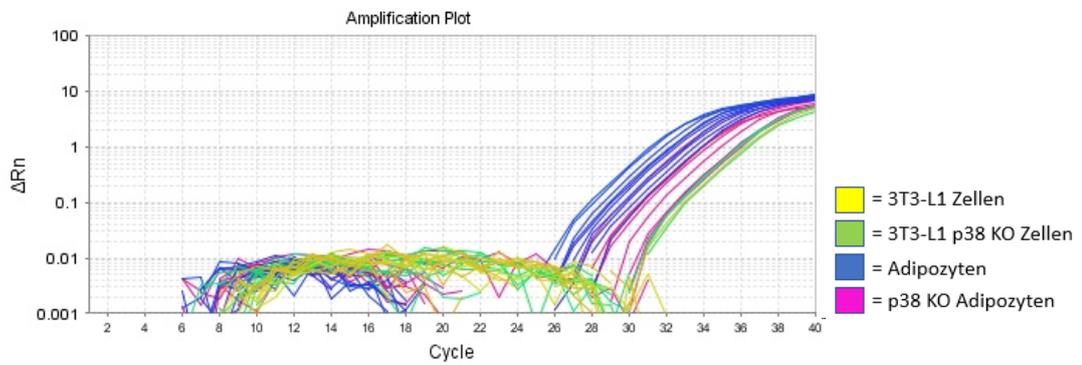
Abb. 11: Analyse der mRNA Menge von Adipozytenmarkern in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der Adiponektin Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. B) Graphische Darstellung der Leptin Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. C) Graphische Darstellung der FABP4 Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. D) Graphische Darstellung der

Perilipin 5 Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A), B), C), D): Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von allen Adipozytenmarkern in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. Alle Werte wurden auf die Expression des Kontrollgens *Csnk2b* normiert. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (*engl.: Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ****= $p < 0,0001$.

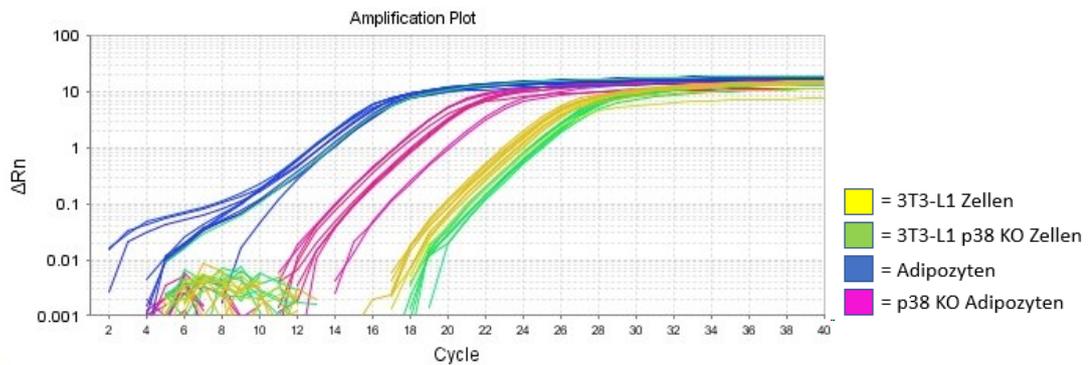
A) Adiponektin



B) Leptin



C) FABP4



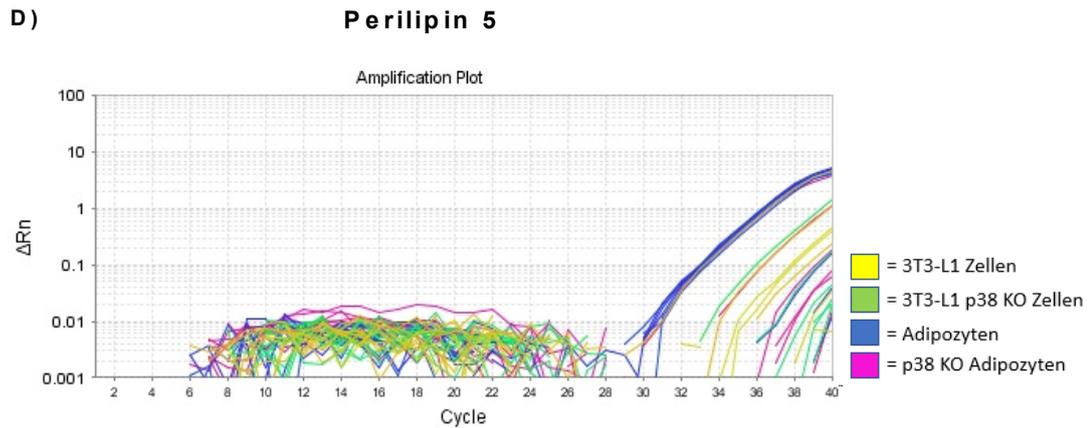
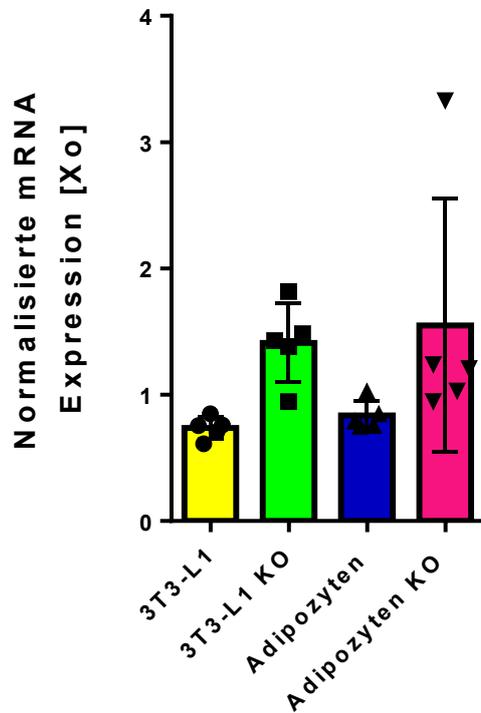


Abb. 12: Amplifikationskurven der Adipozytenmarker. Gelb: 3T3-L1 Zellen, Grün: 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Pink: p38MAPK α KO-Adipozyten, Blau: Adipozyten. A) Amplifikationskurve von Adiponektin. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Adipozyten und den restlichen Zelllinien zu sehen. Auch die Amplifikationskurve der p38MAPK α KO-Adipozyten grenzt sich deutlich von den 3T3-L1- und 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen ab. B) Amplifikationskurve von Leptin. C) Amplifikationskurve von FABP4. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Adipozyten und den restlichen Zelllinien zu sehen D) Amplifikationskurve von Perilipin 5. Späte Amplifikation des Gens. Damit ist von einer insgesamt geringen Transkript Menge auszugehen.

A) Perilipin 2 Expression



B) Perilipin 2

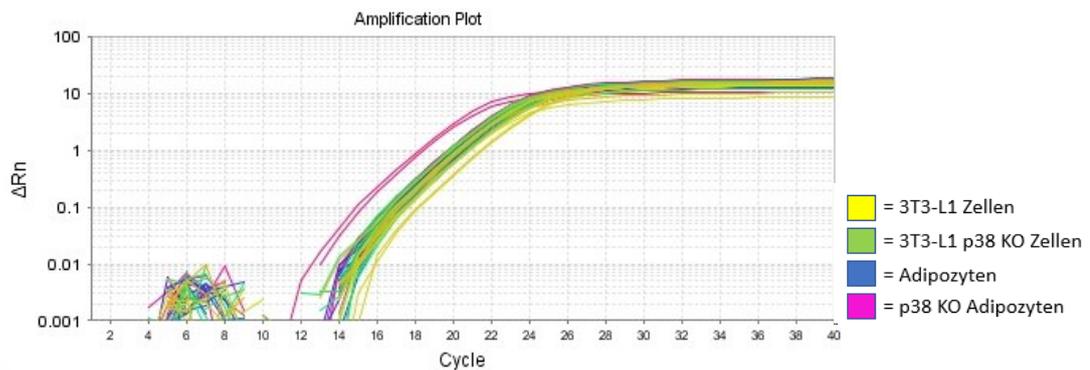
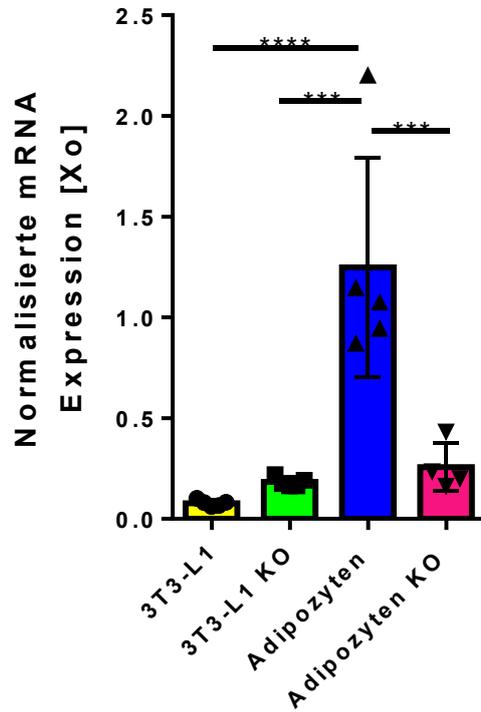


Abb. 13: Analyse der mRNA Menge von Perilipin 2 in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der Perilipin 2 Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Expression von Perilipin 2 zwischen den Zelllinien. B) Amplifikationskurve von Perilipin 2. Die Amplifikationskurven aller Zelllinien stellen sich deckungsgleich dar. Alle Werte wurden auf die Expression des Kontrollgens Csnk2b normiert. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt. P>0,05.

3.2.2 Reduzierte PPARG und PPARGC1a Expression in p38MAPK α KO-Adipozyten

Der genaue Mechanismus, über welchen die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Adipozyten stattfindet, ist noch nicht bekannt. Aus früheren Studien geht hervor, dass PPAR- γ sowie PGC1 α eine wesentliche Rolle in der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Adipozyten spielen (Gregoire, Smas et al. 1998). Wie aus den Ergebnissen in Abschnitt 3.2 hervorgeht, werden die 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen nicht vollständig in Adipozyten differenziert. In Abb. 14 und Abb. 15 ist zu sehen, dass sowohl PPAR- γ als auch PPARGC1 α in den Adipozyten stärker exprimiert sind als in den p38MAPK α KO-Adipozyten. Zudem wird deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Expression der beiden Gene zwischen den anderen Zellgruppen gibt (3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen und p38MAPK α KO-Adipozyten). Die graphische Darstellung in Abb. 14. zeigt, dass PPAR γ 5x stärker in Adipozyten als in p38MAPK α KO-Adipozyten exprimiert wird (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 1,2 \pm 0,5, KO-Adipozyten: 0,25 \pm 0,12). Die Expression von PPARGC1 α (Abb. 15) verhält sich mit einer 10x höheren Expression in Adipozyten im Vergleich zu den p38MAPK α KO-Adipozyten ähnlich (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 0,03 \pm 0,01, p38MAPK α KO-Adipozyten: 0,003 \pm 0,001). Diese Beobachtungen sind auch in den unter den Graphen dargestellten Amplifikationskurven sichtbar zu entnehmen.

A) PPARG Expression



B) PPARG

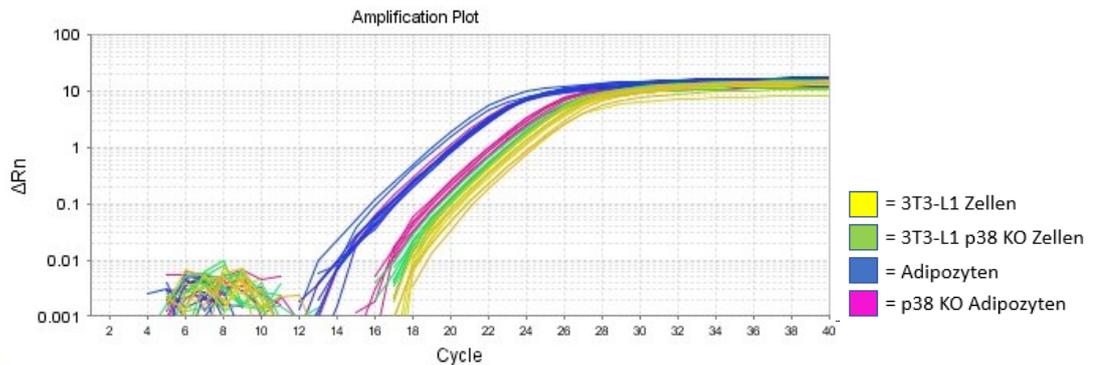
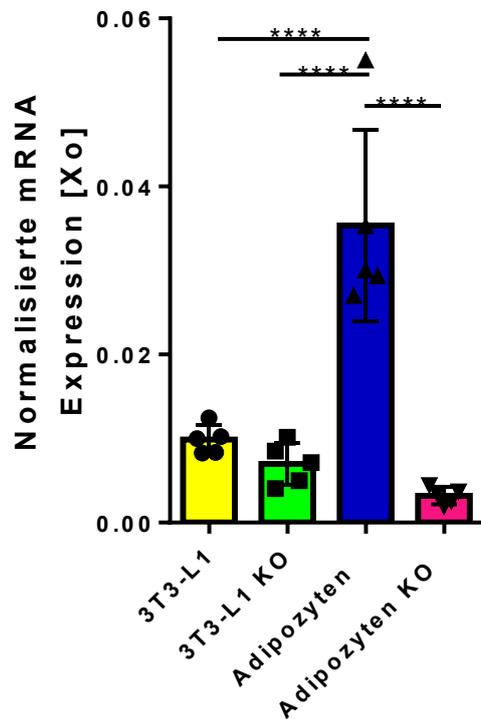


Abb. 14: Analyse der mRNA Menge von PPAR γ in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der PPAR γ Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von PPAR γ in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. B) Amplifikationskurve von PPAR γ . Die Amplifikationskurve der Adipozyten (blau) grenzt sich deutlich von diesen der weiteren Zelllinien ab. Alle Werte wurden auf die Expression des Kontrollgens Csnk2b normiert. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt. ***=p<0,01, ****=p<0,001.

