

Neue Regulatoren des zellulären Glukosestoffwechsels

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Steffi Heidenreich

Berlin

2018

Die vorliegende Arbeit wurde von 2014 bis 2018, extern am Institut für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Schupp angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Schupp

2. Gutachter: Prof. Dr. Beate Koksch

Disputation am 01.07.2019

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nicht die Leistung einer Person allein, sondern ich schulde vielen Menschen einen herzlichen Dank, ohne deren Hilfe diese Doktorarbeit niemals zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Michael Schupp** für die Überlassung dieses interessanten Forschungsthemas, seine jederzeit offene Tür sowie seine Diskussionsbereitschaft während der Betreuung dieser Arbeit. Ich habe dies nie als selbstverständlich angesehen.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Frau **Prof. Dr. Beate Koks** vom Institut Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin dankbar.

Vielen Dank an alle ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der **Arbeitsgruppe Schupp** für das wundervolle Arbeitsklima und den ein oder anderen gelungenen Feierabend. Dabei gebührt **Dr. Nicole Witte, Dr. Miriam Knauer, Dr. Isabel Göhring** und **Matthias Münzner** ein großes Dankeschön, ohne deren Vorarbeit und Hilfsbereitschaft die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso möchte ich mich bei **Dr. Geert Michel, Tanita Blum** und **Julia Pientka** für die hilfreiche Unterstützung bei der Generierung der transgenen Mauslinie sowie der Betreuung meiner Tiere im FEM in Steglitz bedanken.

Der **Sonnenfeld Stiftung** und dem **Charité – Promotionsstipendium** sei für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsvorhabens gedankt.

Ein Dankeschön geht auch an **Dr. Franziska Schwarz (SCI/VIS/TO)**, deine zur Verfügung gestellte *icon library* erlaubte mir die schematische Darstellung der Generierung der RetSat-Mauslinie in einem individuellen Design.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen **Korrekturlesern** bedanken. Danke für eure Unterstützung und eure wertvolle Zeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....I

Abbildungsverzeichnis VII

Tabellenverzeichnis.....IX

1 Einleitung..... 1

1.1 Retinol Saturase (RetSat) 2

1.2 Der Transkriptionsfaktor ChREBP 3

 1.2.1 Proteinstruktur und Interaktionspartner 4

 1.2.2 Funktion in der Leber 5

 1.2.3 Regulation..... 7

 1.2.4 Aktivierung durch posttranslationale Modifikationen..... 8

1.3 RetSat-regulierte posttranslationale Modifikationen von ChREBP..... 9

1.4 Zielsetzung 10

2 Material..... 11

2.1 Chemikalien und Substanzen 11

2.2 Zellkultur..... 14

2.3 Medien 15

2.4 Puffer..... 16

2.5 Lösungen..... 18

2.6 Kits 19

2.7 Enzyme..... 20

2.8 Molekulargewichtsmarker 21

2.9 Antikörper 21

 2.9.1 Primärantikörper 21

2.9.2	Sekundärantikörper	22
2.10	Fluorochrome	22
2.11	Plasmide	23
2.12	Oligonukleotide.....	23
2.12.1	siRNA	24
2.12.2	shRNA (Zielsequenz)	24
2.12.3	Primer für qRT-PCR.....	24
2.12.4	Primer für Generierung der Hybridisierungssonden.....	25
2.12.5	Mutagenese-Primer	25
2.12.6	Genotypisierungsprimer.....	26
2.12.7	Sequenzierungsprimer	27
2.13	Zelllinien	27
2.14	Bakterienstämme.....	27
2.15	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	28
2.16	Diäten	28
2.17	Adenoviren.....	29
2.18	Adeno-assoziierte-Viren (AAV)	29
2.19	ausgewählte Verbrauchsmaterialien	29
2.20	Software	30
3	Methoden	31
3.1	Molekularbiologische Methoden	31
3.1.1	RNA-Isolation aus kultivierten Zellen.....	31
3.1.2	RNA-Isolation aus Lebergewebe	31
3.1.3	cDNA-Synthese	32
3.1.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	32
3.1.5	Zielgerichtete Mutagenese	33

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.6	Transformation von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen.....	34
3.1.7	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	35
3.1.8	Isolation von genomischer DNA und Genotypisierung.....	35
3.1.9	Sequenzierung.....	38
3.1.10	Southern Blot Analyse	38
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	40
3.2.1	Isolation von Gesamtproteinextrakten aus kultivierten Zellen	40
3.2.2	Isolation von Gesamtproteinextrakten aus Lebergewebe	41
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	41
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.2.5	Western Blot Analyse	42
3.2.6	Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	43
3.3	Zellbiologische Methoden.....	44
3.3.1	Kultivierung und Passagieren der HEK293- und AML12-Zellen.....	44
3.3.2	Isolation von primären Maushepatozyten.....	44
3.3.3	Transfektion von HEK293-Zellen mittels Calcium-Phosphat- Präzipitation	46
3.3.4	Transfektion von HEK293- und AML12-Zellen mittels Lipofektion	47
3.3.5	Transfektion von primären Maushepatozyten mit siRNA.....	47
3.3.6	Gentransfer durch Adenoviren <i>in vitro</i>	48
3.3.6.1	Adenovirusinfektion von HEK293-Zellen.....	48
3.3.6.2	Adenovirusinfektion von primären Maushepatozyten.....	49
3.3.7	Lipidfärbung mit <i>Oil-Red O</i>	50
3.3.8	Luziferase Assay	50
3.3.9	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	51
3.4	Tierversuche.....	52
3.4.1	Gentransfer durch Adenoviren <i>in vivo</i>	52

3.4.2	Gentransfer durch Adeno-assoziierte-Viren	52
3.4.3	Intravenöse Virusapplikation über die Schwanzvene	53
3.4.4	Versuchsablauf.....	53
3.4.4.1	Hepatische RetSat-Depletion in adipösen Mäusen.....	53
3.4.4.2	Hepatische RetSat-Deletion in RetSat-Mäusen	54
3.4.5	Bestimmung des Körpergewichts	54
3.4.6	Bestimmung der Blutglukose.....	54
3.4.7	Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)	55
3.4.8	Intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT)	55
3.4.9	Hepatische Insulinsensitivität	55
3.5	Generierung einer neuen Mauslinie mit induzierbaren RetSat <i>knockout</i>	56
3.6	Humane Leberproben.....	59
3.7	Statistische Auswertung	60
4	Ergebnisse.....	61
4.1	RetSat als neuer Regulator der hepatischen Glykolyse und Lipogenese	61
4.1.1	Expressionsniveau der <i>RetSat</i> in murinen adipösen Leberproben.....	61
4.1.2	Einfluss der hepatischen RetSat-Expression auf die durch Hochfettdiät-induzierte hepatische Steatose	62
4.1.3	Einfluss der hepatischen RetSat-Depletion auf die Glukosetoleranz	63
4.1.4	Einfluss der hepatischen RetSat-Depletion auf die Insulintoleranz.....	64
4.1.5	Korrelation zwischen humaner hepatischer <i>RETSAT</i> mRNA Expression und Fettleibigkeit sowie dem Schweregrad einer hepatischen Steatose	65
4.1.6	Einfluss der RetSat-Depletion auf die nukleäre Anreicherung von ChREBP.....	66
4.1.6.1	Antikörpervalidierung für die Immunfluoreszenz in primären Maushepatozyten	67

4.1.6.2	Dezimierter nukleärer Anreicherung von ChREBP infolge der RetSat-Depletion in primären Maushepatozyten	68
4.1.7	Korrelation zwischen humaner hepatischer <i>RETSAT</i> mRNA Expression und Expression der ChREBP-Zielgene <i>PKLR</i> und <i>ACCI</i>	70
4.2	Generierung einer neuen Mauslinie: RetSat flox/flox	71
4.2.1	Validierung der Integration des RetSat flox-Konstruktes in ES-Zellen	71
4.2.2	Überprüfung der Chimären auf Keimbahntransmission	73
4.2.3	Analyse der RetSat-Expression in Mäusen mit <i>knockout-first</i> Allel	74
4.2.4	Überprüfung des genetischen Hintergrunds der transgenen RetSat-Mauslinie	75
4.2.5	Effizienz der durch Rekombinase Cre-vermittelten hepatischen RetSat-Deletion.....	76
4.3	EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierung im ChREBP	77
4.3.1	Quantitative Untersuchung der Prolinhydroxylierung im ChREBP.....	77
4.3.2	Zielgerichtete Mutagenese: Substitution der Proline an Position 141 und 536 im ChREBP α	78
4.3.2.1	Einfluss der Prolin-Substitution auf ChREBP-Proteinstabilität ...	79
4.3.2.2	Einfluss der Prolin-Substitution auf ChREBP-Aktivität	80
4.3.2.3	Effekt der ektopten Expression der ChREBP-Mutanten in einem ChREBP-defizienten System auf <i>Txnip</i>	81
4.3.2.4	Auswirkung der Prolin-Substitution auf die ChREBP-EGLN3-Proteininteraktion.....	83
5	Diskussion	85
5.1	Beteiligung der RetSat an der Entwicklung einer hepatischen Steatose.....	85
5.2	RetSat reguliert die nukleäre Anreicherung von ChREBP	88
5.3	Generierung einer konditionalen RetSat <i>knockout</i> -Mauslinie	89
5.3.1	Etablierung der konditionalen RetSat <i>knockout</i> -Maus	91
5.3.2	Funktioneller Test der konditionalen RetSat <i>knockout</i> -Maus.....	95

INHALTSVERZEICHNIS

5.4	Prolinhydroxylierung als neue posttranslationale Modifikation von ChREBP	96
5.4.1	Substitution der Proline an Position 141 und 536 im ChREBP.....	98
5.4.2	RetSat als potentieller Regulator der EGLN3-Aktivität	102
6	Zusammenfassung	105
7	Summary.....	107
8	Literaturverzeichnis	109
9	Publikationen	125
10	<i>Curriculum Vitae</i>	126

Abkürzungsverzeichnis

36B4	<i>ribosomal protein, large, P0</i>
°C	Grad Celsius
µl/ml	Mikro-/Milliliter
µm/mm/cm	Mikro-/Milli-/Zentimeter
AAV	Adeno-assoziierte-Viren
ACC1	<i>acetyl-coenzyme A carboxylase</i>
Adeno	Adenovirus
Akt	Proteinkinase B (PKB $\alpha/\beta/\gamma$)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BBS	<i>borate buffered saline</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BES	N, N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure
bHLHZip	<i>basic helix-loop-helix/leucine-zipper</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
ChoRE	<i>carbohydrate response element</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ChREBP	<i>carbohydrate response element-binding protein</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
Cre	<i>cyclization recombination</i>
CRTISO	<i>carotenoid isomerase</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DsRed	<i>discosoma red fluorescent protein</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGLN3	<i>egg laying defective nine homolog 3</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F1, F2, F6	Filialgeneration 1, 2, 6
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid Hydrogen
FASN	<i>fatty acid synthase</i>
FBS	<i>fetale bovine serum</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
Flp	Flippase
FM	Fluoreszenzmikroskopie
G6P	Glukose-6-Phosphat
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GRACE	<i>glucose-response activation conserved element</i>
GSM	<i>glucose-sensing module</i>
HBSS	<i>Hank 's Balanced Salt Solution</i>
HCL	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HFD/HS	Hochfettdiät mit hohem Zuckeranteil
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HNF α	<i>hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>
HPRT	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
IB	Immunblot
ifu	<i>infectious unit</i>
ipGTT	intraperitonealer Glukosetoleranztest
ipITT	intraperitonealer Insulintoleranztest
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LID	<i>low-glucose inhibitory domain</i>
LP1	leberspezifischer Promotor
L-PK, PKLR	<i>liver pyruvate kinase</i>
MCR	<i>mondo conserved region</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLX	<i>max-like protein X</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumdihydratphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Hydrogen
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat Hydrogen
NaF	Natriumfluorid
NAFLD	<i>nonalcoholic fatty liver disease</i>
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat
NASH	<i>nonalcoholic steatohepatitis</i>
ND	Normaldiät
Neo	Neomycin
NES1	<i>nuclear export signal 1</i>
NES2	<i>nuclear export signal 2</i>
ng/μg/mg/g	Nano-/Mikro-/Milligramm/Gramm
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nM/μM/mM/M	Nano-/Mikro-/Millimolar/Molar
Nnt	<i>nicotinamide nucleotide transhydrogenase</i>
<i>ob/ob</i>	<i>obese/obese</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PKM2	<i>pyruvate kinase isoenzyme type M2</i>
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PPAR α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor α</i>
qRT	<i>quantitative real-time</i>
RAR α	<i>retinoic acid receptor α</i>
RetSat	<i>retinol saturase</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s/min/h	Sekunde/Minute/Stunde
SCD1	<i>stearoyl-coenzyme A desaturase 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNPs	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T.	Temperatur
TALEN	transkriptionsaktivatorartige Effektor nukleasen
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCA	Zitratzyklus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Txnip	<i>thioredoxin interacting protein</i>
u. a.	unter anderem
u	Unit
V	Volumen
vs.	versus
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
Zip-like	<i>leucine-zipper-like domain</i>
βGal	β-Galactosidase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung der hepatischen Lipogenese durch ChREBP 6

Abbildung 2: Enzymatische Aktivität der EGLNs 10

Abbildung 3: Bandenverteilungsmuster der heterozygoten RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel nach Verpaarung mit Flp-Maus 37

Abbildung 4: Bandenverteilungsmuster der heterozygoten RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel 37

Abbildung 5: Ablauf der metabolischen Charakterisierung 54

Abbildung 6: Einteilung der Versuchsgruppen zur Ermittlung der hepatischen Insulinsensitivität 55

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung der RetSat flox/flox-Maus 56

Abbildung 8: Schematische Darstellung des RetSat flox-Konstruktes 57

Abbildung 9: Hepatische *RetSat* mRNA Expression ist erhöht in fettleibigen Mäusen 61

Abbildung 10: Verminderter Lebertriglyzeridgehalt in adipösen Mäusen mit hepatischer RetSat-Depletion 62

Abbildung 11: Verbesserte Glukosetoleranz nach hepatischer RetSat-Depletion 63

Abbildung 12: Kein Unterschied in der Insulintoleranz nach hepatischer RetSat-Depletion 64

Abbildung 13: Humane hepatische *RETSAT* mRNA Expression korreliert mit Fettleibigkeit und dem Ausmaß einer hepatischen Steatose 66

Abbildung 14: Validierung des ChREBP- und RetSat-Antikörpers 67

Abbildung 15: Dezimierte nukleäre Anreicherung von ChREBP infolge der RetSat-Depletion 69

Abbildung 16: Humane hepatische *RETSAT* mRNA Expression korreliert mit Expression der ChREBP-Zielgene *PKLR* und *ACCI* 70

Abbildung 17: Bestätigung der korrekten einmaligen Rekombination des *RetSat*-Transgens in den *RetSat*-Genlocus 72

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 18: RetSat-Expression in Mäusen mit <i>knockout-first</i> Allel	74
Abbildung 19: Überprüfung des C57Bl/6J-Hintergrunds der RetSat-Mäuse nach sechs Rückkreuzungen	75
Abbildung 20: RetSat-Expression in Mäusen mit konditionalem <i>RetSat</i> -Allel nach Expression der Rekombinase Cre	76
Abbildung 21: Zunahme der Prolinhydroxylierungen im ChREBP infolge der ektopen Expression der EGLN3	77
Abbildung 22: Proteinstruktur von ChREBP α mit Darstellung der Prolinhydroxylierung an Position 141 und 536.....	78
Abbildung 23: Kein Unterschied in der Proteinstabilität der ChREBP-Mutanten	79
Abbildung 24: Verminderte Aktivität der ChREBP-Mutanten.....	81
Abbildung 25: Effekt der ektopen Expression von ChREBP-Wt und der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und der Doppelmutante P141,536A) in einem ChREBP-defizienten System auf das ChREBP-Zielgen <i>Txnip</i>	82
Abbildung 26: ChREBP-Mutanten zeigen keinen Unterschied in der Proteininteraktion mit der EGLN3	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung des cDNA-Mastermix	32
Tabelle 2:	Zusammensetzung des qRT-PCR-Mastermix	33
Tabelle 3:	Temperaturprogramm der qRT-PCR	33
Tabelle 4:	Standart-PCR-Ansatz für Genotypisierung	36
Tabelle 5:	Verdau der genomischen DNA zur Southern Blot Analyse	39
Tabelle 6:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	42
Tabelle 7:	Injektionsnarkose zur Isolation von primären Maushepatozyten	45
Tabelle 8:	Transfektionsansätze der Calcium-Phosphat-Präzipitation	46
Tabelle 9:	Dosierung der verwendeten Adenoviren in HEK293-Zellen	49
Tabelle 10:	Dosierung der verwendeten Adenoviren in primären Maushepatozyten.....	49
Tabelle 11:	Übersicht der erzeugten Chimären	73

1 Einleitung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) ist weltweit die am häufigsten diagnostizierte Ursache einer chronischen Lebererkrankung [1, 2]. Schätzungen gehen von einer Häufigkeit der NAFLD in der europäischen Bevölkerung von 20 bis 30 % aus [2]. Die NAFLD ist eine multifaktorielle Erkrankung, wird aber insbesondere mit metabolischen Erkrankungen, wie Adipositas, Dyslipidämien und Insulinresistenz, assoziiert. Demnach tritt die NAFLD noch häufiger bei Patienten mit Adipositas (76 %), Diabetes mellitus Typ 2 (69 %) und Dyslipidämien (50 %) auf [3 – 5]. Dabei umfasst die Bezeichnung NAFLD ein breites Spektrum unterschiedlicher Schweregrade dieser Erkrankung.

Die Fettleber (hepatische Steatose) ist hierbei der erste Schritt und kann durch verschiedene Veränderungen im Lipidstoffwechsel ausgelöst werden. Bei Übergewicht und Adipositas kommt es durch die zunehmende Einlagerung von Lipiden zur Expansion des Fettgewebes, bis dessen Speicherkapazität erreicht ist. Die ektope Speicherung von Lipiden in den Adipozyten löst intrazellulären Stress aus, wodurch Signalwege aktiviert werden, die ein Gleichgewicht in der Zelle wiederherstellen sollen. Infolgedessen beginnen die Adipozyten mit der verstärkten Freisetzung von Fettsäuren, die über die Zirkulation in die Leber gelangen und dort von den Hepatozyten aufgenommen und gespeichert werden [6]. Neben der erhöhten Lipidaufnahme aus der Peripherie ist zusätzlich eine gesteigerte hepatische Lipogenese an der Entwicklung einer hepatischen Steatose beteiligt. Auch wenn eine NAFLD zunächst symptomatisch unauffällig ist, entwickeln etwa 5 bis 20 % der Fettleberpatienten eine gefährliche nicht-alkoholische Steatohepatitis (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) [7], die durch ein erhöhtes Risiko für progressive Fibrose, Zirrhose und Leberversagen gekennzeichnet ist. Im weiteren Fortschreiten der Erkrankung wird die NASH zusätzlich als Risikofaktor für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms angesehen [8].

Die Therapiemöglichkeiten bei NAFLD sind bisher auf eine Gewichtsreduktion von mindestens 3 bis 5 % in Kombination mit einer Bewegungssteigerung beschränkt [9]. Unterstützende medikamentöse Ansätze, wie u. a. der Einsatz von Lipidsenkern, Insulinsensitizern und Antioxidantien, sind Schwerpunkt derzeit durchgeführter Studien. Bis jetzt steht aber keine zuverlässige medikamentöse Fettleber-Therapie zur Verfügung, um den gestörten Fettsäure- und Triglyzeridstoffwechsel in den Hepatozyten zu korrigieren.

1.1 Retinol Saturase (RetSat)

Die Retinol Saturase (RetSat) wurde durch Sequenzanalysen im Jahr 2004 als ein Enzym identifiziert, welches eine Homologie zur in Pflanzen vorkommenden *carotenoid isomerase* (CRTISO) aufweist. Die Substratspezifität der CRTISO für Prolycopin konnte für die RetSat nicht nachgewiesen werden. Stattdessen fanden Moise *et al.*, dass die Oxidoreduktase RetSat in den Retinoidmetabolismus involviert ist. In einer NADH/NADPH- oder FADH-abhängigen Reaktion katalysiert RetSat die Reduktion von Retinol zu 13,14-Dihydroretinol [10]. 13,14-Dihydroretinol kann durch dieselben Enzyme, wie Retinol über Retinal zur Retinsäure, über 13,14-Dihydroretinal zur 13,14-Dihydroretinsäure, oxidiert werden [11]. Die Retin- sowie 13,14-Dihydroretinsäure sind aktive Metaboliten, die den nukleären *retinoic acid receptor α* (RAR α) aktivieren können. Die 13,14-Dihydroretinsäure weist dabei eine geringere Potenz für RAR α im Vergleich zur Retinsäure auf [12]. 13,14-Dihydroretinol ist eine chirale Verbindung, wobei durch die RetSat selektiv das (R)-Enantiomer entsteht. Das (R)-Enantiomer besitzt eine geringere Affinität zu RAR α als das (S)-Enantiomer [13]. Obwohl der Metabolismus von 13,14-Dihydroretinol bereits aufgeklärt werden konnte, ist die physiologische Funktion der Dihydroretinoide noch unbekannt.

Die RetSat stellt eines der am stärksten differentiell regulierten Gene in metabolischen Erkrankungen dar. Zu diesem Ergebnis kamen die Autoren von Park *et al.* nach einer Meta-Analyse von Microarray-Daten metabolischer Experimente aus insgesamt 16 verschiedenen Datensets [14]. Interessanterweise deutet dessen Expressionsmuster, mit der höchsten Expression in der Leber, Niere, dem Darm und Fettgewebe [10], ebenfalls auf eine wichtige Rolle in den metabolisch aktiven Organen hin. Bisher ist jedoch wenig über die Funktion der RetSat in diesen Geweben bekannt.

Im Fettgewebe wird die *RetSat*-Expression durch Bindung des nukleären Rezeptors *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), an ein PPAR *response element* im ersten Intron der *RetSat*, transkriptionell reguliert. Durch diese Bindungsstelle wird die *RetSat*-Expression während der Differenzierung von Präadipozyten zu ausgereiften Adipozyten induziert. Schupp *et al.* zeigten, dass eine RetSat-Depletion in Präadipozyten zu einer Inhibition der Adipozytendifferenzierung, unabhängig vom identifizierten enzymatischen Produkt 13,14-Dihydroretinol, führt. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass RetSat neben der Bildung von 13,14-Dihydroretinol noch andere enzymatische Reaktionen katalysieren kann [15].

In der Leber, dem Organ mit der stärksten RetSat-Expression, wird die *RetSat* durch den nukleären Rezeptor *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α) während des Fastens induziert [16]. PPAR α besitzt eine zentrale Aufgabe im hepatischen Fettsäuremetabolismus durch die Regulation vieler Enzyme der Fettsäureoxidation und Ketogenese [17, 18]. Die Rolle der RetSat im hepatischen Glukose- und Lipidstoffwechsel wurde zuerst durch eine frühere Doktorandin der AG Schupp, Dr. Nicole Witte, näher untersucht. Die Vorarbeit von Dr. Witte stellte die Grundlage für die vorliegende Arbeit dar. Dr. Witte konnte zeigen, dass eine RetSat-Depletion in primären Maushepatozyten zu einer verminderten Expression von glykolytischen und lipogenen Genen führt. Dabei konnten eine verminderte Glukoseaufnahme, Pyruvatbildung und Fettsäuresynthese nachgewiesen werden. Zusätzlich wiesen adipöse Mäuse mit hepatischer RetSat-Depletion signifikant geringere Serum- und Lebertriglyzeride sowie *ad libitum* gefütterte- bzw. gefastete (24 h) Blutglukosewerte auf. Dr. Witte identifizierte, durch Analyse bekannter hepatischer Regulatoren der Glykolyse und Lipogenese, den durch RetSat-regulierten Transkriptionsfaktor *carbohydrate responsive element-binding protein* (ChREBP). Eine hepatische RetSat-Depletion in adipösen Mäusen führte zu einer verminderten *ChREBP* mRNA Expression und ChREBP-Proteinmenge sowie zu einer signifikanten Reduktion bekannter ChREBP-Zielgene. Zusätzlich konnte eine verminderte ChREBP-Aktivität infolge der RetSat-Depletion in primären Maushepatozyten gezeigt werden. Die Ergebnisse von Dr. Witte weisen darauf hin, dass die verminderte ChREBP-Aktivität infolge einer RetSat-Depletion ebenfalls unabhängig von der Generierung von 13,14-Dihydroretinol ist. Durch Zugabe von 13,14-Dihydroretinol konnte weder die durch RetSat-Depletion verminderte Fettsäuresynthese in Adipozyten noch die verminderte Expression des ChREBP-Zielgens *Txnip* in primären Maushepatozyten wieder gesteigert werden [19].

1.2 Der Transkriptionsfaktor ChREBP

Der Transkriptionsfaktor *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) ist ein Masterregulator des hepatischen Glukose- und Lipidstoffwechsels [20, 21]. Aktiviert durch intrazelluläre Glukosemetaboliten vermittelt ChREBP in der Leber die Aufnahme von Kohlenhydraten und ihre Umwandlung in Fette zur langfristigen Speicherung von Energie [22]. Neben der höchsten Expression in der Leber [23], wird ChREBP auch in anderen metabolisch

aktiven Organen, wie dem Fettgewebe, Darm, der Niere und Skelettmuskulatur, stark exprimiert [20, 24]. Zusätzlich konnte ChREBP in pankreatischen Beta-Zellen sowie in bestimmten Gehirnregionen, wie dem Hypothalamus, nachgewiesen werden [25, 26].

Die Isoform ChREBP α ist die größte und dominierende ChREBP-Isoform in der Leber. Das humane ChREBP α besteht aus 852 und das murine ChREBP α aus 864 Aminosäuren [23], wobei die Aminosäuresequenz zu 82 % identisch ist [22]. Im murinen Fettgewebe wurde 2012 noch eine kürzere Isoform, ChREBP β , entdeckt. Der Isoform ChREBP β fehlen am N-Terminus die ersten 177 Aminosäuren. Durch das Fehlen dieser Region ist die transkriptionelle Aktivität von ChREBP β unabhängig von der vorherrschenden Glukosekonzentration [27] und auf einem konstitutiv hohem Niveau (konstitutiv-aktiv) [28]. Es wird vermutet, dass ChREBP α durch ansteigende Glukosekonzentrationen aktiviert wird und nachfolgend die Expression von *ChREBP β* , zur Verstärkung der Zielgenexpression, induziert [29]. Andere Arbeiten in pankreatischen Beta-Zellen zeigten hingegen, dass ChREBP β über einen negativen Feedbackmechanismus die Expression von *ChREBP α* hemmt. Diese reziproke Regulation könnte von Bedeutung sein, um eine Überaktivität von ChREBP α zu verhindern [30].