A) PPARGC1a Expression



B) PPARGC1a

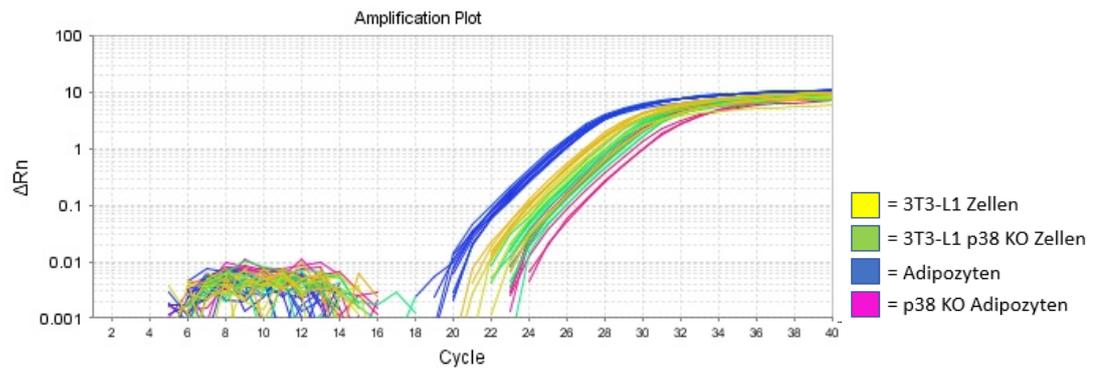


Abb. 15: Analyse der mRNA Menge von PPARGC1a in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPKα KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPKα KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der PPARGC1a Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPKα KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPKα KO-Adipozyten. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von PPARGC1a in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. B) Amplifikationskurve von PARGC1a. Die Amplifikationskurve der Adipozyten (blau) grenzt sich deutlich von diesen der weiteren Zelllinien ab. Alle Werte wurden auf die Expression des Kontrollgens Csnk2b normiert. Alle Daten sind als MW±SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, ****= $p < 0,001$.

3.2.3 Reduzierte Expression von UCP 1 und UCP 3 in p38MAPK α KO-Adipozyten.

Bei den Entkopplungsproteinen (*engl. Uncoupling Protein/Ucp*) handelt es sich um Transmembranproteine, welche wie in 1.1.1 beschrieben wurde, die Atmungskette entkoppeln. Es sind insgesamt fünf Entkopplungsproteine bekannt.

Untersucht wurden nur Ucp1, Ucp2 und Ucp3, da Ucp4 und Ucp5 in neuronalen-, nicht jedoch in Fettgewebe vorkommen. Ucp1 ist fast ausschließlich in der Mitochondrienmembran des braunen Fettgewebes zu finden. Es wird auch als Thermogenin bezeichnet, da es der zitterfreien Wärmebildung dient. Wie in Abb. 18 dargestellt, ist die Expression von Ucp1 in den Adipozyten signifikant höher als jene in den p38MAPK α KO-Adipozyten (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 2E-05 \pm 8E-06, p38MAPK α KO-Adipozyten: 8E-06 \pm 1,9E-06). Aus den Daten geht auch hervor, dass Ucp1 nicht nur in Adipozyten, sondern auch bereits in 3T3-L1 Zellen exprimiert wird. 3T3-L1 Zellen wiesen eine dreifach so hohe UCP1 Expression auf als 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen. (MW \pm SD [X0], 3T3-L1 Zellen: 2,6E-05 \pm 9E-06, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: 9E-06 \pm 4,5E-06).

Ucp3 wird vor allem in Muskelgewebe und braunem Fettgewebe exprimiert (Vidal-Puig, Solanes et al. 1997). In Abb. 18 ist eine 50 x höhere Expression von Ucp3 in Adipozyten im Vergleich zu den p38MAPK α KO-Adipozyten (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 2E-03 \pm 4E-04, p38MAPK α KO-Adipozyten: 4,5E-05 \pm 3,4E-05) zu sehen.

Ucp2 wird in mehreren Geweben und Zellen exprimiert (Weißes Fettgewebe, Lunge, Pankreas, Milz, B-Lymphozyten) (Thompson and Kim 2004). Seine Rolle in den verschiedenen Geweben ist allerdings noch nicht vollständig erforscht. Wie in Abb. 13 dargestellt zeigte Ucp2 keinen signifikanten Expressionsunterschied in Wildtyp und KO-Zellen (MW \pm SD [X0], Adipozyten: 0,4 \pm 0,1, p38MAPK α KO-Adipozyten: 0,3 \pm 0,14).

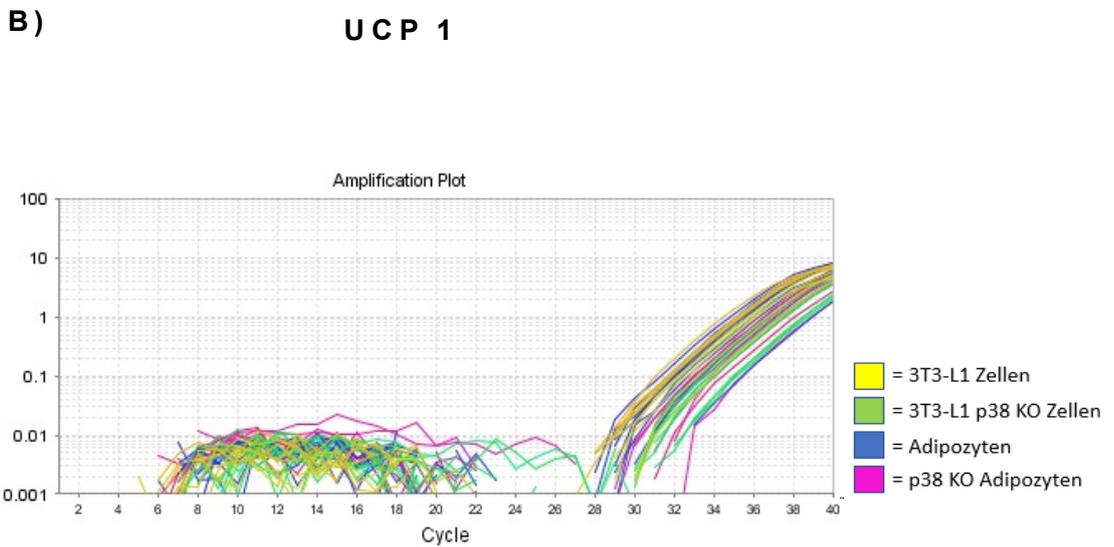
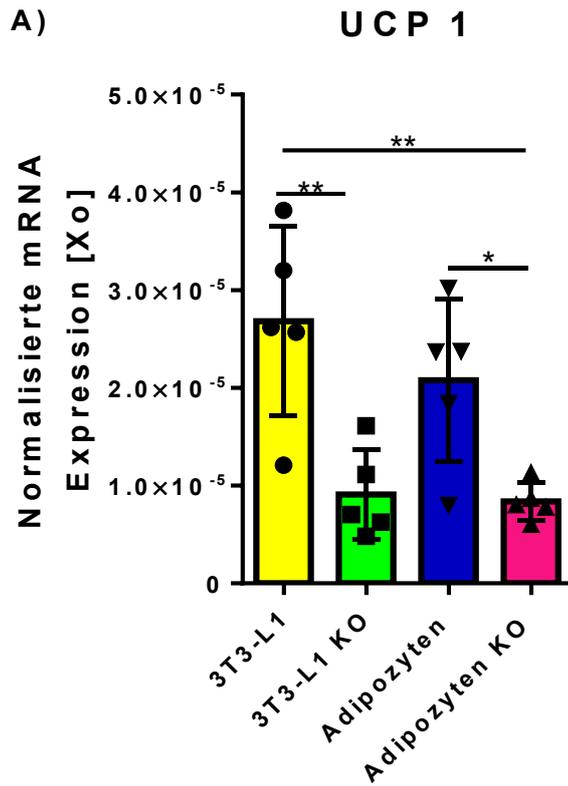


Abb. 16: Analyse der mRNA Menge von UCP1 in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der UCP1 Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. Die Expression von UCP1 in 3T3-L1 Zellen und Adipozyten ist signifikant höher als diese der KO-Zelllinien. B) Amplifikationskurve von UCP1. Alle Werte wurden auf die Expression des Kontrollgens Csnk2b normiert. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (*engl.: Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, *=p<0,05, **=p<0,01.

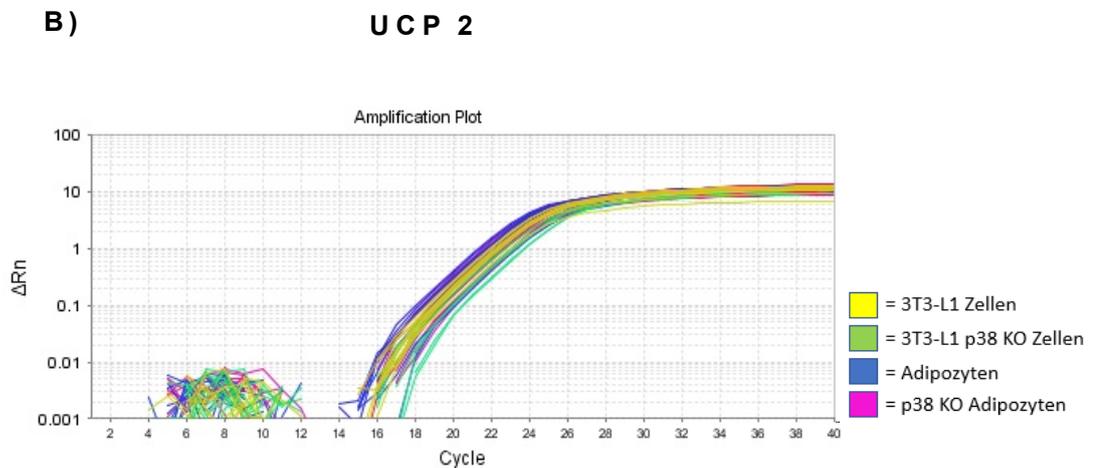
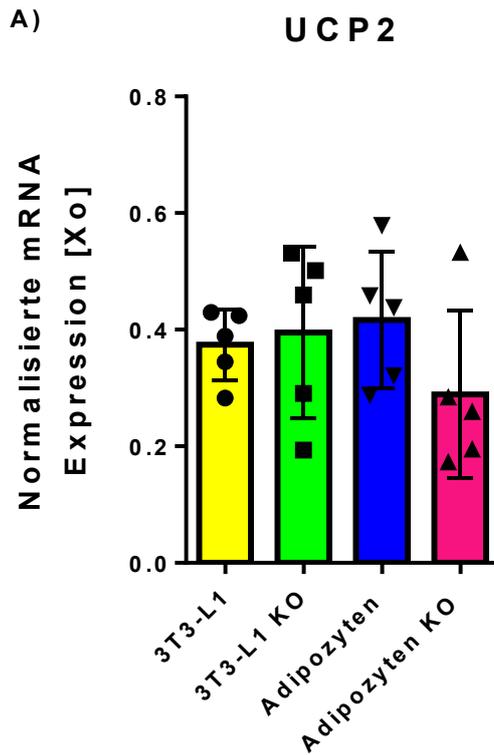


Abb. 17: Analyse der mRNA Menge von UCP2 in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der UCP2 Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. Es zeigt sich kein Unterschied in der Expression von UCP2 in den verschiedenen Zelllinien. B) Amplifikationskurve von UCP2. Die Amplifikationskurven der 4 Zellreihen stellen sich deckungsgleich dar. Alle Werte wurden auf die Expression des Kontrollgens *Csnk2b* normiert. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (*engl.: Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, $p > 0,05$.