1.2.1 Proteinstruktur und Interaktionspartner

ChREBP gehört zur Mondo-Familie der *basic helix-loop-helix/leucine-zipper* (bHLHZip) Transkriptionsfaktoren [23, 24]. Bei einem HLH-Motiv werden zwei Alpha-Helices über eine flexible Schleife miteinander verknüpft [31]. Nach glukoseinduzierter Anreicherung von ChREBP im Nukleus ermöglicht das C-terminale bHLHZip-Motiv die Heterodimerisation mit seinem Interaktionspartner *max-like protein X* (MLX) [27, 29]. Dabei bilden zwei solcher Heterodimere einen Heterotetramer-Komplex, der an *carbohydrate response elements* (ChoRE's) in den Promotorregionen der ChREBP-Zielgene bindet und deren Expression reguliert [21, 22, 32]. Außerdem weist ChREBP ein *leucine zipper-like-motif* (Zip-like) und eine *prolin-rich region* auf, die funktionell mit der Ausbildung von weiteren Protein-Protein-Interaktionen oder Dimerisierungen in Zusammenhang gebracht wird [24].

Für die glukoseinduzierte Regulation besitzt ChREBP mehrere funktionelle Motive am N-Terminus [33]. Das *glucose-sensing module* (GSM) mit den *mondo-conserved regions* (MCR) I bis VI besteht aus der *low-glucose inhibitory domain* (LID) und dem *glucose-response activation conserved element* (GRACE). Da GRACE die Transkriptionsaktivität von ChREBP

fördert, hemmt die LID bei niedrigen Glukosekonzentrationen die Aktivität von GRACE über eine intramolekulare Interaktion [34], wodurch ChREBP inaktiv im Zytosol gehalten wird. Zusätzlich bewirkt die Interaktion mit dem Protein 14-3-3 und Exportin 1 eine zytosolische Lokalisation von ChREBP [33, 35]. Bei hohen Glukosekonzentrationen wird die intramolekulare Hemmung von LID aufgehoben und GRACE vermittelt die Transaktivierung von ChREBP [36]. Dabei ist das *nuclear localization signal* (NLS) für den Transport von ChREBP bei hohen Glukosekonzentrationen in den Nukleus durch Interaktion mit Importin α zuständig [37]. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen erfolgt die Inaktivierung von ChREBP durch Export aus dem Nukleus in das Zytosol, vermittelt über die *nuclear export signal 1/2* (NES1, NES2) [38].

1.2.2 Funktion in der Leber

ChREBP reguliert vor allem Gene der Glykolyse und Lipogenese und ist damit maßgeblich an der Synthese von Triglyzeriden in der Leber beteiligt [21, 22] (Abbildung 1). Die meisten Zielgene scheinen durch ChREBP induziert zu werden, nur wenige werden supprimiert [21]. Ein zentrales ChREBP-Zielgen der Glykolyse stellt die *liver pyruvate kinase (L-PK, PKLR)* dar, welches an der Bildung von Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse, beteiligt ist. Zur Unterstützung der Lipogenese induziert ChREBP Enzyme der Fettsäuresynthese, wie beispielsweise *acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC1)* und *fatty acid synthase (FASN)*, sowie der Fettsäure-desaturierung, wie *stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (SCD1)*. Neben glykolytischen und lipogenen Genen induziert ChREBP auch die Expression metabolischer Regulatoren, wie *thioredoxin interacting protein (Txnip)* [39, 40]. Als negativer Feedbackmechanismus hemmt Txnip die Glukoseaufnahme und dient als Schutz der Zelle vor einer Überladung mit Glukose [41, 42].

Ohne ChREBP kann Glukose nicht mehr adäquat in die Leber aufgenommen und in Fettsäuren umgesetzt werden [20, 22]. In ChREBP *knockout*-Mäusen war die Lipogenese um circa 65 % reduziert. Ein verminderter Gehalt an freien Fettsäuren im Plasma sowie weniger epididymales und braunes Fettgewebe waren die Folge. Diese Mäuse wiesen erhöhte Blutglukose- und Insulinwerte und damit Anzeichen einer Insulinresistenz auf. Zusätzlich wurde beobachtet, dass ChREBP *knockout*-Mäuse eine Intoleranz gegenüber der Fütterung von hohen Mengen an

Mono- und Disacchariden besitzen. Die Gabe von Fruktose oder Saccharose führte innerhalb der Mauskoorte sogar zum Tod durch Gewichtsverlust und Hypothermie [20].

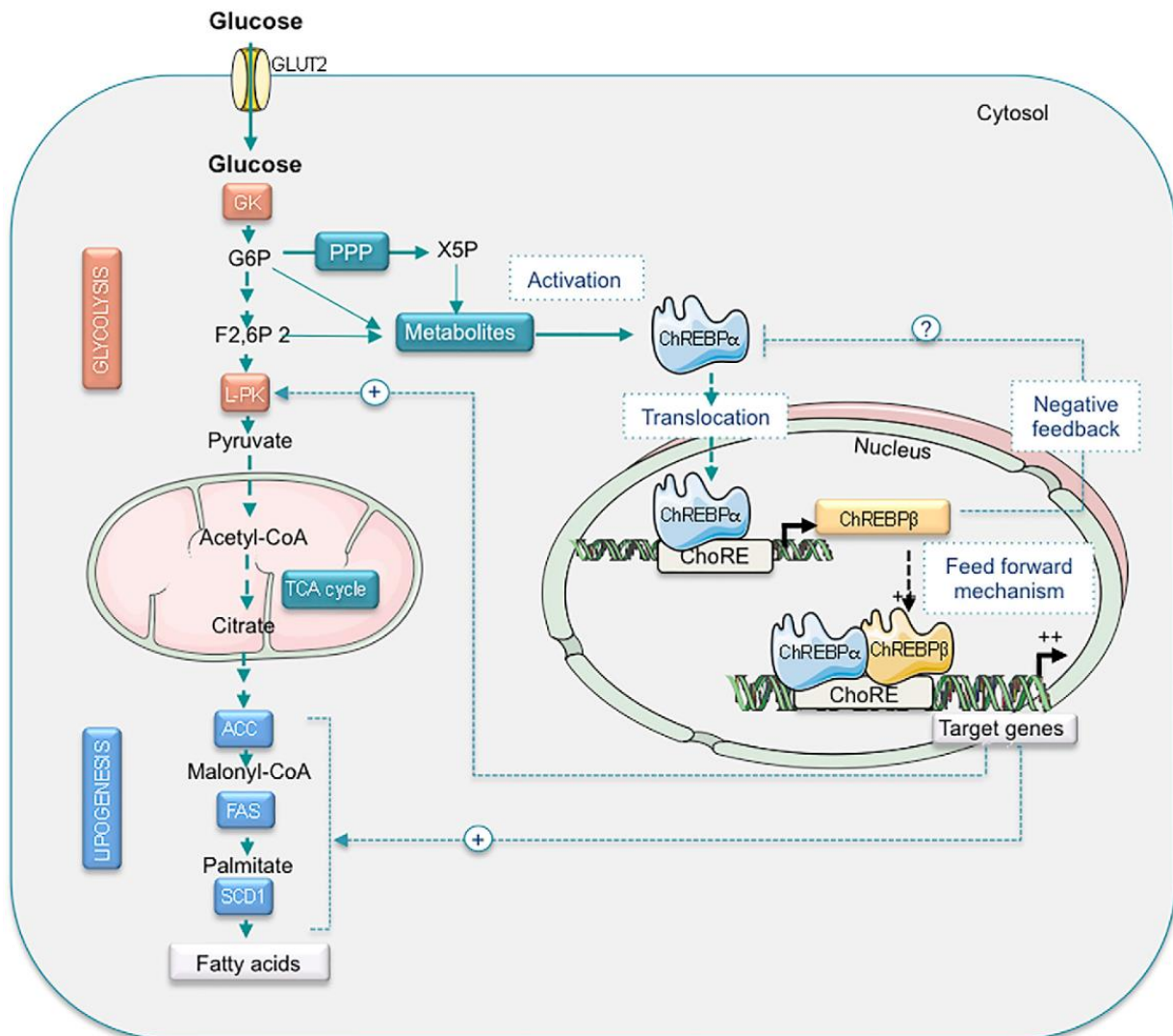


Abbildung 1: Aktivierung der hepatischen Lipogenese durch ChREBP: Über den Glukosetransporter 2 (Glut2) wird insulinunabhängig Glukose in die Leber aufgenommen, wo die *glucokinase* (GK) die Umwandlung zu Glukose-6-Phosphat (G6P) katalysiert. Anschließend können verschiedene Stoffwechselwege, wie die Glykolyse oder der Pentosephosphatweg (PPP), folgen. Die Intermediate Xylulose-5-Phosphat (X5P), G6P und Fructose-2,6-bisphosphat (F2,6P2) können zur Aktivierung von ChREBP α führen. ChREBP α verstärkt die Genexpression der kürzeren Isoform ChREBP β , wodurch vermutlich die Expression der Zielgene verstärkt wird. Jing *et al.* zeigten hingegen einen negativen Feedbackmechanismus in pankreatischen Beta-Zellen auf, wobei ChREBP β die Expression von ChREBP α hemmen könnte. Aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse, kann Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA) gebildet werden, welches als Substrat der Lipogenese dient. Anschließend kann die Synthese der Fettsäuren in mehreren Reaktionsschritten erfolgen, wobei Palmitinsäure entsteht. Durch *stearoyl-coenzyme A desaturase* (SCD1) kann der Einbau von Doppelbindungen erfolgen und die entstandenen einfach gesättigten Fettsäuren können als Ausgangssubstrat für die Synthese von Triglyzeriden zur Verfügung stehen (Abbildung aus [43]).

ChREBP vermittelt die Aufnahme von Kohlenhydraten und ihre Umwandlung in Fette, die in Hungerzeiten als Energiereserven zur Verfügung stehen. Andererseits scheint eine Überstimulation von ChREBP an der Entstehung von Adipositas und deren Folgeerkrankungen, wie Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 und einer hepatischen Steatose, beteiligt zu sein [44 – 46]. In genetisch adipösen Mäusen (*obese*; *ob/ob*-Mäuse) ließ sich eine erhöhte hepatische *ChREBP* mRNA Expression und nukleäre ChREBP-Proteinmenge sowie eine verstärkte Lipogenese nachweisen [47]. *Ob/ob*-Mäuse zeichnen sich aufgrund einer Mutation im *ob*-Gen durch eine Leptindefizienz aus. Dies führt infolge unkontrollierter Futterraufnahme zu einer Fettleibigkeit der Mäuse. Eine ChREBP-Deletion in *ob/ob*-Mäusen führte infolge einer verminderten hepatischen Expression lipogener Enzyme zur Reduktion der Fettsäuresynthese in der Leber und damit zur Normalisierung der Leber- und Serumtriglyzeride sowie der freien Fettsäuren im Plasma. Im Weiteren zeichneten sich diese Mäuse durch verminderte Blutglukosewerte, Futterraufnahme und einer Reduktion des Körpergewichtes aus [48]. Ähnliche metabolische Effekte zeigte eine leberspezifische ChREBP-Depletion in den *ob/ob*-Mäusen. Infolge der verminderten Fettsäuresynthese in der Leber konnte zusätzlich ein Rückgang der hepatischen Steatose sowie eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität beobachtet werden [47].

1.2.3 Regulation

Die Aktivität von ChREBP kann auf mehreren Ebenen reguliert werden. Auf der Genexpressionsebene wird *ChREBP* in der Leber durch eine kohlenhydratreiche Diät induziert, durch Nahrungsentzug oder bei fettreicher Diät reduziert [49]. Dabei tragen hohe Insulinspiegel zu einer Verstärkung der Genexpression bei [50]. Zusätzlich sind nukleäre Rezeptoren, wie u. a. der *thyroid hormon receptor beta* und *liver X receptor*, an einer höheren *ChREBP*-Expression beteiligt [51]. Auf Proteinebene bestimmen Proteinmodifikationen (Kapitel 1.2.4) und spezifische Intermediate des Glukosestoffwechsels die nukleäre Anreicherung von ChREBP sowie die DNA-Bindungsfähigkeit und Transkriptionsaktivität. Beispielsweise fördert Glukose-6-Phosphat und Fruktose-2,6-biphosphat die hepatische ChREBP-Aktivität [52, 53], während Ketonkörper inhibierend wirken [54]. Das Zusammenspiel von multiplen metabolischen und hormonellen Signalen auf die ChREBP-Aktivität ist äußerst komplex, sodass deren detaillierte Erforschung teilweise noch aussteht.

1.2.4 Aktivierung durch posttranslationale Modifikationen

ChREBP-Aktivität und -Translokation wird durch eine Vielzahl posttranslatiionaler Modifikationen beeinflusst. Welche Modifikationen speziell für die glukoseabhängige nukleäre Anreicherung von ChREBP verantwortlich sind wird kontrovers diskutiert. Dabei scheint der Mechanismus der Dephosphorylierung/Phosphorylierung von ChREBP einer der wichtigsten Regulatoren der ChREBP-Aktivität zu sein.

Bei geringen Glukosekonzentrationen liegt ChREBP phosphoryliert an Serin 196 im Zytosol vor [55]. Mit steigender Glukosekonzentration bewirkt Xylulose-5-Phosphat, ein Stoffwechselintermediat des Pentosephosphatweges, die Aktivierung der Proteinphosphatase 2A (PP2A). Durch PP2A wird das Serin 196 im ChREBP dephosphoryliert und die Interaktion von ChREBP und Protein 14-3-3 gelöst. Die nun freigelegte NLS ermöglicht die Interaktion mit Importin α , wodurch ChREBP in den Nukleus transloziert [33, 34, 37]. Im Nukleus vollzieht PP2A weitere Dephosphorylierungen (murin: Serin 626, Threonin 666) nahe bzw. innerhalb des bHLHZip-Motivs des ChREBP. Die dadurch frei gewordene DNA-Bindungsstelle ermöglicht ChREBP, nach Heterodimerisation mit MLX, die Bindung an die Promotorregion der Zielgene und induziert deren Transkription [55, 56]. Mit sinkender Glukosekonzentration bewirkt der ansteigende Glukagon-Spiegel eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die dadurch aktivierte Proteinkinase A phosphoryliert die oben genannten Phosphorylierungsstellen im ChREBP und hemmt damit dessen DNA-Bindungs-fähigkeit und Transkriptionsaktivität [55, 56]. Eine folgende Komplexbildung von ChREBP mit dem Protein 14-3-3 und u. a. Exportin 1 führt über die NES1/2 zum Rücktransport ins Zytosol [35, 38].

Mittlerweile wurden aber auch andere posttranslationale Modifikationen mit Einfluss auf ChREBP-Proteinlevel und -Zielgenexpression identifiziert. Hierzu gehören beispielsweise die Acetylierung und die *O-linked β -N-acetyl-glucosamine* Modifikation [57 – 59].

1.3 RetSat-regulierte posttranslationale Modifikationen von ChREBP

Die Auswertung eines Expressionsarrays RetSat-depletierter primärer Maushepatozyten identifizierte die *egg laying defective nine homolog 3* (EGLN3) als am stärksten RetSat-reguliertes proteinmodifizierendes Enzym [19]. Interessanterweise führte eine EGLN3-Depletion, ebenfalls wie eine RetSat-Depletion in primären Maushepatozyten sowie in Mauslebern, zu einer Reduktion der Genexpression charakterisierter ChREBP-Zielgene [19, 60]. Die Herunterregulation der ChREBP-Zielgene konnte mit einer Verminderung der ChREBP-Aktivität infolge der EGLN3-Depletion erklärt werden. Zusätzlich lässt eine nachgewiesene Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3 eine Proteinmodifikation von ChREBP durch EGLN3 vermuten [60].

Die EGLN3 ist eine von drei Isoformen einer Enzymfamilie, die sauerstoffabhängig die Hydroxylierung von Prolinresten in Zielproteinen katalysiert [61] (Abbildung 2). Lange wurde die Prolinhydroxylierung des *hypoxia-inducible factor* (HIF) als Hauptfunktion dieser Enzymfamilie betrachtet, um auf wechselnde Sauerstoffbedingungen in der Umgebung zu reagieren [62, 63]. Bei ausreichender Sauerstoffkonzentration führen die Prolinhydroxylierungen der EGLNs zur Degradation von HIF, vermittelt über die Bindung der E3-Ubiquitinligase von Hippel-Lindau-Protein. Bei einer Unterversorgung von Sauerstoff kommt es aufgrund der eingeschränkten enzymatischen Aktivität der EGLNs zur Akkumulierung von HIF [63 – 65]. Dabei aktiviert der Transkriptionsfaktor HIF Signalwege, die für eine Reaktion der Zelle auf eine Unterversorgung mit Sauerstoff wichtig sind. Dazu gehören u. a. Prozesse der Gefäßneubildung [66], der Bildung von Erythrozyten [67] und des Zellstoffwechsels [68]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die EGLNs wesentlich mehr Proteine als nur HIF mittels Prolinhydroxylierung modifizieren können [69].

Insbesondere die EGLN3 besitzt ein breites Spektrum intrazellulärer Zielproteine, die in viele Signalwege, wie Muskeldifferenzierung [70], Apoptose [71] und Zellentwicklung [72], eingebunden sind. Nachgewiesene Prolinhydroxylierungen in ChREBP mittels massenspektrometrischer Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe unterstützen die Hypothese, dass die RetSat-regulierte EGLN3 durch Prolinhydroxylierungen die Aktivität oder Proteinstabilität von ChREBP beeinflusst [60].

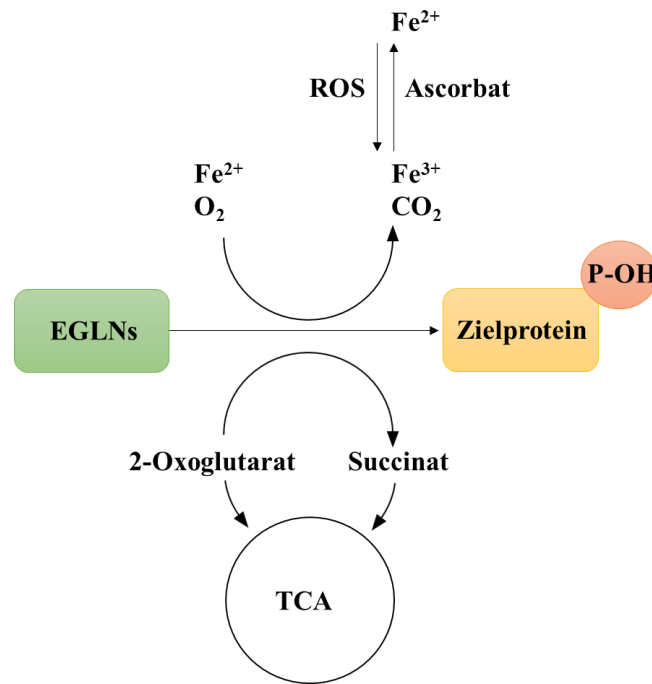


Abbildung 2: Enzymatische Aktivität der EGLNs: EGLNs sind eisenabhängige Dioxygenasen, die molekularen Sauerstoff (O₂), 2-Oxoglutarat und den Prolinrest des Zielproteins zu Succinat, Kohlenstoffdioxid (CO₂) und einem hydroxylierten Prolinrest (P-OH) umsetzen. Dabei kann die enzymatische Aktivität der EGLNs durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Ascorbat beeinflusst werden. ROS oxidieren zweiwertiges Eisen (Fe²⁺) zu dreiwertigem Eisen (Fe³⁺), wodurch Fe²⁺ nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung steht. Ascorbat kann durch Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ die Auswirkung der Eisenoxidation durch ROS rückgängig machen. TCA = Zitratzyklus.

1.4 Zielsetzung

Die RetSat beeinflusst die Expression glykolytischer und lipogener Gene über den glukose-aktivierten Transkriptionsfaktor ChREBP. Vorarbeiten weisen darauf hin, dass die verminderte ChREBP-Aktivität infolge einer RetSat-Depletion von EGLN3 abhängig ist [19].

Ziel dieser Arbeit ist es:

- 1: die Auswirkung einer RetSat-Depletion in der Leber hinsichtlich hepatischer Steatose näher zu untersuchen und den Mechanismus der RetSat-ChREBP-Interaktion aufzudecken.
- 2: die Generierung einer konditionalen RetSat *knockout*-Mauslinie, um in zukünftigen Untersuchungen die Auswirkungen einer RetSat-Deletion in Kurz- oder Langzeitstudien auch in anderen Organen, wie dem Fettgewebe, Darm und der Niere, untersuchen zu können.
- 3: die Bedeutung identifizierter Prolinhydroxylierungen im ChREBP mittels zielgerichteter Mutagenese zu untersuchen.

2 Material

2.1 Chemikalien und Substanzen

Chemikalie/Substanzen	Hersteller
0,9%ige Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
10x Reaktionspuffer (PCR)	Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
2x Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX)	Roche (Mannheim, D)
2x Master Mix for SYBR® Assay ROX	Eurogentec (Köln, D)
30%iges Acrylamid/Bis	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
BES	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
BSA	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Calciumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Chloroform	Merck KGaA (Darmstadt, D)
DAPI	Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)

dNTP Mix	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
EGTA	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Entwicklerlösung	Agfa HealthCare NV (Mortsel, B)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Fast Digest Buffer (10x)	Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Fixierlösung	Agfa HealthCare NV (Mortsel, B)
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Glycerol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Hämalaun-Lösung	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Hydromount	Scientific Laboratory Supplies Limited (Nottingham, UK)
Insulin (Insuman rapid)	Sanofi-Aventis GmbH (Frankfurt/Main, D)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ketavet 100 mg/ml (Ketamin)	Pfizer (Berlin, D)
Magnesiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)

MgCl ₂ (PCR)	Invitrogen [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Milchpulver, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
M-MLV Reaktionspuffer (5x)	Promega GmbH (Mannheim, D)
Mowiol [®] 4-88	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
NEB Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt M., D)
Nonidet [™] P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer (5x)	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
<i>Oil-Red-O</i> Farbstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (PhosSTOP EASY pack)	Roche (Mannheim, D)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-frei	Roche (Mannheim, D)
QIAzol Lysis Reagenz	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
Random Hexamer Primers	Invitrogen [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)

RNase/DNase freies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Rompun 2 % (Xylazin)	Bayer (Leverkusen, D)
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Spermidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Tris-HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Tween [®] 20	Merck KGaA (Darmstadt, D)

2.2 Zellkultur

Substanzen	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
EBSS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
FBS	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
HBSS	Biochrom AG (Berlin, D)
Human Insulin Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
humanes Transferrin, Holo	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
Kollagenase (Type 1)	Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, USA)
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Lipofectamine [®] 2000 Transfection Reagent	Invitrogen [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Opti-MEM [®] Reduced Serum Medium	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
PBS (pH = 7,2 (-CaCl ₂ , -MgCl ₂))	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG (Berlin, D)
Percoll-Lösung	Biochrom AG (Berlin, D)
Selenium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
Trypsin/EDTA	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)

2.3 Medien

Medium	Hersteller
DMEM (+ 4,5 g/l Glukose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
DMEM (- Glukose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
DMEM/F12	Gibco [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)

2.4 Puffer

Für die Herstellung folgender Puffer wurde, wenn nicht anders angegeben, ausschließlich Reinstwasser verwendet.

Puffer	Konzentration	Chemikalie
0,2x SSC Puffer	0,1 % [v/v]	SDS in 0,2x SSC Puffer
20x SSC Puffer (pH = 7,0 – 8,0)	3 M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat
2x BBS-Puffer (pH = 6,9 – 7,0)	50 mM 280 mM 1,5 mM 75 mM 75 mM	BES NaCl Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
2x SSC Puffer	0,1 % [v/v]	SDS in 2x SSC Puffer
Elektrophoresepuffer (pH = 8,3 – 8,8)	25 mM 192 mM 0,1 % [w/v]	Tris-Base Glycin SDS
Hybridisierungspuffer	0,25 M 1 mM 20 % [v/v]	Natrium-Phosphat-Puffer EDTA (pH = 8,0) SDS
kollagenasehaltiger Puffer	52552 u/ml	Kollagenase in HBSS

MATERIAL

Lysepuffer	10 mM	Tris-HCL (pH = 7,5)
	10 mM	NaCl
	10 mM	EDTA (pH = 8,0)
	0,5 % [v/v]	SDS
Natrium-Phosphat-Puffer (pH = 7,2)	342 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	158 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
Perfusionspuffer	50 mM	EGTA (pH = 8,0) in EBSS
Proteinlysepuffer (V = 50 ml)	50 mM	Tris-HCL (pH = 7,2)
	150 mM	NaCl
	100 mM	EDTA (pH = 8,0)
	50 mM	NaF
	0,1 % [v/v]	SDS
	0,5 % [w/v]	Natriumdesoxycholat
	1 % [v/v]	Nonidet™ P-40
	1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-frei
RSB-150 (V = 50 ml)	10 mM	Tris-HCL (pH = 7,4)
	150 mM	NaCl
	2,5 mM	MgCl ₂
	0,1 % [v/v]	Triton X-100
	5 Tabletten	Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (PhosSTOP EASY pack)
	1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-frei

<i>Tailcut</i> -Puffer	0,1 M	Tris-HCL (pH = 8,5)
	0,2 M	NaCl
	5 mM	EDTA (pH = 8,0)
	0,2 % [v/v]	SDS
TBS-Puffer (pH = 7,6)	20 mM	Tris-Base
	137 mM	NaCl
Transferpuffer (pH = 9,0 – 9,4)	48 mM	Tris-Base
	39 mM	Glycin
	25 % [v/v]	Methanol
	0,0375 % [v/v]	SDS

2.5 Lösungen

Für die Herstellung folgender Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, ausschließlich Reinstwasser verwendet.