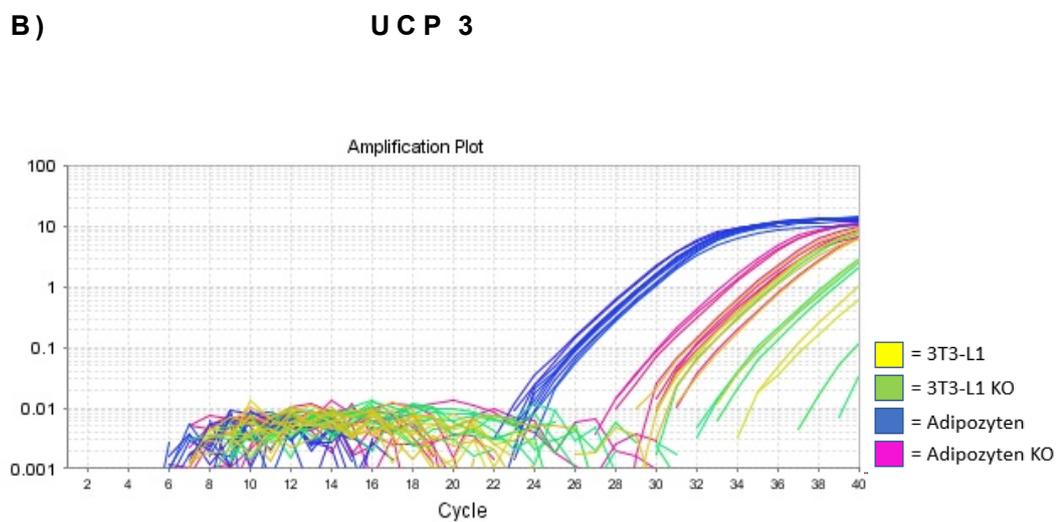
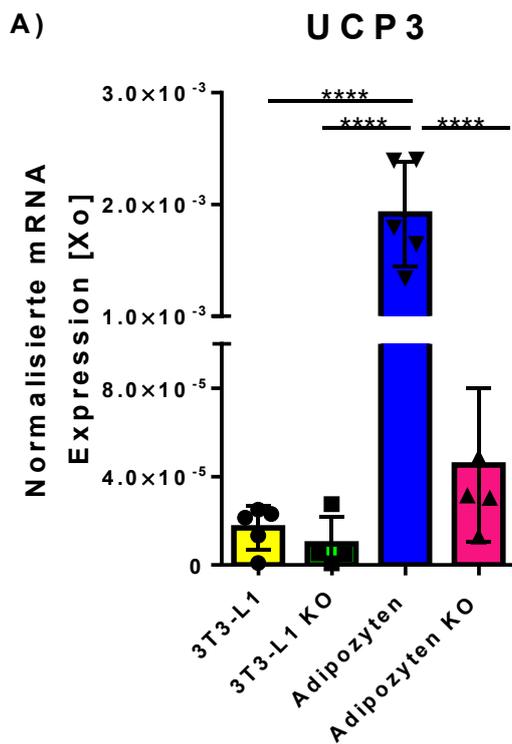


Abb. 18: Analyse der mRNA Menge von UCP3 in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der UCP3 Expression in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von UCP3 in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. B) Amplifikationskurve von UCP3. Die Amplifikationskurve der Adipozyten (blau) grenzt sich deutlich von diesen der weiteren Zelllinien ab. Alle Werte wurden auf die Expression des Kontrollgens Csnk2b normiert. Alle Daten sind als

MW±SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, ****= $p < 0,001$.

3.3 Expression der Glukose Transporter 4 und Glukose Transporter 1 in Abhängigkeit von der p38MAPK α in Adipozyten

In Adipozyten wird GLUT4 als metabolischer Adipozytenmarker bezeichnet, da dieser in Adipozyten, aber nicht in 3T3-L1 Zellen vorkommt. Um einen Einfluss der Abwesenheit der p38MAPK α auf die Expression des GLUT4 nachzuweisen, wurden sowohl WBA als auch mRNA Analysen von Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten durchgeführt. Auf Proteinebene (Abb. 19) ist der GLUT4 in den 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen und p38MAPK α KO-Adipozyten im Vergleich zu den Adipozyten nur gering nachzuweisen. (MW±SD [GLUT4/TPS], 3T3-L1 Zellen: $0,009 \pm 0,0016$, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: $0,01 \pm 0,003$, Adipozyten: $0,08 \pm 0,008$, p38MAPK α KO-Adipozyten: $0,013 \pm 0,007$). Auch auf mRNA Ebene (Abb. 20) ist ein signifikanter Unterschied bezüglich der GLUT 4 Expression zwischen Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten zu sehen (MW \pm SD [X0], Adipozyten: $0,009 \pm 0,003$, p38MAPK α KO-Adipozyten: $0,00013 \pm 8,2E-05$). Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen und p38MAPK α KO-Adipozyten (MW \pm SD [X0], 3T3-L1 Zellen: $6,9E-06 \pm 5,6E-06$, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: $1,0E-06 \pm 4,5E-07$, p38MAPK α KO-Adipozyten: $0,00013 \pm 8,2E-05$).

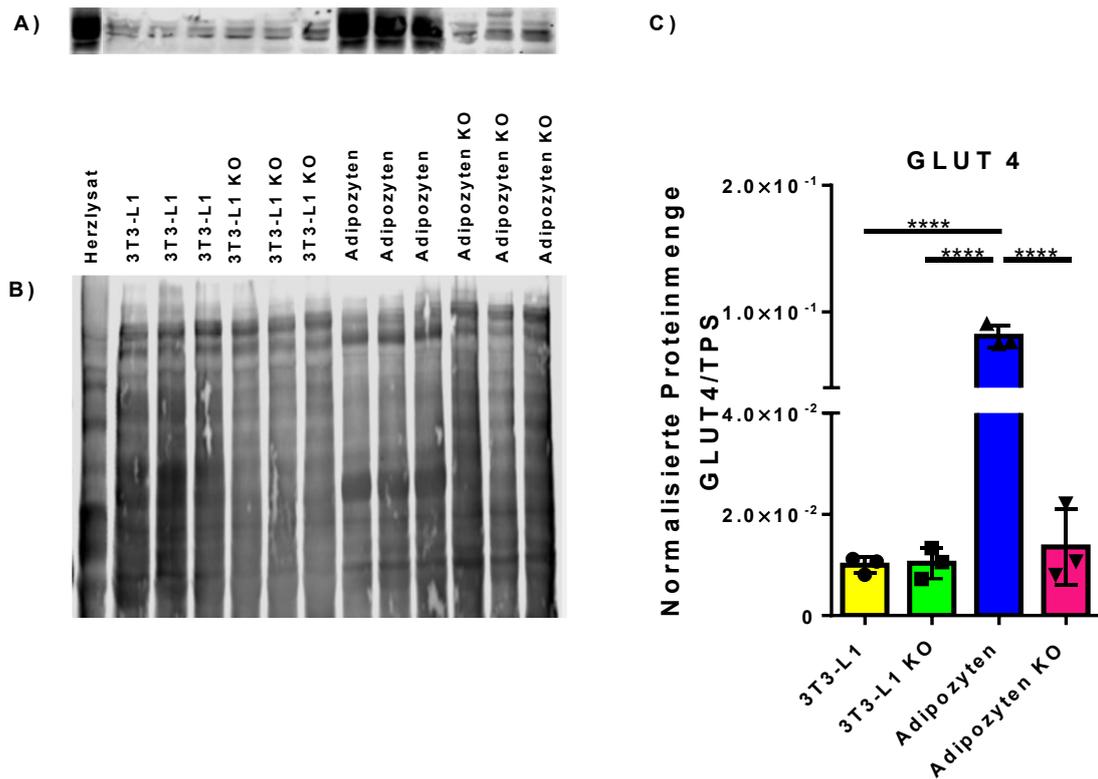


Abb. 19: Proteinmenge des GLUT4 (Glukose Transporter 4). A) Exemplarische WBA (Western Blot Analyse) von GLUT4 in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten, p38MAPK α KO-Adipozyten. Als Kontrolle wurde ein Herz Lysat genommen, da im Herzen die Expression von GLUT4 bekannt ist. B) Als Ladekontrolle wurde ein Total Protein Stain (TPS) durchgeführt. C) Quantitative Auswertung des GLUT4. Alle Daten sind als $MW \pm SD$ abgebildet, $n=3$. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, ****= $p < 0,0001$. Alle Werte wurden auf das TPS normiert.

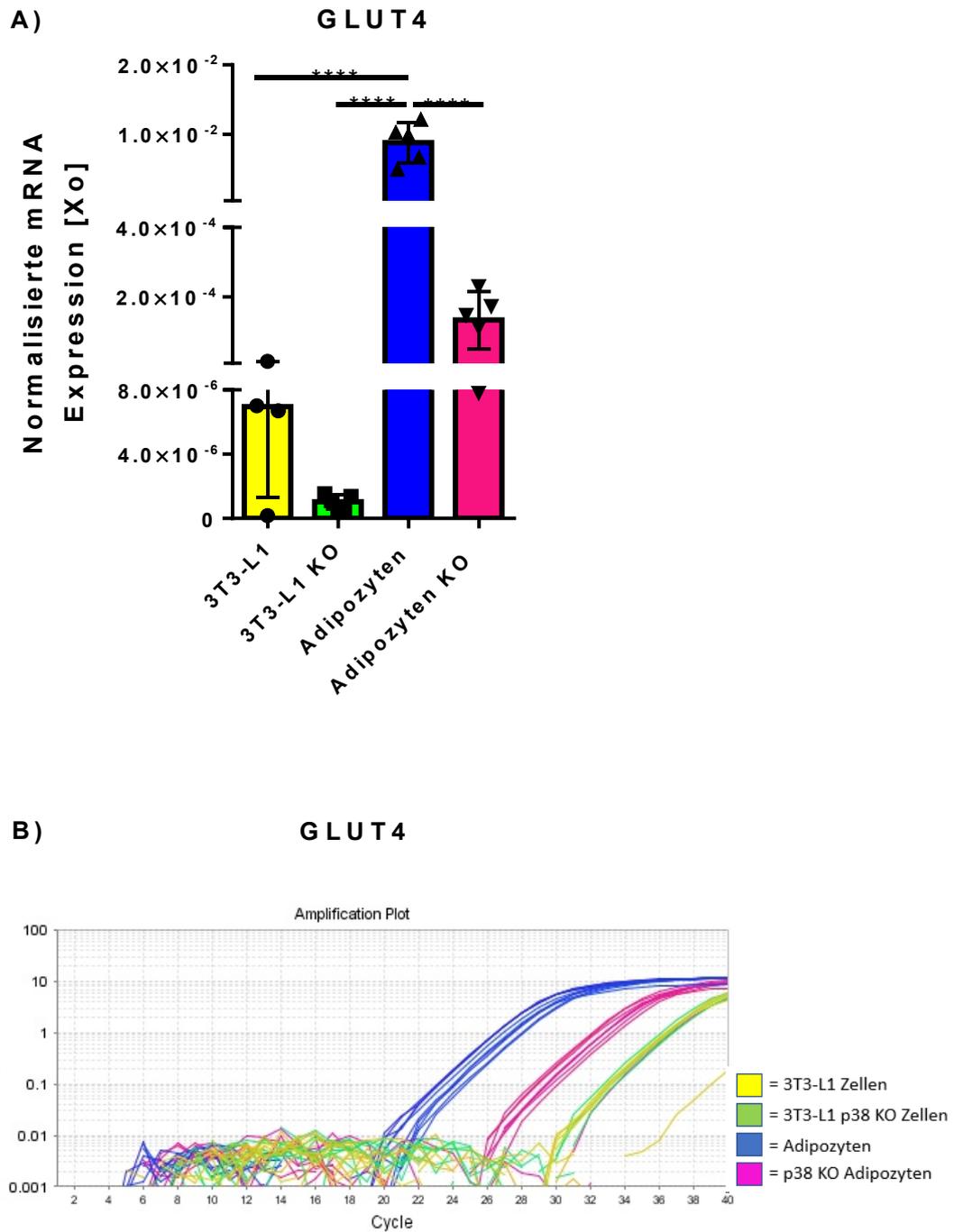


Abb. 20: Analyse der mRNA Menge von GLUT4 (Glukose Transporter 4) in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der GLUT4 Expression in allen Zelllinien. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression von GLUT4 in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. C) Amplifikationskurve von GLUT4. Die Amplifikationskurve der Adipozyten (blau) grenzt sich von diesen der restlichen Zelllinien schon in einem frühen Zyklus der Replikation ab. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, ****= $p < 0,001$.

3.3.1

Bezüglich des Vorhandenseins des GLUT1 in WT und KO- Zellen, sowie zwischen 3T3-L1 Zellen und Adipozyten zeigten sich konträre Ergebnisse auf Protein und mRNA Ebene. Wie in Abb. 21 zu sehen zeigte sich in 3T3-L1 Zellen eine höhere Anzahl an GLUT1 im Vergleich zu den restlichen Zelllinien (MW \pm SD [X0], 3T3-L1 Zellen: $0,008 \pm 0,004$, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: $0,003 \pm 0,0014$, Adipozyten: $0,003 \pm 0,002$, p38MAPK α KO-Adipozyten: $0,0017 \pm 0,0005$). Ein Zusammenhang der Expression von GLUT1 und der p38MAPK α konnte wie in Abb. 22 zu erkennen nicht nachgewiesen werden. In der graphischen Darstellung ist kein signifikanter Unterschied der GLUT1 Expression zwischen den Zelllinien zu sehen (MW \pm SD [X0], 3T3-L1 Zellen: $1,2 \pm 0,13$, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: $1,2 \pm 0,2$, Adipozyten: $0,9 \pm 0,14$, p38MAPK α KO-Adipozyten: $0,7 \pm 0,2$) und auch die Amplifikationskurven der verschiedenen Zelllinien verlaufen ähnlich.