Lösung	Konzentration	Chemikalie
APS	10 % [w/v]	APS
Blocklösung (Fluoreszenzmikroskopie)	3 % [w/v]	BSA
	0,02 % [v/v]	Tween [®] 20 in PBS
Blocklösung (Western Blot Analyse)	4 % [w/v]	Milchpulver in TBS/TBS-T-Puffer (1:1)
CaCl ₂ -Lösung (steril)	240 mM	CaCl ₂
Denaturierungslösung	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl

Depurinisierungslösung	0,25 M	HCL
Eindeckmedium	14 % [w/v]	Glycerol
	5,5 % [w/v]	Mowiol® 4-88
	200 mM	Tris-HCL (pH = 8,5)
Neutralisationslösung	0,5 M	Tris (pH = 7,5)
	1,5 M	NaCl
<i>Oil-Red-O</i> Färbelösung	0,5 % [w/v]	<i>Oil-Red-O</i> Farbstoff in 60%igen Isopropanol
Paraformaldehydlösung	4 % [w/v]	Paraformaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung	0,5 % [v/v]	Triton X-100 in PBS
Transformationsmix (steril)	500 mM	KCL
	150 mM	CaCl ₂
	250 mM	MgCl ₂

2.6 Kits

Kit	Hersteller
Adeno-X rapid titer Kit	Clontech (CA, USA)
Dual-Luziferase Reporter Assay System	Promega (Madison, USA)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, D)
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, D)

peqGold Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
pGEM [®] -T Easy Vector Systems	Promega (Madison, USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Agilent Technologies (CA, USA)
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
Quik Change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (CA, USA)
RNeasy [®] Mini Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, D)

2.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
EcoRV	New England Biolabs GmbH (Frankfurt M., D)
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH (Mannheim, D)
Proteinase K	Roche (Mannheim, D)
PstI	New England Biolabs GmbH (Frankfurt M., D)
RNase	Roche (Mannheim, D)
Taq-Polymerase	Invitrogen [®] Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)

2.8 Molekulargewichtsmarker

Molekulargewichtsmarker	Hersteller
100 bp DNA Ladder	Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
ProSieve® Color Protein Marker	Lonza Rockland, Inc. (Rockland, USA)

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

Folgende Primärantikörper wurden in der angegebenen Konzentration für Western Blot (WB) Analysen oder konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (FM) verwendet.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Akt	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Inc., #9272 (Danvers, USA)
ChREBP	1:1000 (WB) 1:300 (FM)	Novus Biologicals, NB400-135 (Lot Q-1) (Cambridge, UK)
EGLN3	1:1000 (WB)	Novus Biologicals, NB100-139 (Cambridge, UK)
Gapdh	1:2500 (WB)	Cell Signaling Technology, Inc., #2118 (Danvers, USA)
Hydroxyprolin	1:500 (WB)	Abcam, ab37067 (Cambridge, UK)
Phospho-Akt ^{S473}	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Inc., #4060 (Danvers, USA)

RAN	1:2500 (WB)	BD Bioscience, (BD 610340) (Heidelberg, D)
RetSat	1:1000 (WB) 1:300 (FM)	eigene Herstellung [14] bzw. für Abbildung 10A [10]

2.9.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti-Mouse, HRP-Konjugat	1:5000	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA) #31430
anti-Rabbit, HRP-Konjugat	1:5000	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA) #31460

2.10 Fluorochrome

Fluoreszenzfarbstoffe	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 555	1:600	Invitrogen®Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
DAPI	1:2000	Invitrogen®Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)

2.11 Plasmide

Konstrukt	Vektor	Herkunft
ACC1-ChoRE-luc	pGL3	Prof. Dr. Howard C. Towle, Universität von Minnesota (Minneapolis, USA)
ChREBP-P141A	pCMV4 (Flag)	Arbeitsgruppe Schupp
ChREBP-P536A	pCMV4 (Flag)	Arbeitsgruppe Schupp
ChREBP-Wildtyp	pCMV4 (Flag)	Prof. Dr. Catherine Postic Institut Cochin (Paris, F)
ChREBP-P141,536A	pCMV4 (Flag)	Arbeitsgruppe Schupp
Leervektor (empty)	pMSCV	Addgene #K1062-1 (Cambridge, USA)
MIX γ	pCMV4	Prof. Dr. Howard C. Towle, Universität von Minnesota (Minneapolis, USA)
Renilla	pRL-CMV	Promega GmbH (Mannheim, D)

2.12 Oligonukleotide

Sofern nicht anders angegeben wurden die verwendeten Oligonukleotide mit der online Software Primer 3 entworfen (<https://biotools.umassmed.edu/primer3>) und gegen das gesamte Organismusgenom geblastet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), um die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten auszuschließen. Die Oligonukleotide wurden durch die Firma Invitrogen[®] Life Technologies GmbH synthetisiert und über die SMB Services in Molecular Biology GmbH bezogen.

2.12.1 siRNA

Die verwendeten siRNAs wurden von der Firma Eurogentec Deutschland GmbH (Köln, D) bezogen und sind im Folgenden mit ihren Sequenzen dargestellt.

Name	Sequenz 5' → 3'
Kontroll siRNA	UAG-CGA-CUA-AAC-ACA-UCA-AUU
RetSat siRNA	UCA-GCC-GAG-UAC-CAG-AGA-AUU

2.12.2 shRNA (Zielsequenz)

Name	Sequenz 5' → 3'
βGal	CTACACAAATCAGCGATTT
RetSat	TCAGCCGAGTACCAGAGAA

2.12.3 Primer für qRT-PCR

Gen	Spezies	Primer	Sequenz 5' → 3'
<i>36B4</i>	Maus	<i>Forward</i>	TCATCCAGCAGGTGTTTGACA
		<i>Reverse</i>	GGCACCGAGGCAACAGTT
<i>ACC1</i>	human	<i>Forward</i>	ACCACCTACGGATAGACCGC
		<i>Reverse</i>	TCGCTTTGGGGAAATAAAGTG
<i>ChREBP</i>	Maus	<i>Forward</i>	CAGCCCAGCCTAGATGACTT
		<i>Reverse</i>	CAAAGCTGGGGGACTCTATG
<i>HPRT</i>	human	<i>Forward</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA
		<i>Reverse</i>	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

<i>PKLR</i>	human	<i>Forward</i>	GCCTACTGGACATTGACTCCGA
		<i>Reverse</i>	TCATCCCGGCCTTGATCAT
<i>RetSat</i>	Maus	<i>Forward</i>	CCCATCAAGCAAGGATCCAA
		<i>Reverse</i>	ATGGGTACCAGCGCAGTCA
<i>RETSAT1</i>	human	<i>Forward</i>	CAGGACTGTTCAACACCTATGAACA
		<i>Reverse</i>	CCCCAGTTGCTGCTTCACA
<i>RETSAT2</i>	human	<i>Forward</i>	GGATGTGGTGGTAATTGGCAGT
		<i>Reverse</i>	CCCCTGCCTTGGTATGTTGTT
<i>Txnip</i>	Maus	<i>Forward</i>	GGTCTCAGCAGTGCAAACAG
		<i>Reverse</i>	GGCCTCATGATCACCATCTC

2.12.4 Primer für Generierung der Hybridisierungssonden

Sonde	Spezies	Primer	Sequenz 5' → 3'
3' Sonde	Maus	<i>Forward</i>	AAGAGTCCCACAGTCCCTTG
		<i>Reverse</i>	CATGGGTCACTGCTTTTGCT
5' Sonde	Maus	<i>Forward</i>	AGTCACCAGGAGAGACAAGC
		<i>Reverse</i>	GGTCTGTTTCTGGCCACAAC

2.12.5 Mutagenese-Primer

Die nachfolgenden Mutagenese-Primer wurden über die Onlineplattform der Firma Agilent (www.agilent.com/genomics/qcpd) entworfen. Die Substitution ist in fett und das resultierende Basentriplett für Alanin unterstrichen dargestellt.

Gen	Spezies	Primer	Sequenz 5' → 3'
<i>ChREBP-P141A</i>	Maus	<i>Forward</i>	GCAACGGAGGAAGAG <u>GCC</u> AGTGTG TGGTTTC
		<i>Reverse</i>	CGTTGCCTCCTTCTC <u>CGG</u> TCACACAC CAAAG
<i>ChREBP-P536A</i>	Maus	<i>Forward</i>	GCCAGAGACAACAAC <u>GCCT</u> GTCTTA CACAGC
		<i>Reverse</i>	CGGTCTCTGTTGTTG <u>CGG</u> ACAGAA GTGTCG

2.12.6 Genotypisierungsprimer

PCR	Primer	Annealing T.	Sequenz 5' → 3'
Flp	<i>Forward</i>	55 °C	GTCACTGCAGTTTAAATACAAGACG
	<i>Reverse</i>		GTTGCGCTAAAGAAGTATATGTGCC
loxP1	<i>Forward</i>	55 °C	CGAAAGGAGTTCCCATGTA
	<i>Reverse</i>		GACCAGGATGTTTGAAGGA
loxP2	<i>Forward</i>	59,5 °C	CTCCTTTTCTGAGGCTGGTG
	<i>Reverse</i>		AAGGCAGACCTTTCTTTTAAGG
Neo	<i>Forward</i>	55 °C	AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCT CCTG
	<i>Reverse</i>		CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGT TCTT
Nnt Exon 6	<i>Forward</i>	58 °C	GGGTTTCGATTGCTGTCATT
	<i>Reverse</i>		AGTCAGCAGCACTCCTCCAT

Nnt Exon 9	<i>Forward</i>	58 °C	CCAGCATGCACTCTCTTCTG
	<i>Reverse</i>		TGGTCTCCAAGTGCACAGAG

2.12.7 Sequenzierungsprimer

Plasmid-DNA	Spezies	Primersequenz 5' → 3'
ChREBP-P141A	Maus	TTCAAAGGCCTCAAGTTGCT
ChREBP-P536A	Maus	GGGACAAAAAGCAAGTCCAC

2.13 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
AML12	ATCC [®] -CRL2254, LGC Standards GmbH (Wesel, D)
HEK293 (BOSC23)	ATCC [®] -CRL-11270, LGC Standards GmbH (Wesel, D)

2.14 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E.coli</i> XL10-Gold	Tet ^r Δ (mcrA)183Δ (mcrCB-hsd SMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F proAB lacIZ Δ M15 Tn10 (Tet ^r)Amy Cam ^r]	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA)
<i>E.coli</i> XL1-blue	[F'xTn10proA+B+lacIq(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96(Nal ^r)thi hsdR17(rKmK+) supE44relA1 lac]	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA)

2.15 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Innerhalb dieser Arbeit wurden männliche C57Bl/6J-Mäuse für die Isolation primärer Maushepatozyten sowie für die hepatische RetSat-Depletion mittels adenoviralem Gentransfers verwendet. Dieser Mausstamm wurde aus der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin bezogen. Die transgenen RetSat-Mäuse (*knockout-first* bzw. konditionales Allel) stammten ebenfalls aus der FEM-Tierhaltung. Die Flp-rekombinante Maus wurde von Dr. Gregory Wulczyn zur Verfügung gestellt.

Die Haltung der Mäuse während des Tierversuchs erfolgte in der Tierhaltung des *Centers for Cardiovascular Research* (CCR) der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die Tierhaltung ist spezifisch pathogenfrei. Die Mäuse wurden bei Standardhaltung (Raumtemperatur 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 ± 15 % und 12 h Tag-Nacht-Rhythmus) zu sechs bis acht Tieren in individuell ventilierten Käfigen (IVC-System) des Typs III untergebracht. Die Käfige enthielten ein rotes Häuschen, Zellstoff als Nist- und Holzstiele als Nagematerial. Die Mäuse wurden zweimal wöchentlich umgesetzt (Einstreu: FS14/Fichte der Firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, D) und erhielten, wenn nicht anders angegeben, das Alleinfuttermittel der Firma sniff Spezialdiäten (Kapitel 2.16) und Wasser *ad libitum*. Alle Tierversuche wurden beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter den Nummern G0100/11 und G0130/17, die Organentnahme unter O 0354/10 genehmigt.

2.16 Diäten

Diät	Hersteller
Hochfettdiät mit hohem Zuckeranteil (HFD/HS), D12492	Research Diets Inc. (New Brunswick, USA)
Normaldiät (ND), V 1534-0	sniff Spezialdiäten GmbH (Soest, D)

2.17 Adenoviren

Virus	Titer [ifu/ml] bzw. Volumen
Adeno EGLN3 (DsRed) Lysate	0,2 µl/6-well
Adeno GFP	2,27 x 10 ¹⁰
Adeno GFP ChREBP Lysat	0,1 µl/12-well
Adeno U6.sh.mRetSat	1,20 x 10 ¹¹
Adeno U6.sh.βGAL	6,50 x 10 ¹⁰

2.18 Adeno-assoziierte-Viren (AAV)

Virus	Titer [Genompartikel/ml]
AAV2/8-LP1 Cre	1,57 x 10 ¹¹
AAV2/8-LP1 cGFP	2,0 x 10 ¹¹

2.19 ausgewählte Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
CONTOUR® NEXT/ +Sensoren	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, D)
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Medical X-Ray Film 100 NIF 18 x 24	Fujifilm (Düsseldorf, D)
Nylon-Siebgewebe (250 µm Maschenweite)	Klein & Wieler oHG (Königswinter, D)
PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)

2.20 Software

Software	Verwendung	Hersteller
CFX™ Manager, Software Version 3.1	Durchführung/Auswertung qRT-PCR	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
GraphPad PRISM® 5	Abbildungen/statistische Auswertung	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Image Lab™	Proteindetektion/ Quantifizierung Western Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Invitrogen Spectral Viewer	Absorption/Emission der Fluorophore	Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Leica TCS SP5 LAS AF	Aufnahme konfokaler Fluoreszenzbilder	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar; D)
MikroWin 2000	Luziferase Assay	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
MS Office 2016	Datenbearbeitung/ Darstellung	Microsoft D. GmbH (Unterschleißheim, D)
ImageJ 1.45s	Hintergrundsubtraktion und Quantifizierung konfokaler Fluoreszenzmikroskopie	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
ND-1000, Version 3.5.2	RNA- und DNA- Quantifizierung	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
Microplate Manager™ 6, 6.3	Protein-Quantifizierung	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Nicht aufgeführte molekularbiologische Standardtechniken, wie Agarosegelelektrophoresen und die Reinigung bzw. Präzipitation von Nukleinsäuren, wurden nach Standardprotokollen durchgeführt [73]. Restriktionsanalysen erfolgten nach Herstellerangaben der verwendeten Enzyme.

3.1.1 RNA-Isolation aus kultivierten Zellen

Zur RNA-Isolation wurde das peqGold Total RNA Kit der Firma PEQLAB, gemäß den Angaben des Herstellers, verwendet. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl RNase/DNase freiem Wasser. Anschließend wurde die RNA-Konzentration über eine spektralphotometrische Messung ermittelt und die RNA bei -80 °C gelagert.

3.1.2 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Zur RNA-Isolation aus Lebergewebe wurde ein QIAzol Lysis Reagenz in Kombination mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet.

Hierfür wurde circa 50 mg Lebergewebe mit einem Homogenisator mechanisch in 500 µl QIAzol Lysis Reagenz vollständig zerkleinert. Anschließend wurde die Probe auf ein Volumen von 1 ml QIAzol Lysis Reagenz aufgefüllt und gut gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde 1/5 Volumen Chloroform hinzugegeben und die Probe für 15 s stark gevortext. Nach einem weiteren Inkubationsschritt von 3 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Durch die Phasentrennung konnte die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen 70%igen Ethanol gut gemischt werden. Das Gemisch wurde anschließend auf die RNeasy® Mini Kit Säule gegeben. Die folgende Isolation der RNA wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte in 50 µl RNase/DNase freiem Wasser. Analog zur RNA-Isolation aus kultivierten Zellen wurde die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt und die Proben bei -80 °C gelagert.

3.1.3 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde 1 µg der isolierten RNA in cDNA umgeschrieben [74, 75]. Hierfür wurde die RNA mit 0,25 µg Random Hexamer Primer gemischt und auf ein Volumen von 15 µl mit RNase/DNase freiem Wasser aufgefüllt. Zur RNA-Denaturierung wurden die Proben für 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Durch Zugabe eines Mastermix (Tabelle 1) und folgender Inkubation bei 37 °C wurde die cDNA-Synthese initiiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde die cDNA kurzfristig bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung des cDNA-Mastermix

Reagenzien	Volumen [µl]	Endkonzentration
5x M-MLV Reaktionspuffer	5	1x
dNTP Mix [10 mM]	1,25	0,5 mM je dNTP
M-MLV Reverse Transkriptase [200 u/µl]	1	200 u
RNase/DNase freies Wasser	2,75	
Gesamtvolumen	10	

3.1.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur Messung der Genexpression wurde die qRT-PCR verwendet, die eine quantitative Einschätzung der synthetisierten cDNA (Kapitel 3.1.3) ermöglicht [76].

Hierfür wurde die synthetisierte cDNA zunächst im Verhältnis 1:10 mit RNase/DNase freiem Wasser verdünnt. Der Reaktionsansatz der qRT-PCR setzte sich aus 5 µl verdünnter cDNA und 10 µl Mastermix (Tabelle 2) zusammen. Der Mastermix enthielt den interkalierenden DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green der Firma Roche. Mittels Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunimmt, konnte die Menge einer vorhandenen Nukleotidsequenz bestimmt werden. Die Messung erfolgte im CFX Connect™ Real-Time System der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH. Das verwendete Temperaturprogramm für alle Gene ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Nach der qRT-PCR erfolgte eine

Schmelzkurvenanalyse für jedes Gen. Die Effizienz der Amplifikation wurde mit Hilfe einer Standardkurve (cDNA-Verdünnungsreihe: 100 %, 10 %, 1 % und 0,1 %) ermittelt und die mRNA-Menge der Proben berechnet. Dabei wurde die Genexpression auf ein stabil exprimiertes Gen (*housekeeping gene*), meist auf das murine *ribosomal protein, large, P0 (36B4)* bzw. auf das humane *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)* normalisiert. Die verwendeten Primer sind dem Kapitel 2.12.3 zu entnehmen.

Tabelle 2: Zusammensetzung des qRT-PCR-Mastermix

Reagenzien	Volumen [μ l]	Endkonzentration
<i>Forward Primer</i> [5 μ M]	0,3	200 nM
<i>Reverse Primer</i> [5 μ M]	0,3	200 nM
2x Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX)	7,5	1x
RNase/DNase freies Wasser	1,9	
Gesamtvolumen	10	

Tabelle 3: Temperaturprogramm der qRT-PCR

qRT-PCR-Programm	T. [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklen
1. Aktivierung der Polymerase	95	10 min	1
2. Denaturierung der DNA- Primerhybridisierung und -Amplifikation	95 60	15 s 1 min	40
3. Schmelzkurve in 0,5 $^{\circ}$ C Schritten	95 60 \rightarrow 95	30 s 30 s	1

3.1.5 Zielgerichtete Mutagenese

Um den Einfluss der identifizierten Prolinhydroxylierung an Position 141 und 536 auf die ChREBP-Aktivität und -Proteinstabilität zu untersuchen, wurden die ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und die Doppelmutante P141,536A) generiert. Bei diesen Mutanten wurden

die Proline (P) an Position 141 und/oder 536 im ChREBP durch ein Alanin (A) ausgetauscht (Substitution).

Hierfür wurden Mutageneseprimer entworfen, die durch Austausch einer Nukleinbase zum Einbau der Aminosäure Alanin anstelle von Prolin führen. Die verwendeten Mutagenese-Primer sind dem Kapitel 2.12.5 zu entnehmen. Für die Generierung der ChREBP-Mutanten wurde das QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies nach Angaben des Herstellers verwendet. Als DNA-Vorlage für die Mutagenese-PCR diente das ChREBP-Wildtyp-Plasmid (Kapitel 2.11). Die Doppelmutante ChREBP-P141,536A wurde durch Kombination des ChREBP-P536A-Plasmids und den Mutagenese-Primern für ChREBP-P141A generiert.

3.1.6 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen

Die Transformation ermöglicht die Aufnahme von freier Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen und dient damit der Vervielfältigung der eingebrachten Plasmide [77]. Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden innerhalb dieser Arbeit zwei verschiedene Bakterienstämme (Kapitel 2.14) verwendet. Die kommerziell erhältlichen kompetenten *E.coli* XL10-Gold der Firma Agilent Technologies, im Rahmen der zielgerichteten Mutagenese, wurden nach Protokoll des Herstellers transformiert. Der *E.coli*-Stamm XL1-blue wurde im Labor durch eine Polyethylenglykol abhängige chemische Kompetenz hergestellt und transformiert [78].

Für die Transformation wurden 20 bis 100 ng Plasmid-DNA mit 100 µl chemisch kompetenten *E. coli* XL1-blue und einem Transformationsmix gemischt und zunächst für 20 min auf Eis inkubiert. Die verwendeten Plasmide sind im Kapitel 2.11 aufgelistet. Nach einem folgenden Inkubationsschritt von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Der Transformationsansatz wurde anschließend bei 37 °C unter leichtem Schütteln für 1 h inkubiert. Folgend wurden 150 µl Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (Amp) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Zu präparativen Zwecken wurden, die durch Transformation Amp-resistenten Einzelkolonien am nächsten Tag in 5 ml LB-Amp-Medium überführt und erneut bei 37 °C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert (Übernachtskultur).

3.1.7 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen

Zu analytischen Zwecken wurden 2 ml der Übernachtskultur für die Isolation der Plasmid-DNA eingesetzt. Hierfür wurde nach Herstellerangaben das NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG verwendet.

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde zunächst 1 ml der Übernachtskultur in 250 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37 °C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde anschließend das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.8 Isolation von genomischer DNA und Genotypisierung

Die zur Genotypisierung erforderliche genomische DNA wurde mittels einer Proteinase K-Verdau (0,6 mg/ml) in 100 µl *Tailcut*-Puffer aus den Schwanzbiopsien der Mäuse isoliert. Die Isolation der genomischen DNA aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) erfolgte analog in einem Lysepuffer.

Hierfür erfolgte der Verdau über Nacht bei 55 °C. Für die Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben am nächsten Morgen für 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei -20 °C abgekühlt. Nach einer Verdünnung von 1:5 der Proben mit TE-Puffer wurde die Probe direkt für die jeweilige Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Dabei wurde der folgende Standard-PCR-Ansatz (Tabelle 4) für alle Genotypisierungen verwendet, wobei die Primer je nach PCR variiert wurden. Die verwendeten Primer sind dem Kapitel 2.12.6 zu entnehmen. Zur Aktivierung der Hotstart-Polymerase (Platinum Taq) wurden die PCR-Proben für 2 min bei 94 °C im Thermocycler inkubiert. Daran schlossen sich 35 Zyklen bestehend aus jeweils 15 s bei 94 °C, 30 s bei der jeweiligen Annealing-Temperatur (Kapitel 2.12.6) und 1 min bei 72 °C an. Anschließend wurden die PCR-Proben für 5 min bei 72 °C inkubiert und auf 4 °C abgekühlt. Folgende Genotypisierungs-PCRs kamen im Rahmen der Generierung der neuen RetSat-Mauslinie (Kapitel 3.5) zur Anwendung.

Tabelle 4: Standard-PCR-Ansatz für Genotypisierung

Reagenzien	Volumen [μ l]	Endkonzentration
genomische DNA	1	-
10x Reaktionspuffer	2,5	1x
MgCl ₂	1	50 mM
dNTP Mix	0,5	0,2 mM
<i>Forward-Primer</i>	0,5	0,2 μ M
<i>Reverse-Primer</i>	0,5	0,2 μ M
Platinum Taq-Polymerase	0,1	0,02 u
ddH ₂ O	x	-
Gesamtvolumen	25	

loxP1 PCR:

Für die Genotypisierung der heterozygoten RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel wurden Primer generiert, dessen PCR-Fragment eine loxP-Stelle einschließt und damit den Wildtyp-*RetSat*-Genlocus um 34 Basenpaare (bp) expandiert. Damit ergeben sich zwei Bandenverteilungsmuster: Beim Vorliegen des Wildtyp-*RetSat*-Genlocus entsteht ein 461 bp, bei Heterozygotie ein 461 bp und ein 495 bp großes PCR-Fragment. Zusätzlich wurden die RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel auf das Vorhandensein der Neomycin(Neo)-Kassette mit einem PCR-Fragment von 468 bp getestet.

Flp und Neo PCR:

Um die Neo-Kassette zu entfernen wurde eine heterozygote RetSat-Maus mit *knockout-first* Allel mit einer Flp-rekombinanten Maus verpaart. Die Nachkommen wurden, zusätzlich zur loxP-Stelle, auf das Vorhandensein der Flp-Rekombinase (480 bp) und der Neo-Kassette (468 bp) überprüft. Für die anschließenden Rückkreuzungen (heterozygotes RetSat-Männchen

mit C57Bl/6J-Weibchen) wurden heterozygote RetSat-Mäuse mit Flp und resultierender fehlender Neo-Kassette verwendet (Abbildung 3: Tier 2 und 4).

Gelelektrophorese:

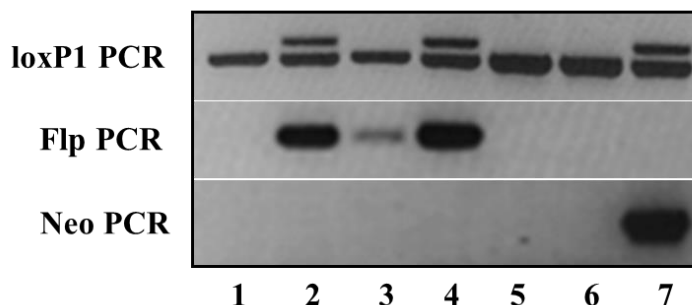


Abbildung 3: Bandenverteilungsmuster der heterozygoten RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel nach Verpaarung mit Flp-Maus: Gelelektrophorese der PCR-Analysen von genomischer DNA der Nachkommen heterozygoter RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel hinsichtlich Vorhandensein des RetSat flox-Konstruktes (LoxP1 PCR), der Flp-Rekombinase (Flp PCR) und der Neomycin-Kassette (Neo PCR). Jungtiere eins bis sieben.

loxP2 PCR:

Für die Genotypisierung der heterozygoten RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel wurden Primer verwendet, dessen PCR-Fragment den Wildtyp-*RetSat*-Genlocus um 123 bp expandiert. Die Expansion geht auf das Vorhandensein einer loxP-(34 bp), einer Frt-Stelle (34 bp) sowie auf die Insertion von weiteren 55 bp zurück. Somit ergeben sich drei mögliche Bandenverteilungsmuster: Beim Vorliegen des Wildtyp-*RetSat*-Genlocus entsteht ein 416 bp und bei Homozygotie ein 539 bp großes PCR-Fragment. Bei Heterozygotie erhält man beide PCR-Fragmente (Abbildung 4).