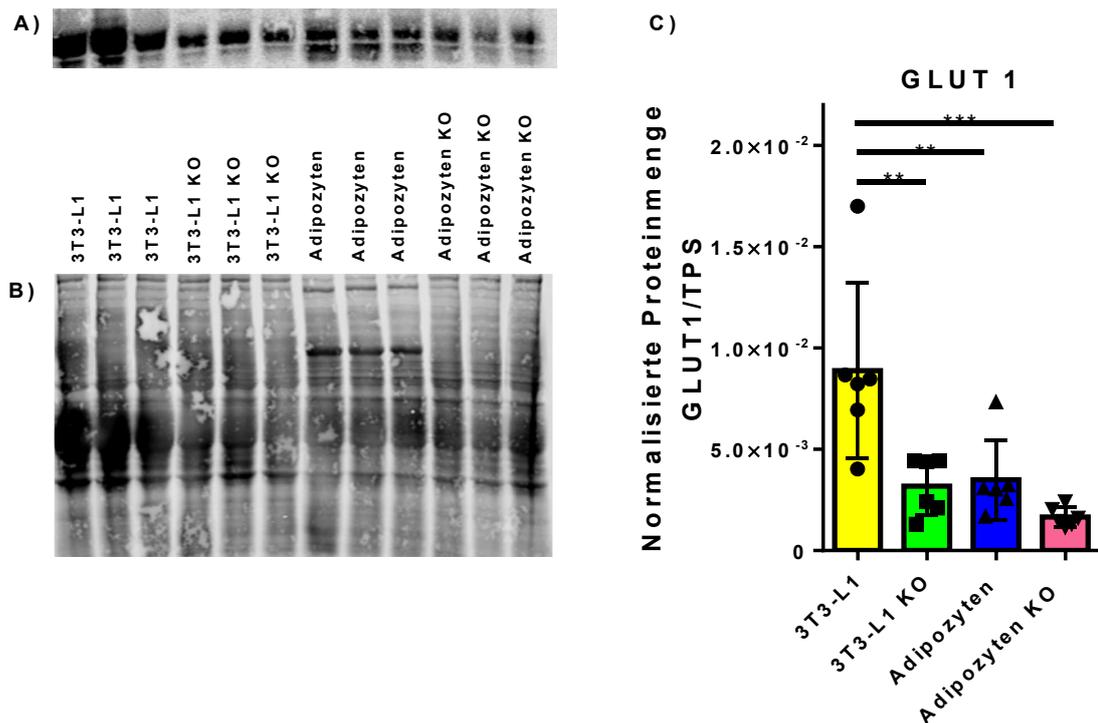


Abb. 21: Proteinmenge des GLUT1 (Glukose Transporter 1). A) Exemplarische WBA (Western Blot Analyse) von GLUT1 in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten, p38MAPK α KO-Adipozyten. B) Als Ladekontrolle wurde ein Total Protein Stain (TPS) durchgeführt. C) Quantitative Auswertung des GLUT1. Alle Daten sind als MW \pm SD abgebildet, n=6. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$. Alle Werte wurden auf das TPS normiert.

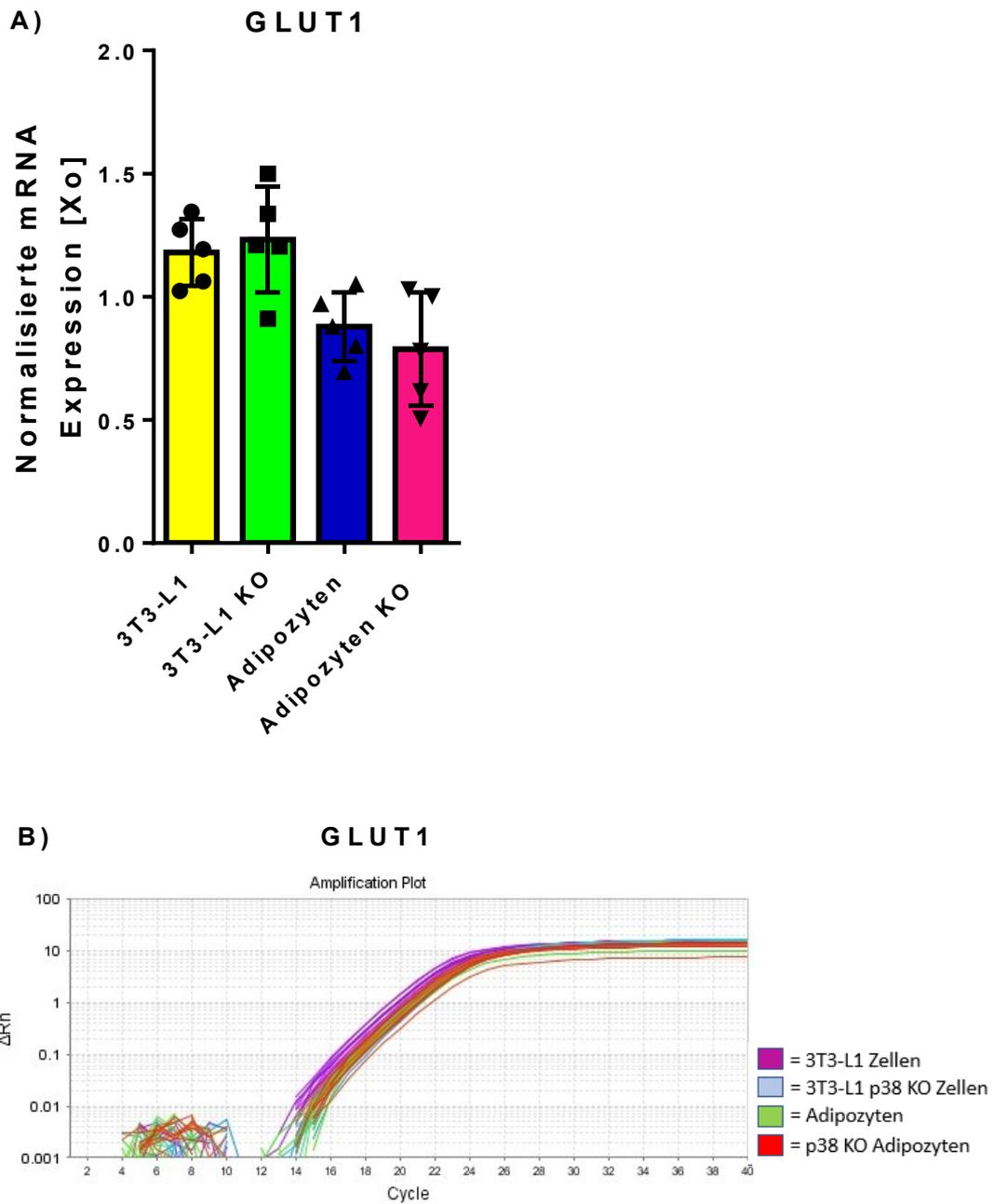
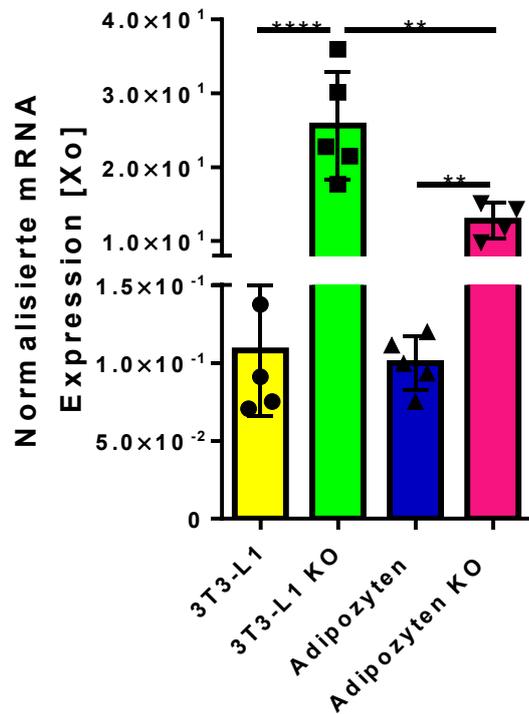


Abb. 22: Analyse der mRNA Menge von GLUT1 in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der GLUT1 Expression in allen Zelllinien. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Expression von GLUT1 im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. B) Amplifikationskurve von GLUT1. Die Amplifikationskurven der verschiedenen Zelllinien verlaufen nahezu deckungsgleich. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, $p > 0,05$.

3.4 Vermehrte IGF-1-Rezeptor Expression in Abwesenheit der p38MAPK α

Um einen Einfluss der Abwesenheit der p38MAPK α auf die Expression des IGF-1-Rezeptors nachweisen zu können, wurden mRNA Analysen von 3T3-L1 Zellen und Adipozyten in An- und Abwesenheit der p38MAPK α durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Expression des IGF-1-Rezeptors in den 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen im Vergleich zu den 3T3-L1 Zellen (MW \pm SD [X0], 3T3-L1 Zellen: $0,11 \pm 0,04$, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: $25,6 \pm 7,3$). Ebenso zeigte sich eine vermehrte Expression des IGF-1-Rezeptors in den p38MAPK α KO-Adipozyten im Vergleich zu den Adipozyten. (MW \pm SD [X0], Adipozyten: $0,1 \pm 0,02$, p38MAPK α KO-Adipozyten: $10,6 \pm 5,1$). Zwischen den 3T3-L1 Zellen und Adipozyten zeigte sich kein Unterschied in der Expression des IGF-1-Rezeptors. Diese Unterschiede sind auch in der Amplifikationskurve der verschiedenen Zelllinien gut abzugrenzen.

A) IGF- 1 Rezeptor



B) IGF- 1 Rezeptor

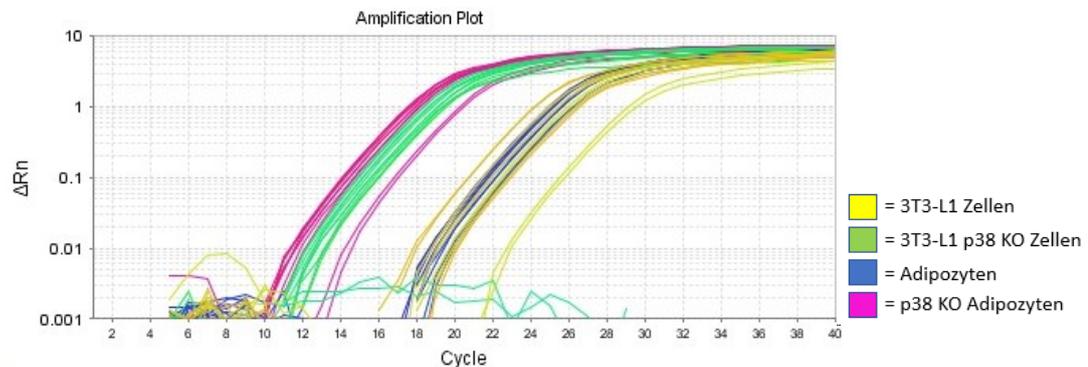
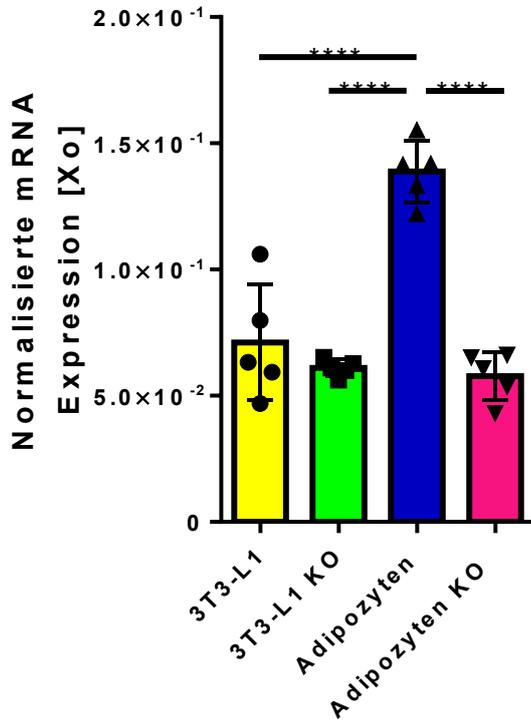


Abb. 23: Analyse der mRNA Menge des IGF-1-Rezeptors in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der IGF-1-Rezeptor Expression in allen Zelllinien. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression des IGF-1-Rezeptors in den 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen und p38MAPK α KO-Adipozyten im Vergleich zu den WT Zelllinien. Auch zwischen den 3T3-L1 p38MAPK α KO und p38MAPK α KO-Adipozyten zeigt sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression des IGF1-Rezeptors. B) Amplifikationskurve des IGF-1-Rezeptors. Die Amplifikationskurven der 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen und p38MAPK α KO-Adipozyten grenzen sich deutlich von denen der 3T3-L1 Zellen und Adipozyten ab. Alle Daten sind als MW \pm SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Varianz, Anova*) durchgeführt, **=p<0,01, ****=p<0,0001.

3.5 Verminderte Expression des Insulinrezeptors in p38MAPK α KO-Zellen

Um einen Einfluss der Abwesenheit der p38MAPK α auf die Expression des Insulinrezeptors nachweisen zu können wurden mRNA Analysen von 3T3-L1 Zellen und Adipozyten in An- und Abwesenheit der p38MAPK α durchgeführt. Dabei zeigte sich eine zweifach höhere Expression des Insulinrezeptors in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien (MW \pm SD [X0], 3T3-L1 Zellen: $0,07 \pm 0,02$, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen: $0,06 \pm 0,003$, Adipozyten: $0,14 \pm 0,01$, p38MAPK α KO-Adipozyten: $0,06 \pm 0,01$). Diese Unterschiede sind auch in der in derselben Abbildung dargestellten Amplifikationskurve dargestellt.

A) Insulin Rezeptor



B) Insulin Rezeptor

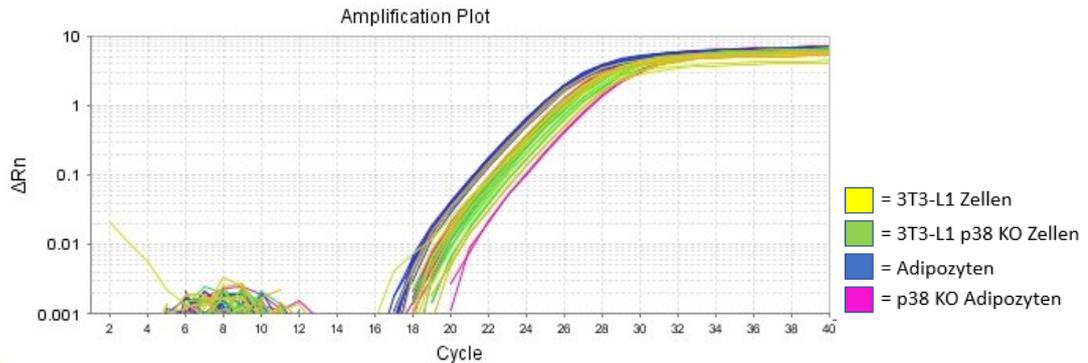


Abb. 24: Analyse der mRNA Menge des Insulinrezeptors in 3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPKα KO-Zellen, Adipozyten und p38MAPKα KO-Adipozyten. A) Graphische Darstellung der Insulinrezeptor Expression in allen Zelllinien. Es zeigt sich eine signifikant höhere Expression des Insulinrezeptors in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. B) Amplifikationskurve des Insulinrezeptors. Die Amplifikationskurve der Adipozyten grenzt sich von diesen der restlichen Zelllinien schon in einem frühen Zyklus der Replikation ab. Alle Daten sind als MW±SD, n=4-5 dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (engl.: *Analysis of Variance, Anova*) durchgeführt, ****= $p < 0,0001$

4 Diskussion

Die p38MAPK α ist eine zentrale Kinase im Fettgewebe mit einem bedeutsamen Einfluss auf den Metabolismus, Wachstum, Differenzierung und Zelltod (New and Han 1998, Ono and Han 2000). Dabei wird der Einfluss der p38MAPK α auf den adipogenen Differenzierungsprozess kontrovers diskutiert. Sowohl ein inhibierender als auch fördernder Einfluss der p38MAPK α auf die adipogene Differenzierung wurde bisher beschrieben (Aouadi, Laurent et al. 2006, Aouadi, Jager et al. 2007, Deng, Chen et al. 2020, Park, Park et al. 2021).

Zur Analyse der Funktionen der p38MAPK α wurde diese bisher durch verschiedene Inhibitoren gehemmt. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Isoform-spezifische Inaktivierung der p38MAPK α in 3T3-L1 Präadipozyten mittels der CRISPR/Cas Methode durchgeführt. Anhand der hergestellten KO-Zellen konnte so der Differenzierungsprozess der 3T3-L1 Präadipozyten in Adipozyten in Abwesenheit der p38MAPK α beobachtet werden.

Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst

- Die lentivirale Infektion von 3T3-L1 Präadipozyten mit einem für die p38MAPK α spezifischen Cas9/gRNA Konstrukt führt zu einem ca. 90% p38MAPK α Knock-out
- Die adipogene in vitro Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten ist in Abwesenheit der p38MAPK α vermindert
- In Adipozyten ist die Expression von PPAR- γ und PPARGC1 α unter Abwesenheit der p38MAPK α reduziert
- In Adipozyten und in Abwesenheit der p38MAPK α ist die Expression des GLUT4 Transportes nicht jedoch diese des GLUT1 Transporters vermindert.
- Die Expression von UCP1 und UCP3 ist in Abwesenheit der p38MAPK α in Adipozyten vermindert.
- Die Expression von UCP2 wird in Adipozyten nicht von der p38MAPK α reguliert
- Die p38MAPK α ist für die Expression des Insulinrezeptors in Adipozyten essenziell. In 3T3-L1 Zellen wird die Expression des Insulinrezeptors nicht über die p38MAPK α reguliert.
- In Abwesenheit der p38MAPK α ist die Expression des IGF-1-Rezeptors in 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten verstärkt.

4.1 Erfolgreicher p38MAPK α KO mittels CRISPR/Cas Methode in 3T3-L1 Präadipozyten

Obwohl Engelmann et al. bereits 1998 gezeigt haben, dass die p38MAPK α an der adipogenen Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten beteiligt ist, ist der genaue Mechanismus, über welchen die p38MAPK α die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen reguliert, weitgehend unbekannt (Engelman, Lisanti et al. 1998, Park, Park et al. 2021). Ein möglicher Grund hierfür ist die Schwierigkeit einer suffizienten und spezifischen Hemmung der Funktion der p38MAPK α mittels pharmakologischer Inhibitoren. In dieser Arbeit wurde erstmalig mittels der CRISPR/Cas Methode die Expression einer funktionsfähigen p38MAPK α in 3T3-L1 Zellen nahezu vollständig unterbunden. Dazu wurde in 3T3-L1 Zellen nach lentiviraler Transfektion das Cas9 Gen und eine sgRNA exprimiert, welche spezifisch für die p38MAPK α ist. Der Vektor, welcher zur Herstellung der p38MAPK α KO-Zellen verwendet wurde, besaß zusätzlich zu den notwendigen Konstrukten (sgRNA, Cas-9) einen Selektionsmarker für Puromycin und Ampicillin. Hiermit konnten durch die anschließende Behandlung mittels Puromycin infizierte Zellen selektioniert und anschließend weiter kultiviert werden. Somit konnte ein p38MAPK α KO von ca. 90% erzielt werden. Eine Klonierung einzelner infizierter Zellen, in welchen der KO der p38MAPK α mittels PCR Analysen bestätigt wurde, war somit nicht notwendig. Mögliche Ursachen für die minimale Restexpression der p38MAPK α könnten a) eine Puromycin Resistenz einzelner nicht infizierter Zellen oder b) eine nicht vollständige/keine Verschiebung des Leserasters sein. Prinzip der CRISPR/Cas Methode ist die Induktion eines Doppelstrangbruches und dadurch Veränderung des Leserasters. Nachdem ein Doppelstrangbruch erzeugt wurde, versucht die Zelle entweder über nicht homologe Endverknüpfung (*engl. Non-homologous end joining, NHEJ*) oder durch homolog gerichtete Reparaturmechanismen (*engl. homology-directed repair, HDR*) den Schaden zu beheben (Ma, Zhang et al. 2014). Dadurch ist es möglich, dass ein funktionsfähiges Protein hergestellt wird. In den meisten Fällen allerdings führt dieser Versuch durch Insertion oder Deletion von Basenpaaren zu Mutationen des ursprünglichen Gens und somit zu keinem funktionsfähigen Protein. Werden nur wenige Basenpaare verändert und damit die Anzahl der zur translatierenden Tripletten nur gering verändert, kann ein Protein hergestellt werden, welches sich im

Western Blot aufgrund seiner Größe nicht von der p38MAPK α unterscheidet, gebildet werden.

In bisherigen Studien wurde die Funktion der p38MAPK α durch verschiedene Pyridinylimidazol-Verbindungen unterbunden (z.B. SB203580, SB202190, PD169316). Diese Verbindungen hemmen die katalytische Aktivität der p38MAPK α , indem sie die ATP-Bindungsstelle blockieren. Dabei bleibt die Phosphorylierung der p38MAPK α über vorgeschaltete Kinasen im Fall des SB203580 Inhibitors intakt (Kumar, Jiang et al. 1999). Im Gegensatz zum SB203580 Inhibitor zeigten die SB202190 und PD169316 Inhibitoren einen vermutlich hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung der p38MAPK α (Kumar, Jiang et al. 1999, Geiger, Wright et al. 2005, Aouadi, Jager et al. 2007). Diese Methode der Inhibierung der p38MAPK α bietet zwar auf der einen Seite den Vorteil einer schnellen Hemmung der Funktion der p38MAPK α , auf der anderen Seite sind diese Inhibitoren selten spezifisch für die p38MAPK α , sodass häufig eine parallele Hemmung der p38MAPK β erfolgt (Newton and Holden 2003). Außerdem ist der Einfluss dieser Inhibitoren auf weitere Signalwege der Zelle nicht ausreichend erforscht. Zudem führen diese Inhibitoren zu keiner genetischen Modifizierung der Kinase. Die Inhibition führt lediglich zu einer verminderten Phosphorylierung oder Inaktivierung der katalytischen Funktion der Kinase. Dabei wird die Funktion der p38MAPK α nicht vollständig unterbunden. Mittels der CRISPR/Cas Methode erfolgt eine Modifizierung auf Genebene, welche durch eine komplette Veränderung des Leserasters die Expression der p38MAPK α unterbindet. Somit ist die CRISPR/Cas Methode der Inhibierung verschiedener Proteine über chemische Verbindungen überlegen.

4.2 In Abwesenheit der p38MAPK α zeigte sich eine verminderte adipogene Differenzierung

Im Prozess der Differenzierung eines Präadipozyten in einen reifen Adipozyten (Adipogenese) wird der Einfluss der p38MAPK α auf den Differenzierungsprozess kontrovers diskutiert. In dieser Arbeit konnte mittels der Ölrot-O-Färbung sowie mRNA Analysen verschiedener Adipozytenmarker eine verminderte Differenzierung der 3T3-L1 Zellen in Adipozyten unter der Abwesenheit der p38MAPK α beobachtet werden.

Die Ölrot-O-Methode nutzt den Farbstoff Sudan rot, der eine hohe Lipidlöslichkeit aufweist, weshalb er sich gut für die Darstellung von Lipiden eignet. In dieser Arbeit wurden Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten am Tag ihres höchsten Differenzierungsgrades (Tag 10) mittels der Ölrot-O-Färbung gefärbt. Dabei zeigte sich eine verminderte Färbung und somit Differenzierung der p38MAPK α KO-Adipozyten. Um die Bedeutung der p38MAPK α für den adipogenen Differenzierungsprozess in vitro zu bestätigen, wurde die Expression verschiedener Adipozytenmarker mittels mRNA Analysen untersucht.

Als Adipozytenmarker werden v.a. Proteine, welche fast ausschließlich von Adipozyten exprimiert werden, bezeichnet. Dazu gehören u.a. die Hormone Leptin und Adiponektin (MacDougald, Hwang et al. 1995, Fu, Luo et al. 2005, Aouadi, Jager et al. 2007). In dieser Arbeit zeigte sich eine verminderte Expression sowohl von Leptin als auch Adiponektin, was neben der verringerten Lipideinlagerung auf eine verminderte Differenzierung der 3T3-L1 Zellen in Adipozyten unter der Abwesenheit der p38MAPK α hinweist. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte eine in vitro durchgeführte Studie von Aouadi et al. (Aouadi, Jager et al. 2007). Dort wurde gezeigt das humane Präadipozyten, in welchen die p38MAPK α mittels PD169316 und SB203580 gehemmt wurden, eine verminderte adipogene Differenzierung aufwiesen. Ebenso zeigten 3T3-L1 Zellen, in welchen eine Hemmung der p38MAPK α über die SB203580- und SB202190 erfolgte, eine verminderte adipogene Differenzierung (Engelman, Lisanti et al. 1998). Interessanterweise konnte die adipogene Differenzierung der 3T3-L1 Zellen nur zu Beginn des Differenzierungsprozesses durch SB203580 und SB202190 inhibiert werden. Dafür wurde vermutet, dass eine vermehrte Aktivität der p38MAPK α in den frühen Phasen der Differenzierung essenziell ist. 3T3-L1 Zellen, in welchen die für die Aktivierung der p38MAPK α charakteristischen Phosphorylierungsstellen des Threonin-Glycin-Tyrosin (TGY) Motiv mutiert wurde, zeigten in keiner Phase der Differenzierung Anzeichen einer Fetttropfenbildung (Engelman, Lisanti et al. 1998). Kontroverserweise konnte in anderen Studien eine verstärkte adipogene Differenzierung unter der Abwesenheit der p38MAPK α nachgewiesen werden. So zeigten Aouadi et al. eine vermehrte adipogene Differenzierung von Präadipozyten und embryonalen Stammzellen aus Mäusen in welchen die p38MAPK α mittels des spezifischen PD169316 Inhibitors gehemmt wurde. Embryonale Stammzellen in welchen das Gen MAPK14, welches für die p38MAPK α kodiert, ausgeschaltet wurde, zeigten ebenfalls

eine verstärkte adipogene Differenzierung im Vergleich zu den WT-Zellen (Aouadi, Laurent et al. 2006). Eine weitere Gruppe welche den Effekt von Mark4 auf die Adipogenese erforschte, fand heraus, dass Mark4 über die Hemmung der p38MAPK zu einer verstärkten Adipogenese führt (Feng, Tian et al. 2014). Die zum Teil kontroversen Ergebnisse vorheriger Studien sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Prozess der Adipogenese in verschiedenen Spezies durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. Zudem scheint der Zeitpunkt der Inhibierung der p38MAPK α eine mögliche Ursache der Heterogenität der Ergebnisse zu sein.

4.2.1 Die Expression von Perilipin 5 wird von der p38MAPK α reguliert.

Fetttröpfchen von reife Fettzellen werden von einer Gruppe sog. Hüllproteine (Perilipin) umhüllt. Es gibt insgesamt fünf Proteine, welche dieser Gruppe zugehörig sind. Davon wird Perilipin 2 in fast jedem Gewebe exprimiert, Perilipin 5 dagegen eher in Gewebe mit hohem Fettgehalt. Nicht viel ist bekannt über die Funktion der Perilipin Proteine während des adipogenen Differenzierungsprozesses und des Einflusses der p38MAPK α auf die verschiedenen Perilipin Isoformen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Perilipin 2 in 3T3-L1 Zellen und Adipozyten nicht von der p38MAPK α abhängig ist, da sich zwischen den WT und KO-Zellen kein Unterschied auf mRNA Ebene zeigte. Während die Expression von Perilipin 2 nicht von der p38MAPK α abhängig ist, zeigte sich hier eine verminderte Expression von Perilipin 5 in Adipozyten in Abwesenheit der p38MAPK α . So kann postuliert werden, dass die p38MAPK α essenziell für die Expression von Perilipin 5 nicht jedoch von Perilipin 2 in Adipozyten ist. Der Einfluss der p38MAPK α auf die verschiedenen Untergruppen der Perilipin Protein zeigte sich somit differenziert.