Gelelektrophorese:

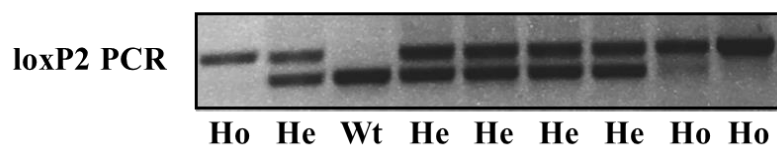


Abbildung 4: Bandenverteilungsmuster der heterozygoten RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel: Gelelektrophorese der PCR-Analyse von genomischer DNA der Nachkommen heterozygoter RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel hinsichtlich des Vorhandenseins des RetSat flox-Konstruktes (LoxP2 PCR). Ho = homozygot, Wt = Wildtyp und He = heterozygot.

Nnt (Exon 6 und Exon 9) PCRs:

Zur Überprüfung des genetischen Hintergrunds der heterozygoten RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel nach sechs Rückkreuzungen mit C57Bl/6J-Weibchen wurden Primer verwendet, die das Exon sechs (170 bp) bzw. das Exon neun (418 bp) des *nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt)*-Gens nachweisen [79]. Der C57Bl/6J-Hintergrund besitzt eine Mutation im *Nnt*-Gen, wodurch es zur einer Deletion des Exons sieben bis elf kommt [80]. Die ES-Zellen, die Blastozyste sowie die Flp-rekombinante Maus, die zur Generierung der RetSat-Mauslinie verwendet wurden, hatten hingegen den zu entfernenden 129S6/SvEvTac- bzw. C57Bl/6N-Hintergrund.

3.1.9 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von LGC Genomics GmbH mit den unter Kapitel 2.12.7 aufgeführten Primern durchgeführt.

3.1.10 Southern Blot Analyse

Mittels Southern Blot Analyse erfolgt der spezifische Nachweis einer DNA-Sequenz, mit Hilfe von markierten Sonden [81]. Damit konnte die korrekte einmalige Rekombination des *RetSat*-Transgens in den *RetSat*-Genlocus, nach Elektroporation der ES-Zellen mit dem RetSat flox-Konstrukt, nachgewiesen werden. Die Durchführung des Southern Blots erfolgte durch Diplom Ingenieur Matthias Münzner.

Hierfür wurde zunächst die genomische DNA aus den ES-Zellen mittels Proteinase K-Verdau isoliert (Kapitel 3.1.8). Nach anschließender Aufreinigung und Präzipitation wurde die genomische DNA direkt für die Southern Blot Analyse eingesetzt. Der Verdau der genomischen DNA ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Am nächsten Morgen wurde erneut 2 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (PstI bzw. EcoRV) hinzugegeben und die Proben für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor die verdaute DNA erneut aufgereinigt und präzipitiert wurde. Die verdauten DNA-Proben wurden mittels Gelelektrophorese über Nacht bei 30 Volt aufgetrennt. Um eine gute Effizienz des DNA-Transfers zu gewährleisten, musste das Agarosegel vor dem Blotten vorbehandelt werden. Zwischen den verschiedenen Inkubationsschritten wurde das Gel zweimal für 5 min mit ddH₂O gewaschen. Alle Schritte fanden dabei unter leichtem Schütteln

statt. Das Agarosegel wurde in einer Depurinisierungslösung für 10 min, in einer Denaturierungslösung für zweimal 20 min und in einer Neutralisationslösung für dreimal 30 min inkubiert. Anschließend folgte ein zehnminütiger Inkubationsschritt in 20x SSC Puffer.

Für den Kapillartransfer wurden zunächst die Membran und die Filterpapiere mit 1x SSC Puffer befeuchtet. Alle Einzelkomponenten wurden anschließend wie folgt zusammengebaut: Filterpapier-Agarosegel(Taschen nach unten)-Membran-Filterpapier-Papiertücher-Glasplatte-Gewicht. Dabei ragt das erste Filterpapier in ein 1x SSC Puffer Reservoir. Durch einen Flüssigkeitsstrom ausgehend aus dem Reservoir von unten durch das Gel, durch die Membran bis hin zu den trockenen Papiertüchern wird die DNA auf die Membran transferiert. Der Kapillarblot läuft bei 30 V über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Konstruktion abgebaut und die DNA auf der Membran mittels UV fixiert. Danach wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre überführt und rotierend für 1 h bei 65 °C in einem Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Erst danach kann die markierte Sonde hinzugegeben werden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Um die überschüssige Sonde zu entfernen wurde die Membran mit 2x SSC Puffer für 20 min und hinterher zweimal für 30 min mit 0,2x SSC Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte in einem Phosphoimager.

Tabelle 5: Verdau der genomischen DNA zur Southern Blot Analyse

Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
genomische DNA	5 – 10 µg	-
10x NEB Puffer	4	1x
PstI bzw. EcoRV	4	80 u
100x BSA	0,4	1x
Spermidin [0,1 M]	0,4	1 mM
RNase	0,2	≥ 0,003 u
RNase/DNase freies Wasser	x	-
Gesamtvolumen	40	-

Zum Nachweis des 5'- bzw. 3'-Arm des RetSat flox-Konstruktes (Abbildung 8) in murinen ES-Zellen wurden zwei Sonden mittels PCR generiert. Wichtig hierbei ist, dass die Sonden außerhalb der homologen Bereiche des RetSat flox-Konstruktes liegen. Die verwendeten PCR-Primer sind dem Kapitel 2.12.4 zu entnehmen. Die Amplifizierung der PCR-Fragmente erfolgte analog zum PCR-Ansatz der Genotypisierung (Tabelle 4), mit der Ausnahme, dass als Ausgangsmaterial 400 ng RetSat flox-Konstrukt verwendet wurde. Die PCR-Fragmente (5' Sonde: 416 bp, 3' Sonde: 414 bp) wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Hierfür wurde das Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Vervielfältigung der generierten Sonden in *E.coli*-Zellen erfolgte die Klonierung der PCR-Fragmente in einen Klonierungsvektor. Hierfür wurde das pGEM®-T Easy Vector Systems von Promega gemäß den Herstellerangaben verwendet. Nach Isolation der Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen (Kapitel 3.1.7) wurden die Sonden durch einen Restriktionsverdau (PstI bzw. EcoRV) aus dem Vektor geschnitten. Für die anschließende Markierung der Sonden wurde das Prime-It II Random Primer Labeling Kit der Firma Agilent Technologies nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Isolation von Gesamtproteinextrakten aus kultivierten Zellen

Zur Proteinisolation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend folgte die direkte Zugabe einer adäquaten Menge an Proteinlysepuffer in die Zellkulturplatte. Zur besseren Zelllyse wurden die Zellkulturplatten bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen der Proteinproben erfolgte eine Ultraschallbehandlung (fünf Einzelimpulse mit niedrigster Intensität). Anschließend wurde das Proteingemisch für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit dem gelösten Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteinproben erfolgte bei -80 °C.

3.2.2 Isolation von Gesamtproteinextrakten aus Lebergewebe

Zur Proteinisolation wurde circa 50 mg Lebergewebe in 500 µl eiskaltem Proteinlysepuffer mit Hilfe eines Mikro-Pistills homogenisiert und nachfolgend mit Ultraschall (fünf Einzelimpulse mit niedrigster Intensität) behandelt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten analog zur Gesamtproteinextraktion aus kultivierten Zellen (Kapitel 3.2.1).

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Quantifizierung des Proteingehalts der Gesamtproteinextrakte erfolgte mittels Bicinchoninsäure(BCA)-Reaktion [82]. Hierfür wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinproben sowie eine BSA-Standardverdünnungsreihe wurden in Doppelbestimmung gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Standardgeraden ermittelt.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE können Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Hierbei wird das SDS-haltige diskontinuierliche Puffersystem nach Laemmli verwendet [83].

Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele mit einer Stärke von 1,5 mm ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Zum Gießen der Polyacrylamid-Gele wurden Apparaturen, Glasplatten und Käme der Firma Bio-Rad verwendet. Abhängig vom jeweiligen Protein wurden 20 bis 50 µg Gesamtproteinextrakt mit einem Proteinladepuffer (87,5 µl Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer 5x und 12,5 µl 2-Mercaptoethanol) für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer der Firma Bio-Rad mit Elektrophoresepuffer. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 Volt im Sammelgel und 120 Volt im Trenngel. Zur Bestimmung der Proteingröße lief auf jedem Gel zusätzlich ein Proteingrößenmarker (ProSieve® Color Protein Marker) mit.

Tabelle 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Reagenzien	7,5 % Trenngel	10 % Trenngel	12 % Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	4,85 ml	4,1 ml	3,35 ml	3 ml
Tris-HCL [1,5 M, pH = 8,8]	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Tris-HCL [0,5 M, pH = 6,8]	-	-	-	1,25 ml
SDS Stammlösung [10 %]	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
Acrylamid/Bis [30 %]	2,5 ml	3,3 ml	4 ml	650 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml
APS [10 %]	75 µl	75 µl	75 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	6 µl

3.2.5 Western Blot Analyse

Im Western Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.2.4) auf eine Trägermembran übertragen und mittels Chemilumineszenz nachgewiesen [84].

Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran, unter Verwendung einer Nassblotkammer der Firma Bio-Rad in einem dafür hergestellten gekühltem Transferpuffer. Hierfür wurde zunächst die PVDF-Membran für 1 min in Methanol aktiviert und das Sammelgel vom SDS-Gel entfernt. Alle Einzelkomponenten des Transfers wurden anschließend wie folgt nach dem Sandwichprinzip zusammengebaut: Anode-Schwamm-Filterpapier-Membran-Gel-Filterpapier-Schwamm-Kathode. Bei einer Spannung von 80 Volt über 2 h bzw. 29 Volt über Nacht erfolgte der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran.

Nach dem Transfer wurde die Membran in einer Blocklösung für 90 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Primärantikörper wurde entsprechend seiner jeweiligen Verdünnung (Kapitel 2.9.1) mit Blocklösung verdünnt und mit der Membran für 90 min bei Raumtemperatur bzw. 4 °C über Nacht inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 10 min bei Raumtemperatur mit TBS-T-Puffer entfernt. Anschließend

folgte die Inkubation des Peroxidase-konjugierten-Sekundärantikörpers (Kapitel 2.9.2), in Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit Hilfe einer ECL Western Blotting Substrat Lösung der Firma Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers. Die Darstellung erfolgte mittels eines Röntgenfilms nach adäquater Expositionszeit von 30 s bis zu 2 h bzw. durch das digitale System ChemiDoc™. XRS+ der Firma Bio-Rad.

3.2.6 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) mittels kommerziell erhältlicher Anti-Flag-Agarose-Beads der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt.

Hierfür wurde in HEK293-Zellen Flag-markiertes Protein überexprimiert. Nach 48 h wurden die HEK293-Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zugabe einer adäquaten Menge des eiskalten Lysepuffers RSB-150 erfolgte direkt in die Zellkulturplatte. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen mittels Zellschaber vorsichtig von der Zellkulturplatte abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur besseren Lyse folgte eine dreimalige Ultraschallbehandlung (fünf Einzelimpulse mit niedrigster Intensität) mit einer Inkubationszeit von 2 min auf Eis zwischendurch. Anschließend wurden die Zellen erneut für 15 min auf Eis inkubiert, wobei die Proben im Abstand von 2 min für 5 s stark gevortext wurden. Das Proteingemisch wurde dann für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit dem gelösten Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte, wie im Kapitel 3.2.3, beschrieben.

Für die Co-IP wurde die maximale Proteinmenge, meist 750 bis 1000 µg Protein, eingesetzt und mit eiskaltem RSB-150 auf ein Volumen von 1 ml verdünnt. Für die Analyse via Western Blot wurde eine Input-Probe entnommen. Nach Zugabe von 40 µl einer 50%igen Lösung Anti-Flag-Agarose-Beads in RSB-150 wurden die IP-Proben für 2 h rotierend bei 4 °C inkubiert. Das Flag-markierte Protein wurde über Anti-Flag-Agarose-Beads präzipitiert. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Proteine durch Waschschriffe entfernt. Hierfür wurden die IP-Proben fünfmal 5 min mit 1 ml eiskaltem RSB-150 rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach jedem Waschschriff wurde der Überstand nach Zentrifugation, für 1 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur, verworfen und die IP-Probe mit frischem RSB-150 versetzt. Nach dem

letzten Waschschrift wurden die IP-Proben in 60 µl Proteinlysepuffer mit 1,5x Proteinladepuffer aufgenommen und die präzipitierten Flag-Proteine mit einschließlich ihren Interaktionspartnern bei -20 °C gelagert oder direkt mittels SDS-PAGE und Western Blot (Kapitel 3.2.4 und 3.2.5) analysiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung und Passagieren der HEK293- und AML12-Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

HEK293-Zellen wurden im Zellkulturmedium (DMEM Medium mit 10 % *fetales bovine serum* (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)) in 10 cm Zellkulturschalen bei 37 °C und 5%igen CO₂ kultiviert. Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die HEK293-Zellen weiterpassagiert. Zum Passagieren wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA und einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C lösten sich die adhären Zellen von dem Boden der Zellkulturschale. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und gut resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 1:7 mit Zellkulturmedium verdünnt und in eine neue 10 cm Zellkulturschale überführt. Je nach Verdopplungszeit der HEK293-Zellen wurde zwei- bis dreimal die Woche weiterpassagiert.