4.3 Die p38MAPK α reguliert die Expression von PPAR- γ in Adipozyten

Wie schon in Abschnitt 1.2.1 beschrieben ist der Transkriptionsfaktor PPAR- γ unerlässlich für die adipogene Differenzierung von Präadipozyten (Tontonoz, Hu et al. 1994). Dazu interagiert PPAR- γ mit dem Transkriptions-Coactivator PGC1 α . PGC1 α wird von dem PPARGC1 α Gen kodiert und bildet mit PPAR- γ ein Komplex, sodass eine Translokation beider Proteine in den Zellkern ermöglicht wird. Dort regulieren

PPAR- γ und PGC1 α die Transkription verschiedener Gene, u.a. die Transkription von C/EBP α (Rosen and Spiegelman 2000), einen wichtigen Regulator der Adipogenese (Darlington, Ross et al. 1998).

In dieser Arbeit konnte sowohl eine reduzierte Expression des PPARGC1 α Gens als auch von PPAR- γ in den p38MAPK α KO-Adipozyten im Vergleich zu den Adipozyten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung konnte in einer Studie von Aouadi et al. Bestätigt werden. In dieser konnte eine verminderte Expression von PPAR- γ durch Inhibierung der p38MAPK α in humanen Präadipozyten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich zusätzlich eine verminderte adipogene Differenzierung (Aouadi, Jager et al. 2007). Eine 2006 durchgeführte Arbeit aus derselben Arbeitsgruppe zeigte in aus Mäusen isolierten Präadipozyten und Stammzellen ein konträres Ergebnis. Hier zeigte sich unter Hemmung der p38MAPK α eine vermehrte Expression von PPAR- γ . Ebenso zeigte sich eine vermehrte adipogene Differenzierung (Aouadi, Laurent et al. 2006).

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und weiterer Studien geht hervor das PPAR- γ für den adipogenen Differenzierungsprozess essenziell ist. Dabei wird die Expression von PPAR- γ in 3T3-L1 Zellen über die p38MAPK α reguliert. Je nach Zelltyp können allerdings weitere Regulatoren die Expression von PPAR- γ beeinflussen. Dies würde die Kontroversität in den Ergebnissen erklären.

4.3.1 Verminderte Expression von FABP4 bei Abwesenheit der p38MAPK α

Ein wichtigen Marker der Adipogenese stellt das Protein FABP4, auch als aP2 bekannt dar. Dabei handelt es sich um ein zytoplasmatisches Fettsäure Chaperon, welches hauptsächlich in Adipozyten und myeloiden Zellen exprimiert wird. In Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor PPAR- γ stellt FABP4 nicht nur ein Marker der Adipogenese dar, sondern reguliert vermutlich zusätzlich den Prozess der Adipogenese (Garin-Shkolnik, Rudich et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde eine reduzierte Expression von FABP4 in p38MAPK α KO-Adipozyten beobachtet. Eine Interaktion von FABP4 und PPAR- γ wurde bereits beschrieben. Dabei ist sowohl eine Aktivierung von FABP4 über PPAR- γ wie Lamas Bervejillo et al in humanen Monozyten und Makrophagen zeigen konnten (Lamas

Bervejillo, Bonanata et al. 2020) als auch wie von Garin-Shkolnik et al. In Präadipozyten und Makrophagen der Maus nachgewiesen, Regulation der Aktivierung von PPAR- γ über FABP4 möglich (Garin-Shkolnik, Rudich et al. 2014). In letzterer zeigte sich in Abwesenheit von FABP4 eine vermehrte Expression von PPAR- γ und somit verstärkte Adipogenese, sodass die Annahme, dass FABP4 die Adipogenese durch Inhibition der Expression von PPAR- γ reguliert, möglich ist. In dieser Arbeit zeigte sich unter der Abwesenheit der p38MAPK α sowohl eine verminderte Expression von FABP4 als auch von PPAR γ . Dabei ist eine mögliche Interaktion zwischen den Proteinen nicht auszuschließen.

4.4 Die Abwesenheit der p38MAPK α ist mit einer reduzierten Expression des GLUT4 in Adipozyten assoziiert

Damit Adipozyten Ihre Funktion der Energiespeicherung und - bereitstellung aufrechterhalten können, müssen diese mit Energie versorgt werden. Eine Hauptquelle der Energieversorgung von Adipozyten stellt Glukose dar (Shepherd and Kahn 1999). Glukose wird von Adipozyten hauptsächlich über die Transporter GLUT1 und GLUT4 aufgenommen (Kilgour, Baldwin et al. 1995, Wirth and Hauner 2013). Dabei wird durch GLUT1 die basale und durch GLUT4 die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme gewährleistet (Bryant, Govers et al. 2002, Deng, Xu et al. 2014). Nach Glukoseaufnahme wird diese entweder zur Glykogenspeicherung oder Glykolyse und damit ATP Synthese genutzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 3T3-L1 Zellen nur eine geringe GLUT4 Expression aufweisen. Zu Adipozyten differenzierte 3T3-L1 Zellen verfügen dagegen über eine wesentlich höhere GLUT4 Expression. Nach Deletion des MAPK14 Gens war sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine verminderte GLUT4 Transkript- und Proteinmenge in den Adipozyten nachweisbar. Es ist bekannt, dass die Expression des GLUT4 Transporters über PPAR- γ reguliert wird (Wu, Xie et al. 1998, El-Jack, Hamm et al. 1999). Da in dieser Arbeit auch eine verminderte Expression von PPAR- γ in p38MAPK α KO-Adipozyten nachgewiesen werden konnte, ist ein Einfluss der p38MAPK α auf die Expression des GLUT4 über die transkriptionelle Kontrolle von PPAR- γ nicht auszuschließen. Experimente, welche im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls eine geringere absolute Menge von GLUT4 in Herzen mit Kardiomyozyten-spezifischer

Deletion der p38MAPK α im Vergleich zu den WT Mäuseherzen. Eine in vitro Studie mit primären Kardiomyozyten lässt zusätzlich auf eine aktivierende Rolle der p38MAPK α bezüglich der GLUT4 Expression schließen (Montessuit, Rosenblatt-Velin et al. 2004).

Im Gegensatz zum GLUT4 zeigte sich mittels mRNA Analysen kein Einfluss der p38MAPK α auf die Transkription des GLUT1 Gens. Interessanterweise wurde auf Proteinebene eine signifikant höhere GLUT1 Menge in 3T3-L1 Zellen im Vergleich zu den 3T3-L1 p38MAPK α KO- Zellen sowie Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten nachgewiesen. Zwischen Adipozyten und p38MAPK α KO-Adipozyten konnte auf Proteinebene kein Unterschied bezüglich der GLUT1 Menge verzeichnet werden. So könnte die p38MAPK α einen positiven translatorischen Effekt bezüglich des GLUT1 in 3T3-L1 Zellen haben. Da allerdings auf mRNA Ebene kein Unterschied gezeigt werden konnte, ist eine transkriptionelle Kontrolle des GLUT1 in 3T3-L1 Zellen über weitere Faktoren möglich. Während sich in dieser Arbeit kein Einfluss der p38MAPK α auf das GLUT1 Gen zeigte, haben Fujishiro et al. in Adipozyten, in welchen die MKK3/MKK6 konstant aktiv waren eine erhöhte Expression des GLUT1 Transporters in Adipozyten nachweisen können (Fujishiro, Gotoh et al. 2001). Ein regulatorischer Mechanismus der p38MAPK α konnte zudem nicht nur in Adipozyten und 3T3-L1 Zellen nachgewiesen werden. Somit konnte in Blastozysten eine geringere Expression von GLUT1 unter Hemmung der p38MAPK α nachgewiesen werden. (Sozen, Ozturk et al. 2015). Barros, Young et al. konnten zudem nachweisen, dass die p38MAPK α nicht nur die Transkription des GLUT1 Gens reguliert, sondern vermutlich auch für die Aktivierung von GLUT1 verantwortlich ist (Barros, Young et al. 1997). Zusammenfassend ist ohne p38MAPK α die Expression des GLUT4 Transporters in 3T3-L1 Adipozyten eingeschränkt, nicht jedoch jene des GLUT1 Transporters. Dabei wird die Aktivierung beider Glukose-Transporter möglicherweise durch die p38MAPK α kontrolliert.

4.5 Der Einfluss der p38MAPK α auf verschiedene Entkopplungsproteine

Braunes Fettgewebe findet sich im Menschlichen Körper vorwiegend während der embryonalen und neonatalen Entwicklung, ist aber auch in geringeren Mengen im

Adulten vorhanden. Dabei dient es der Thermogenese. Die Fähigkeit des BAT zur zitterfreien Wärmebildung wird über UCP1 vermittelt. Dabei wird der durch die Atmungskette generierte Protonenfluss durch UCP1 umgeleitet und die durch Substratoxidation gewonnene Energie in Wärme umgewandelt. Es wird vermutet, dass die Expression von UCP1 über die Aktivierung des cAMP/PKA-(engl. cyclic Adenosine Monophosphat/ Protein Kinase A) Signalweges reguliert wird (Cao, Medvedev et al. 2001). Zu den nachgeschalteten Zielen dieser Kaskade zählt u.a. auch die p38MAPK α . In dieser Arbeit wurde eine verminderte Expression von UCP1 unter der Abwesenheit der p38MAPK α in 3T3-L1 Zellen und Adipozyten beobachtet. In vorherigen Studie konnte die p38MAPK α bereits als essenziell für die Expression von UCP1 identifiziert werden (Cao, Medvedev et al. 2001, Robidoux, Cao et al. 2005).

Bezüglich der Expression von UCP3 ist nur wenig bekannt. Er wird hauptsächlich in Muskelzellen sowie im braunen Fettgewebe exprimiert (Vidal-Puig, Solanes et al. 1997). Eine Expression von UCP3 im weißen Fettgewebe konnte bisher nicht nachgewiesen werden. UCP3 ist im braunen Fettgewebe in geringeren Mengen als UCP1 nachzuweisen und ist vermutlich nicht für die Wärmebildung verantwortlich (Hilse, Kalinovich et al. 2016). Viel eher scheint er eine wesentliche Rolle im Glukosemetabolismus zu besitzen. (Huppertz, Fischer et al. 2001). Außerdem scheint UCP3 für den Transport von Fettsäureanionen aus den Mitochondrien in das Zytosol verantwortlich zu sein (Himms-Hagen and Harper 2001). Dabei wird seine Expression über verschiedene Stimuli und Mediatoren reguliert (z.B AMPK, Hypoxie, adrenerge Stimulation) (Zhou, Lin et al. 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass UCP3 in Adipozyten, nicht jedoch in 3T3-L1 Zellen exprimiert wird. Dabei wird die Expression von UCP3 während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Adipozyten vermutlich über die p38MAPK α reguliert, da sich eine signifikant höhere Expression von UCP3 in Adipozyten im Vergleich zu den p38MAPK α KO-Adipozyten zeigte.

Ein weiteres Mitglied der *engl. uncoupling Protein* Gruppe ist UCP2. UCP2 wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Dabei spielt er eine Rolle in der Tumorgenese, der Begrenzung der ROS- und Makrophagen vermittelten Immunität, sowie der Differenzierung pluripotenter Stammzellen (Arsenijevic, Onuma et al. 2000, Saleh, Wheeler et al. 2002, Zhang, Khvorostov et al. 2011, Aguilar, Esteves et al. 2019). Während die Transkription von UCP1 und UCP3 in Adipozyten über die p38MAPK α reguliert wird, konnte in dieser Arbeit kein Einfluss der p38MAPK α auf die Expression

von UCP2 in 3T3-L1 Zellen und Adipozyten nachgewiesen werden. In Makrophagen dagegen konnte eine vermehrte Expression von UCP2 in Anwesenheit des SB212090 MAPK Inhibitors beobachtet und somit eine Suppression der Expression von UCP2 über die p38MAPK α vermutet werden. In Makrophagen von murinen Knochenmark zeigte sich nach Aktivierung des JNK und p38MAPK Signalweges mittels LPS eine verminderte Expression von UCP2 (Emre, Hurtaud et al. 2007). Ähnlich führte eine durch Taxol induzierte Aktivierung der JNK und p38MAPK Signalwege zu einer reduzierten UCP2 Expression in Melanom-Zellen. Nach Inhibierung beider Signalwege mittels SP600125 und SB203580 wurde die Taxol-induzierte Herunterregulierung der UCP2 Expression blockiert (Selimovic, Hassan et al. 2008). Eine dagegen stimulierende Wirkung der p38MAPK α auf die UCP2 Expression wurde in Glioblastomzellen nachgewiesen (Wu, Luo et al. 2020). Somit lässt sich vermuten, dass der Einfluss der p38MAPK α auf die Expression von UCP2 gewebespezifisch ist.

Zusammenfassend ist die Anwesenheit der p38MAPK α notwendig für die Expression von UCP1 und UCP3 in Adipozyten. Die Expression von UCP2 dagegen wird in 3T3-L1 Zellen und Adipozyten nicht über die p38MAPK α reguliert.

4.6 Regulation des IGF-1- und Insulinrezeptors über die p38MAPK α

Die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen wird über verschiedene Faktoren reguliert. Dabei wurde Insulin in früheren Studien als Induktor der Präadipozytendifferenzierung beschrieben. (Hauner, Entenmann et al. 1989, Fischer-Posovszky and Wabitsch 2004, Cignarelli, Genchi et al. 2019). Auch, wenn Insulin eine 100-fach höhere Bindungsaffinität für den Insulinrezeptor im Vergleich zum IGF-1-Rezeptor aufweist, wird vermutet, dass Insulin seine adipogene Wirkung insbesondere über den IGF-1-Rezeptor entfaltet (Xu and Liao 2004). Der Insulinrezeptor scheint dagegen essenziell für die Determinierung der Adipogenese in Stammzellen zu sein (Gupta, De Jesus et al. 2018). Dies würde die höhere Menge an IGF-1-Rezeptor in 3T3-L1 Zellen im Vergleich zum Insulinrezeptor erklären (Smith, Wise et al. 1988). Während der adipogenen Differenzierung nimmt die Anzahl der Insulinrezeptoren zu, die Menge an IGF-1-Rezeptor bleibt dagegen gleich (Reed and Lane 1980, Back and Arnqvist 2009). Der genaue Mechanismus allerdings, über welchen der IGF-1-Rezeptor seine Wirkung auf

den adipogenen Differenzierungsprozess ausübt, ist noch nicht vollständig erforscht. Bisher sind zwei Signalwege bekannt, welche über den IGF-1-Rezeptor aktiviert werden und somit in der Vermittlung der adipogenen Differenzierung über den IGF-1-Rezeptor involviert sein könnten: Der PKB/Akt Signalweg sowie der p38MAPK α Signalweg (Xu and Liao 2004). Dabei besteht ein möglicher indirekter Zusammenhang der p38MAPK α und des IGF-1-Rezeptors. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied der Expression des IGF-1-Rezeptors zwischen den 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich allerdings eine signifikant höhere Expression des IGF-1-Rezeptors in den 3T3-L1 p38MAPK α KO-Präadipozyten im Vergleich zu den WT 3T3-L1-Präadipozyten. Auch in den p38MAPK α KO-Adipozyten zeigte sich eine bemerkenswert höhere Expression des IGF-1-Rezeptors im Vergleich zu den WT Adipozyten. Daraus lässt sich eine mögliche hemmende Wirkung der p38MAPK α auf die Expression des IGF-1-Rezeptors in 3T3-L1 Präadipozyten und Adipozyten vermuten. Interessant ist auch, dass die Expression des IGF-1-Rezeptors in den p38MAPK α KO-Adipozyten signifikant niedriger war als diese in den 3T3-L1 p38MAPK-Präadipozyten. Dieser Unterschied macht eine Regulation der Expression des IGF-1-Rezeptors über mehrere Signaltransduktionswege möglich. Im Umkehrschluss könnte anhand dieser Daten eine hemmende Wirkung der p38MAPK α auf die Expression des IGF-1-Rezeptors in 3T3-L1 Zellen und Adipozyten postuliert werden.

Im Gegensatz zum IGF-1-Rezeptor zeigte sich in Abwesenheit der p38MAPK α eine reduzierte Expression des Insulin-Rezeptors in Adipozyten. Außerdem wurde eine höhere Expression des Insulinrezeptors in den Adipozyten im Vergleich zu den restlichen Zelllinien (3T3-L1 Zellen, 3T3-L1 p38MAPK α KO-Zellen und p38MAPK α KO-Adipozyten) nachgewiesen. Somit konnte einerseits gezeigt werden, dass die Expression des Insulinrezeptors während der adipogenen Differenzierung zunimmt und andererseits, dass für die weitere Zunahme der Expression des Insulinrezeptors während des adipogenen Differenzierungsprozesses die Anwesenheit der p38MAPK α notwendig ist.

5 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend stellt die CRISPR/Cas Methode eine erfolgreiche Strategie zur Analyse der p38MAPK α -abhängigen Signaltransduktionen in Adipozyten dar. Die Daten ermöglichen somit ein besseres Verständnis der Funktion der p38MAPK α am Prozess der in vitro adipogenen Differenzierung und geben Hinweise auf Effekte der p38MAPK α auf zelluläre Zielstrukturen verschiedener Signalwege, deren pathophysiologische Konsequenzen in zukünftigen funktionellen Analysen weiter untersucht werden müssen. Die bisher generierten Daten deuten darauf hin, dass die p38MAPK α eine wichtige Rolle in der Adipogenese einnimmt und somit möglicherweise für die Entstehung von Adipositas mitverantwortlich ist. Der fördernde Effekt der p38MAPK α auf die Insulinrezeptor-Expression könnte darüber hinaus auf eine Rolle der p38MAPK α in der Pathogenese von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes Mellitus hindeuten.

6 Literatur und Quellenverzeichnis

Adamczak, M. and A. Wiecek (2013). "The adipose tissue as an endocrine organ." Semin Nephrol **33**(1): 2-13.

Aguilar, E., P. Esteves, T. Sancerni, V. Lenoir, T. Aparicio, F. Bouillaud, R. Dentin, C. Prip-Buus, D. Ricquier, C. Pecqueur, S. Guilmeau and M. C. Alves-Guerra (2019). "UCP2 Deficiency Increases Colon Tumorigenesis by Promoting Lipid Synthesis and Depleting NADPH for Antioxidant Defenses." Cell Rep **28**(9): 2306-2316 e2305.

Aouadi, M., J. Jager, K. Laurent, T. Gonzalez, M. Cormont, B. Binetruy, Y. Le Marchand-Brustel, J. F. Tanti and F. Bost (2007). "p38MAP Kinase activity is required for human primary adipocyte differentiation." FEBS Lett **581**(29): 5591-5596.

Aouadi, M., K. Laurent, M. Prot, Y. Le Marchand-Brustel, B. Binetruy and F. Bost (2006). "Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages." Diabetes **55**(2): 281-289.

Aprile, M., M. R. Ambrosio, V. D'Esposito, F. Beguinot, P. Formisano, V. Costa and A. Ciccodicola (2014). "PPARG in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms." PPAR Res **2014**: 537865.

Archuleta, T. L., A. M. Lemieux, V. Saengsirisuwan, M. K. Teachey, K. A. Lindborg, J. S. Kim and E. J. Henriksen (2009). "Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK." Free Radic Biol Med **47**(10): 1486-1493.

Arsenijevic, D., H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B. S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M. C. Alves-Guerra, M. Gubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins and D. Ricquier (2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production." Nat Genet **26**(4): 435-439.

Back, K. and H. J. Arnqvist (2009). "Changes in insulin and IGF-I receptor expression during differentiation of human preadipocytes." Growth Horm IGF Res **19**(2): 101-111.

Barros, L. F., M. Young, J. Saklatvala and S. A. Baldwin (1997). "Evidence of two mechanisms for the activation of the glucose transporter GLUT1 by anisomycin: p38(MAP kinase) activation and protein synthesis inhibition in mammalian cells." J Physiol **504** (Pt 3): 517-525.

Bashan, N., K. Dorfman, T. Tarnowski, I. Harman-Boehm, I. F. Liberty, M. Bluher, S. Ovadia, T. Maymon-Zilberstein, R. Potashnik, M. Stumvoll, E. Avinoach and A. Rudich (2007). "Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity." Endocrinology **148**(6): 2955-2962.

Blüher, M. (2008). "Rolle des Fettgewebes in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes." Diabetologie und Stoffwechsel **3**(04): 225-228.

Brand, M. D. and T. C. Esteves (2005). "Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3." Cell Metab **2**(2): 85-93.

Brasaemle, D. L., G. Dolios, L. Shapiro and R. Wang (2004). "Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **279**(45): 46835-46842.

Bryant, N. J., R. Govers and D. E. James (2002). "Regulated transport of the glucose transporter GLUT4." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(4): 267-277.

Cao, W., A. V. Medvedev, K. W. Daniel and S. Collins (2001). "beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase." J Biol Chem **276**(29): 27077-27082.

Cao, Z., R. M. Umek and S. L. McKnight (1991). "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells." Genes Dev **5**(9): 1538-1552.

Carel, K., J. L. Kummer, C. Schubert, W. Leitner, K. A. Heidenreich and B. Draznin (1996). "Insulin stimulates mitogen-activated protein kinase by a Ras-independent pathway in 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **271**(48): 30625-30630.

Carlson, C. J., S. Koterski, R. J. Sciotti, G. B. Pocard and C. M. Rondinone (2003). "Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression." Diabetes **52**(3): 634-641.

Chance, B. and G. R. Williams (1956). "The respiratory chain and oxidative phosphorylation." Adv Enzymol Relat Subj Biochem **17**: 65-134.

Chen, Y., R. Pan and A. Pfeifer (2016). "Fat tissues, the bright and the dark sides." Pflugers Arch **468**(11-12): 1803-1807.

Chylinski, K., A. Le Rhun and E. Charpentier (2013). "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems." RNA Biol **10**(5): 726-737.

Cignarelli, A., V. A. Genchi, S. Perrini, A. Natalicchio, L. Laviola and F. Giorgino (2019). "Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development." Int J Mol Sci **20**(3): 759.

Cinti, S. (2012). "The adipose organ at a glance." Dis Model Mech **5**(5): 588-594.

Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." Biochem J **429**(3): 403-417.

Cuenda, A., P. Cohen, V. BueeScherrer and M. Goedert (1997). "Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); Comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38)." Embo Journal **16**(2): 295-305.

Cypess, A. M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A. B. Goldfine, F. C. Kuo, E. L. Palmer, Y. H. Tseng, A. Doria, G. M. Kolodny and C. R. Kahn (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." N Engl J Med **360**(15): 1509-1517.

Darlington, G. J., S. E. Ross and O. A. MacDougald (1998). "The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation." J Biol Chem **273**(46): 30057-30060.

Deng, D., C. Xu, P. Sun, J. Wu, C. Yan, M. Hu and N. Yan (2014). "Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1." Nature **510**(7503): 121-125.

Deng, W., H. Chen, H. Su, X. Wu, Z. Xie, Y. Wu and H. Shen (2020). "IL6 Receptor Facilitates Adipogenesis Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells through Activating P38 Pathway." Int J Stem Cells **13**(1): 142-150.

Denise Martin, E., G. F. De Nicola and M. S. Marber (2012). "New therapeutic targets in cardiology: p38 alpha mitogen-activated protein kinase for ischemic heart disease." Circulation **126**(3): 357-368.

Diez, J. J. and P. Iglesias (2003). "The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease." Eur J Endocrinol **148**(3): 293-300.

DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller and M. P. Calos (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Molecular and Cellular Biology **7**(1): 379-387.

El-Jack, A. K., J. K. Hamm, P. F. Pilch and S. R. Farmer (1999). "Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha." J Biol Chem **274**(12): 7946-7951.

Emre, Y., C. Hurtaud, T. Nubel, F. Criscuolo, D. Ricquier and A. M. Cassard-Doulcier (2007). "Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages." Biochemical Journal **402**: 271-278.

Engelman, J. A., M. P. Lisanti and P. E. Scherer (1998). "Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis." J Biol Chem **273**(48): 32111-32120.

Esterbauer, H., H. Oberkofler, F. Krempler and W. Patsch (1999). "Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression." Genomics **62**(1): 98-102.

Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A. M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J. C. Fruchart, S. Deeb, A. Vidal-Puig, J. Flier, M. R. Briggs, B. Staels, H. Vidal and J. Auwerx (1997). "The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene." J Biol Chem **272**(30): 18779-18789.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7417.

Feng, M., L. Tian, L. Gan, Z. Liu and C. Sun (2014). "Mark4 promotes adipogenesis and triggers apoptosis in 3T3-L1 adipocytes by activating JNK1 and inhibiting p38MAPK pathways." Biol Cell **106**(9): 294-307.

Finck, B. N. and D. P. Kelly (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease." Circulation **115**(19): 2540-2548.

Fischer-Posovszky, P. and M. Wabitsch (2004). "Entwicklung und Funktion des Fettgewebes." Monatsschrift Kinderheilkunde **152**(8): 834-842.

Foltz, I. N., J. C. Lee, P. R. Young and J. W. Schrader (1997). "Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway." J Biol Chem **272**(6): 3296-3301.

Frontini, A. and S. Cinti (2010). "Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ." Cell Metab **11**(4): 253-256.

Fu, Y., N. Luo, R. L. Klein and W. T. Garvey (2005). "Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation." J Lipid Res **46**(7): 1369-1379.

Fujishiro, M., Y. Gotoh, H. Katagiri, H. Sakoda, T. Ogihara, M. Anai, Y. Onishi, H. Ono, M. Funaki, K. Inukai, Y. Fukushima, M. Kikuchi, Y. Oka and T. Asano (2001). "MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression." J Biol Chem **276**(23): 19800-19806.

Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." EMBO J **16**(8): 1921-1933.

Garin-Shkolnik, T., A. Rudich, G. S. Hotamisligil and M. Rubinstein (2014). "FABP4 attenuates PPARgamma and adipogenesis and is inversely correlated with PPARgamma in adipose tissues." Diabetes **63**(3): 900-911.

Geiger, P. C., D. C. Wright, D. H. Han and J. O. Holloszy (2005). "Activation of p38 MAP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin." Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(4): E782-788.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

Green, H. and O. Kehinde (1974). "Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid." Cell **1**(3): 113-116.

Green, H. and M. Meuth (1974). "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture." Cell **3**(2): 127-133.

Gregoire, F. M., C. M. Smas and H. S. Sul (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.

Group, M., K. Ichimura, K. Shinozaki, G. Tena, J. Sheen, Y. Henry, A. Champion, M. Kreis, S. Zhang, H. Hirt, C. Wilson, E. Heberle-Bors, B. E. Ellis, P. C. Morris, R. W. Innes, J. R. Ecker, D. Scheel, D. F. Klessig, Y. Machida, J. Mundy, Y. Ohashi and J. C. Walker (2002). "Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature." Trends in Plant Science **7**(7): 301-308.

Gulyaeva, O., J. Dempersmier and H. S. Sul (2019). "Genetic and epigenetic control of adipose development." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1864**(1): 3-12.

Gupta, M. K., D. F. De Jesus, S. Kahraman, I. A. Valdez, F. Shamsi, L. Yi, A. C. Swensen, Y. H. Tseng, W. J. Qian and R. N. Kulkarni (2018). "Insulin receptor-mediated signaling regulates pluripotency markers and lineage differentiation." Mol Metab **18**: 153-163.

Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs and R. J. Ulevitch (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." Science **265**(5173): 808-811.

Harman-Boehm, I., M. Bluher, H. Redel, N. Sion-Vardy, S. Ovadia, E. Avinoach, I. Shai, N. Kloting, M. Stumvoll, N. Bashan and A. Rudich (2007). "Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity." J Clin Endocrinol Metab **92**(6): 2240-2247.

Hauner, H., G. Entenmann, M. Wabitsch, D. Gaillard, G. Ailhaud, R. Negrel and E. F. Pfeiffer (1989). "Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium." J Clin Invest **84**(5): 1663-1670.

Haurwitz, R. E., M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou and J. A. Doudna (2010). "Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease." Science **329**(5997): 1355-1358.

Heidenreich, K. A. and J. L. Kummer (1996). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons." J Biol Chem **271**(17): 9891-9894.

Hilse, K. E., A. V. Kalinovich, A. Rupprecht, A. Smorodchenko, U. Zeitz, K. Staniek, R. G. Erben and E. E. Pohl (2016). "The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue." Biochim Biophys Acta **1857**(1): 72-78.

Himms-Hagen, J. and M. E. Harper (2001). "Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis." Exp Biol Med (Maywood) **226**(2): 78-84.

Hipskind, R. A. and G. Bilbe (1998). "MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts." Front Biosci **3**: d804-816.

Huppertz, C., B. M. Fischer, Y. B. Kim, K. Kotani, A. Vidal-Puig, L. J. Sliker, K. W. Sloop, B. B. Lowell and B. B. Kahn (2001). "Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism." J Biol Chem **276**(16): 12520-12529.

Jhun, B. H., A. L. Rampal, H. Liu, M. Lachal and C. Y. Jung (1992). "Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat adipocytes. Evidence of constitutive GLUT4 recycling." J Biol Chem **267**(25): 17710-17715.

Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin and J. Han (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." J Biol Chem **271**(30): 17920-17926.

Jiang, Y., H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, F. Di Padova, R. J. Ulevitch and J. Han (1997). "Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta." J Biol Chem **272**(48): 30122-30128.

Jiang, Y., Z. Li, E. M. Schwarz, A. Lin, K. Guan, R. J. Ulevitch and J. Han (1997). "Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection." J Biol Chem **272**(17): 11096-11102.

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-821.

Kaiser, R. A., O. F. Bueno, D. J. Lips, P. A. Doevendans, F. Jones, T. F. Kimball and J. D. Molkenin (2004). "Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo." J Biol Chem **279**(15): 15524-15530.

Kilgour, E., S. A. Baldwin and D. J. Flint (1995). "Divergent regulation of rat adipocyte GLUT1 and GLUT4 glucose transporters by GH." J Endocrinol **145**(1): 27-33.

Krauss, G. (1997). Biochemie der Regulation und Signaltransduktion : das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner. Weinheim, Wiley-VCH.

Kumar, S., M. S. Jiang, J. L. Adams and J. C. Lee (1999). "Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **263**(3): 825-831.

Kumar, S., P. C. McDonnell, R. J. Gum, A. T. Hand, J. C. Lee and P. R. Young (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." Biochem Biophys Res Commun **235**(3): 533-538.

Lamas Bervejillo, M., J. Bonanata, G. R. Franchini, A. Richeri, J. M. Marques, B. A. Freeman, F. J. Schopfer, E. L. Coitino, B. Corsico, H. Rubbo and A. M. Ferreira (2020). "A FABP4-PPARgamma signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes." Redox Biol **29**: 101376.

Lechner, C., M. A. Zahalka, J. F. Giot, N. P. Moller and A. Ullrich (1996). "ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4355-4359.

Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, J. E. Strickler, M. M. McLaughlin, I. R. Siemens, S. M. Fisher, G. P. Livi, J. R. White, J. L. Adams and P. R. Young (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-746.

Lekstrom-Himes, J. and K. G. Xanthopoulos (1998). "Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors." J Biol Chem **273**(44): 28545-28548.

Li, Z., Y. Jiang, R. J. Ulevitch and J. Han (1996). "The Primary Structure of p38 γ : A New Member of p38 Group of MAP Kinases." Biochemical and Biophysical Research Communications **228**(2): 334-340.

Ma, Y., L. Zhang and X. Huang (2014). "Genome modification by CRISPR/Cas9." FEBS J **281**(23): 5186-5193.

MacDougald, O. A., C. S. Hwang, H. Fan and M. D. Lane (1995). "Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9034-9037.

Maeda, K., H. Cao, K. Kono, C. Z. Gorgun, M. Furuhashi, K. T. Uysal, Q. Cao, G. Atsumi, H. Malone, B. Krishnan, Y. Minokoshi, B. B. Kahn, R. A. Parker and G. S.

Hotamisligil (2005). "Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes." Cell Metab **1**(2): 107-119.

Medina-Gomez, G., S. Gray and A. Vidal-Puig (2007). "Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1)." Public Health Nutr **10**(10A): 1132-1137.

Montessuit, C., N. Rosenblatt-Velin, I. Papageorgiou, L. Campos, C. Pellieux, T. Palma and R. Lerch (2004). "Regulation of glucose transporter expression in cardiac myocytes: p38 MAPK is a strong inducer of GLUT4." Cardiovasc Res **64**(1): 94-104.

Morooka, T. and E. Nishida (1998). "Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells." J Biol Chem **273**(38): 24285-24288.

Morrison, D. K. (2012). "MAP kinase pathways." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(11): a011254.

Munoz, L. and A. J. Ammit (2010). "Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease." Neuropharmacology **58**(3): 561-568.

Nagata, Y., T. Moriguchi, E. Nishida and K. Todokoro (1997). "Activation of p38 MAP kinase pathway by erythropoietin and interleukin-3." Blood **90**(3): 929-934.

New, L. and J. Han (1998). "The p38 MAP Kinase Pathway and Its Biological Function." Trends in Cardiovascular Medicine **8**(5): 220-228.

New, L., Y. Jiang, M. Zhao, K. Liu, W. Zhu, L. J. Flood, Y. Kato, G. C. Parry and J. Han (1998). "PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase." EMBO J **17**(12): 3372-3384.

Newton, R. and N. Holden (2003). "Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase: potential as anti-inflammatory agents in asthma?" BioDrugs **17**(2): 113-129.

Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (2002). "Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein." Diabetes **51**(9): 2734-2741.

Obata, T., G. E. Brown and M. B. Yaffe (2000). "MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway." Crit Care Med **28**(4 Suppl): N67-77.

Oleinikov, D. (2019). Myocardial Metabolism. Veterinary Anatomy and Physiology: 61.

Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal **12**(1): 1-13.

Park, T.-J., A. Park, J. Kim, J.-Y. Kim, B. S. Han, K.-J. Oh, E. W. Lee, S. C. Lee, K.-H. Bae and W. K. Kim (2021). "Myonectin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by regulating p38 MAPK pathway." BMB Reports **54**(2): 124-129.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.

Pedersen, S. B., J. M. Bruun, K. Kristensen and B. Richelsen (2001). "Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen." Biochem Biophys Res Commun **288**(1): 191-197.

Raingaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-7426.

Ramsden, D. B., P. W. Ho, J. W. Ho, H. F. Liu, D. H. So, H. M. Tse, K. H. Chan and S. L. Ho (2012). "Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction." Brain Behav **2**(4): 468-478.

Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott and F. Zhang (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." Nature Protocols **8**(11): 2281-2308.

Reed, B. C. and M. D. Lane (1980). "Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 285-289.

Ren, D., T. N. Collingwood, E. J. Rebar, A. P. Wolffe and H. S. Camp (2002). "PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis." Genes Dev **16**(1): 27-32.

Robidoux, J., W. Cao, H. Quan, K. W. Daniel, F. Moukdar, X. Bai, L. M. Floering and S. Collins (2005). "Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes." Mol Cell Biol **25**(13): 5466-5479.

Rosen, E. D. (2005). "The transcriptional basis of adipocyte development." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **73**(1): 31-34.

Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2000). "Molecular regulation of adipogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 145-171.

Saleh, M. C., M. B. Wheeler and C. B. Chan (2002). "Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator." Diabetologia **45**(2): 174-187.

Samulin, J., I. Berget, S. Lien and H. Sundvold (2008). "Differential gene expression of fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **151**(2): 147-152.

Saraste, M. (1999). "Oxidative phosphorylation at the fin de siecle." Science **283**(5407): 1488-1493.

Selimovic, D., M. Hassan, Y. Haikel and U. R. Hengge (2008). "Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2." Cell Signal **20**(2): 311-322.

Shepherd, P. R. and B. B. Kahn (1999). "Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus." N Engl J Med **341**(4): 248-257.

Skinner, J. S. and T. M. McLellan (2013). "Correction to: The Transition from Aerobic to Anaerobic Metabolism." Research Quarterly for Exercise and Sport **84**(2): 273-273.

Smith, P. J., L. S. Wise, R. Berkowitz, C. Wan and C. S. Rubin (1988). "Insulin-Like Growth Factor-I Is an Essential Regulator of the Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes." Journal of Biological Chemistry **263**(19): 9402-9408.

Somwar, R., D. Y. Kim, G. Sweeney, C. Huang, W. Niu, C. Lador, T. Ramlal and A. Klip (2001). "GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase." Biochemical Journal **359**(3): 639-649.

Somwar, R., S. Koterski, G. Sweeney, R. Sciotti, S. Djuric, C. Berg, J. Trevillyan, P. E. Scherer, C. M. Rondinone and A. Klip (2002). "A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation." J Biol Chem **277**(52): 50386-50395.

Sozen, B., S. Ozturk, A. Yaba and N. Demir (2015). "The p38 MAPK signalling pathway is required for glucose metabolism, lineage specification and embryo survival during mouse preimplantation development." Mech Dev **138 Pt 3**: 375-398.

Sztalryd, C. and D. L. Brasaemle (2017). "The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1862**(10 Pt B): 1221-1232.

Thompson, M. P. and D. Kim (2004). "Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs." FEBS Lett **568**(1-3): 4-9.

Tontonoz, P., E. Hu and B. M. Spiegelman (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor." Cell **79**(7): 1147-1156.

Vidal-Puig, A., G. Solanes, D. Grujic, J. S. Flier and B. B. Lowell (1997). "UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun **235**(1): 79-82.

Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud and J. A. Cooper (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." EMBO J **16**(8): 1909-1920.

Wauters, M., R. V. Considine and L. F. Van Gaal (2000). "Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator." Eur J Endocrinol **143**(3): 293-311.

Wilson, K. P., M. J. Fitzgibbon, P. R. Caron, J. P. Griffith, W. Chen, P. G. McCaffrey, S. P. Chambers and M. S. Su (1996). "Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(44): 27696-27700.

Wirth, A. and H. Hauner (2013). Adipositas: Ätiologie, Folgekrankheiten, Diagnostik, Therapie, Springer Berlin Heidelberg.

Wu, J., P. Bostrom, L. M. Sparks, L. Ye, J. H. Choi, A. H. Giang, M. Khandekar, K. A. Virtanen, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W. D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerback, P. Schrauwen and B. M. Spiegelman (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human." Cell **150**(2): 366-376.

Wu, S., C. Luo, N. U. F. Hameed, Y. Wang and D. Zhuang (2020). "UCP2 silencing in glioblastoma reduces cell proliferation and invasiveness by inhibiting p38 MAPK pathway." Exp Cell Res **394**(1): 112110.

Wu, Z., Y. Xie, R. F. Morrison, N. L. Bucher and S. R. Farmer (1998). "PPAR γ induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of

C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes." J Clin Invest **101**(1): 22-32.

Xu, J. and K. Liao (2004). "Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation." J Biol Chem **279**(34): 35914-35922.

Zhang, J., I. Khvorostov, J. S. Hong, Y. Oktay, L. Vergnes, E. Nuebel, P. N. Wahjudi, K. Setoguchi, G. Wang, A. Do, H. J. Jung, J. M. McCaffery, I. J. Kurland, K. Reue, W. N. Lee, C. M. Koehler and M. A. Teitell (2011). "UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells." EMBO J **30**(24): 4860-4873.

Zhou, M., B. Z. Lin, S. Coughlin, G. Vallega and P. F. Pilch (2000). "UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(3): E622-629.

7 Danksagung

Als Doktorandin des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie Düsseldorf sowie Mitglied des IRTG 1902 danke ich Herrn Prof. Axel Gödecke für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit. Durch seine Begeisterung für die Wissenschaft inspirierte er mich und gab mir Mut, mich immer wieder neuen Herausforderungen zu stellen. Er hatte stets ein offenes Ohr für mich und beantwortete jede meiner Fragen mit Geduld.

Danken möchte ebenfalls der Deutschen Forschungsgemeinschaft und insbesondere dem IRTG 1902 für die Ermöglichung eines Stipendiums im Rahmen meiner Promotion.

Ein großer Dank gilt auch dem Team der Herz- und Kreislaufphysiologie. Ich habe mich stets als Mitglied des Teams gefühlt und die ruhige und supportive Arbeitsatmosphäre sehr geschätzt. Ein besonderer Dank geht an meine Mentorin Dr. Lisa Kalfhues, welche mich stets ermutigt hat und immer bereit war, meine zahlreichen Fragen zu beantworten und mich auch bei gescheiterten Versuchen zu unterstützen. Insbesondere möchte ich mich auch bei Susanne Küsters für die praktische Unterstützung bedanken, vor allem bei der Plasmidpräparation.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Sandra Berger deren Unterstützung im Graduiertenkolleg ich sehr schätze.

Der „Medical Research School Düsseldorf“ (MedRSD) verdanke ich die Einbindung in ein Curriculum, das mir gute Impulse zur wissenschaftlichen Praxis und den Austausch mit Kollegen anderer Forschungsgruppen vermittelt hat.

Meine tiefste Bewunderung und Dankbarkeit gelten meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt haben.