AML12-Zellen wurden im Zellkulturmedium (DMEM/F12 mit 10 % FBS, 1% P/S, 10 mg/ml Insulin, 50 mM Selenium, 12,5 µM Dexamethason und 2,75 mg Transferrin) ebenfalls in 10 cm Zellkulturschalen bei 37 °C und 5%igen CO₂ kultiviert. Das Passagieren erfolgte analog zu den HEK293-Zellen. Aufgrund einer geringeren Verdopplungszeit wurden die AML12-Zellen nur 1:4 mit Zellkulturmedium verdünnt und in eine neue Zellkulturschale überführt.

3.3.2 Isolation von primären Maushepatozyten

Für die Isolation von primären Maushepatozyten wurden männliche C57BL/6J-Mäuse im Alter von acht bis 16 Wochen verwendet. Mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin/Xylazin (Tabelle 7) wurden die Versuchstiere zunächst betäubt. Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte anhand des Zwischenzehenreflexes.

Tabelle 7: Injektionsnarkose zur Isolation von primären Maushepatozyten

Arzneistoff	Handelspräparat	Dosierung
Ketaminhydrochlorid	Ketavet® 100 mg/ml	80 mg/kg
Xylazinhydrochlorid	Rompun® 2 %	12 mg/kg

Bei ausreichender Narkosetiefe wurde die Abdominalgegend des Tieres großflächig geöffnet und die *Vena cava* und *Vena portae* gut sichtbar freigelegt. Mittels eines Venenkatheters erfolgte die Punktion der *Vena cava* in Richtung kranial. Es folgte die Perfusion der Leber (4 ml/min) mit einem vorgewärmten Perfusionspuffer (EBSS mit 50 mM EGTA). Sobald eine Farbveränderung der Leber von dunkelbraun-rot zu hellbraun-gelb sichtbar wurde, wurde die *Vena portae* durchtrennt. Die Perfusion wurde bis zum Erreichen einer absoluten Entfärbung der Leber fortgesetzt. Anschließend erfolgte der Verdau durch Perfusion (4 ml/min) mit einem kollagenasehaltigem Puffer (HBSS mit 52552 u/ml Kollagenase). Nach dem Verdau wurde die Leber entnommen, die Gallenblase entfernt und die Leber in eine 10 cm Kulturschale überführt.

Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Leber wurde schnellstmöglich in Zellkulturmedium (DMEM Medium mit 10 % FBS und 1% P/S) mit Zellschabern vorsichtig zerkleinert und durch ein Nylon-Sieb (250 µm Porenweite) gefiltert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 3 min bei 770 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 25 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Durch die Zugabe einer Percoll-Lösung und anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation (10 min, 770 rpm, Raumtemperatur) wurden tote Zellen entfernt. Das entstandene Zellpellet wurde mit 25 ml DMEM gewaschen (3 min, 770 rpm, Raumtemperatur) und anschließend in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl, mittels Trypanblau-Lösung und Neubauer-Zählkammer, wurden die primären Maushepatozyten mit einer Dichte von 80.000 Zellen in 12-well-Zellkulturplatten auf sterilen Deckgläsern (benötigt für konfokale Fluoreszenzmikroskopie) ausgesät. Nach etwa 6 h waren die Zellen adhärirt und das Zellkulturmedium wurde mit frischem Medium ersetzt. Die primären Maushepatozyten standen nun für Experimente zur Verfügung, wobei erfahrungsgemäß eine Lebensdauer von maximal vier bis fünf Tagen limitierend war.

3.3.3 Transfektion von HEK293-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Die Calcium-Phosphat-Präzipitation ermöglicht die Aufnahme von freier Plasmid-DNA in Form von Calcium-Phosphat-Präzipitaten, durch Endozytose, in die Zelle [85].

Für die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3, der Proteinstabilität der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und der Doppelmutante P141,536A) sowie der EGLN3-vermittelten Prolinhydroxylierung, wurde die Plasmid-DNA der zu über-exprimierenden Flag-markierten Proteine mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation in die Zelle geschleust.

Hierfür wurden die HEK293-Zellen in einer Verdünnung von 1:5 ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5%igen CO₂ inkubiert (Kapitel 3.3.1). Am nächsten Morgen wurde das Zellkulturmedium ersetzt. Für die Transfektionsansätze (Tabelle 8) wurde zu der Plasmid-DNA eine adäquate Menge an CaCl₂-Lösung hinzugegeben und gut gemischt. Darauf erfolgt die Zugabe einer adäquaten Menge an 2x BBS-Puffer. Die Transfektionsansätze wurden gevortext, anzentrifugiert und für genau 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionsansätze tropfenweise auf die Zellen pipettiert und über Nacht bei 37 °C und 5%igen CO₂ inkubiert. Nach 14 bis 18 h wurde das Zellkulturmedium ersetzt, um die Calcium-Präzipitate zu entfernen. Die Zellernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

Tabelle 8: Transfektionsansätze der Calcium-Phosphat-Präzipitation

Kulturschalen	Experiment	Plasmid-DNA [ng]	CaCl ₂ [µl]	2x BBS [µl]
6-well	IP	100	75	75
24-well	Proteinstabilität der ChREBP-Mutanten und EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierung	100	15	15

3.3.4 Transfektion von HEK293- und AML12-Zellen mittels Lipofektion

Mittels Lipofektion können Plasmide, eingeschlossen in Liposomen, über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Für die Lipofektion wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] 2000 der Firma Invitrogen[®] Life Technologies GmbH verwendet.

Für die Untersuchung der Aktivität der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und der Doppelmutante P141,536A) mittels Luziferase Assays in HEK293-Zellen (Kapitel 3.3.8) und der Analyse der ChREBP-Mutanten in einem ChREBP-defizientem System in AML12-Zellen, wurde die Transfektion von Plasmiden via Lipofektion durchgeführt.

Hierfür wurden die HEK293- und AML12-Zellen in einer Verdünnung von 1:3 in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5%igen CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium durch ein halbes Volumen frisches Zellkulturmedium (DMEM mit 25 mM Glukose, 10 % FBS und 1 % P/S) ersetzt. Für die Transfektion wurde zunächst in einem Reaktionsgefäß 2 µl Lipofectamin mit 23 µl Opti-Mem[®] Reduced Serum Medium verdünnt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde die entsprechende DNA-Menge mit 22 µl Opti-Mem[®] Reduced Serum Medium verdünnt. Die DNA-Menge für das Luziferase Assay ist dem Kapitel 3.3.8 zu entnehmen. Für die Analyse der ChREBP-Mutanten in AML12-Zellen wurden 100 ng Plasmid-DNA verwendet. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden beide vorbereiteten Lösungen gemischt und nochmals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionsansätze (45 µl) tropfenweise auf die Zellen gegeben. Am nächsten Morgen wurde das Zellkulturmedium (DMEM mit 2,5 mM Glukose, 10 % FBS und 1 % P/S) ersetzt. Nach 6 h wurden die Zellen in 2,5 mM bzw. 25 mM glukosehaltigem Zellkulturmedium (10 % FBS und 1 % P/S) für weitere 24 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

3.3.5 Transfektion von primären Maushepatozyten mit siRNA

Durch den Einsatz von *small interfering RNA* (siRNA) können über den Mechanismus der RNA Interferenz Zielgene in einer Zelle ausgeschaltet und deren Funktion untersucht werden [86, 87]. Für die Transfektion von primären Maushepatozyten mit siRNA wurde ebenfalls die Lipofektion mit Lipofectamine[®] 2000 der Firma Invitrogen[®] Life Technologies GmbH angewendet.

Hierfür wurde das Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FBS und 1 % P/S) 24 h nach Isolation der primären Maushepatozyten (Kapitel 3.3.2) zunächst gegen 500 μ l Zellkulturmedium (DMEM mit 2,5 mM Glukose, ohne FBS und P/S) ersetzt. Für ein 12-well wurde in einem Reaktionsgefäß 4 μ l Lipofectamine mit 46 μ l Opti-Mem[®] Reduced Serum Medium und in einem zweiten Reaktionsgefäß 1 nM siRNA mit 45 μ l Opti-Mem[®] Reduced Serum Medium verdünnt. Die verwendeten siRNAs sind dem Kapitel 2.12.1 zu entnehmen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten analog zur Transfektion von HEK293- und AML12-Zellen mittels Lipofectamin (Kapitel 3.3.4), mit der Ausnahme das 90 μ l Transfektionsansatz per 12-well auf die Zellen gegeben wurde. Am nächsten Morgen wurde das Zellkulturmedium (DMEM mit 2,5 mM Glukose, 10 % FBS und 1 % P/S) ersetzt. Am Abend erfolgte die Stimulation der Zellen in 2,5 mM oder 25 mM glukosehaltigem Zellkulturmedium (10 % FBS und 1 % P/S) mit 100 nM Insulin für weitere 24 h. Die Fixierung der Zellen für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 3.3.9) erfolgte 48 h nach der Transfektion.

3.3.6 Gentransfer durch Adenoviren *in vitro*

Neben der Transfektion von Plasmiden (Kapitel 3.3.3 und Kapitel 3.3.4) wurde der adenovirale Gentransfer ebenfalls als Methode zur Überexpression von Zielgenen verwendet. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Adenoviren des Serotyps fünf verwendet, welche im Kapitel 2.17 aufgelistet sind. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch Endozytose vermittelt vom Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) [88].

Die verwendeten Adenoviren waren bereits im Labor verfügbar. Der Titer wurde mit dem Adeno-X rapid titer Kit (Clontech) nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Als Kontrolle in den jeweiligen Experimenten diente Adenovirus GFP (grün-fluoreszierendes Protein).

3.3.6.1 Adenovirusinfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden über Nacht mit virushaltigem Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FBS und 1 % P/S) inkubiert. Die Dosierung der Adenoviren ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Am nächsten Morgen wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch virusfreies Zellkulturmedium ersetzt. Für die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3 wurde das Lysat Adeno EGLN3 (DsRed) verwendet. Dieses koexprimiert das rot-

fluoreszierende Protein (DsRed). In einem Dosisverlauf von Adeno EGLN3 und dem Kontrollvirus Adeno GFP wurde eine adäquate Menge dieses Lysates, anhand einer vergleichbaren Intensität der Fluoreszenzproteine (GFP bzw. DsRed), ermittelt. Die Zellernte erfolgte nach 48 h.

Tabelle 9: Dosierung der verwendeten Adenoviren in HEK293-Zellen

Virus	verwendeter Titer [ifu] bzw. Volumen [μl]
Adeno GFP	2,27 x 10 ⁵
Adeno EGLN3 (DsRed) Lysat	0,2

3.3.6.2 Adenovirusinfektion von primären Maushepatozyten

Primäre Maushepatozyten wurden, wie im Kapitel 3.3.2 beschrieben, isoliert und nach Anheftung an die Zellkulturplatte mit virushaltigem Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FBS und 1 % P/S) über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das virushaltige Zellkulturmedium verworfen und durch virusfreies Zellkulturmedium ersetzt. Für die Validierung des ChREBP-Antikörpers wurde das Adeno GFP ChREBP verwendet. Dieses koexprimiert das grünfluoreszierende Protein. Es wurde ebenfalls zu Beginn des Experimentes in einem Dosisverlauf die adäquate Menge an Lysat ermittelt, wobei das GFP-Fluoreszenzsignal des ChREBPs vergleichbar mit dem GFP des Kontrollvirus war. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet. Die nachfolgende Tabelle 10 zeigt die Dosierung der verwendeten Adenoviren.

Tabelle 10: Dosierung der verwendeten Adenoviren in primären Maushepatozyten

Virus	verwendeter Titer [ifu] bzw. Volumen [μl]
Adeno GFP	2,27 x 10 ⁴
Adeno GFP ChREBP Lysat	0,1

3.3.7 Lipidfärbung mit *Oil-Red O*

Der Nachweis von intrazellulären Triglyzeriden in der Leber erfolgte mittels einer *Oil-Red O* Färbelösung. Hierfür wurde die Leber über Nacht mit 4%igen Paraformaldehyd fixiert, bevor am Kryostat Gefrierdünnsschnitte angefertigt wurden. Für die Färbung wurden die Leberschnitte kurz in 60%igen Isopropanol gewaschen und anschließend für 10 min mit der *Oil-Red O* Färbelösung inkubiert. Nach erneutem kurzem Waschen mit 60%igen Isopropanol wurden die Leberschnitte für 1 min unter fließendem ddH₂O gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Zellkerne 12 min in Hämalaun-Lösung angefärbt und anschließend für 5 min unter fließendem ddH₂O gewaschen. Die Leberschnitte wurden mit Hydromount eingedeckelt und am Mikroskop innerhalb von wenigen Tagen analysiert.

3.3.8 Luziferase Assay

Unterschiede in der Aktivität der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und der Doppelmutante P141,536A) in HEK293-Zellen wurde mittels Luziferase[®] Reporter Assay System der Firma Promega untersucht.

Hierfür wurde das ACC1-Luziferase-Reporterplasmid verwendet. Dieses enthält zwei Kopien des ACC1-ChoRE sowie das Luziferase-Gen zur Expression der Firefly-Luziferase [89]. Durch Bindung von ChREBP an das ChoRE-Motiv wird das Enzym Luziferase exprimiert. Dabei ist die resultierende Luziferasemenge proportional zu einer entstehenden Lichtemission, die mittels Luminometer gemessen wurde. Das ACC1-Luziferase-Reporterplasmid wurde von Prof. Dr. Howard Towle vom Institut für Biochemie der Universität von Minnesota, Minneapolis, USA zur Verfügung gestellt.

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mittels Lipofektion (Kapitel 3.3.4). Die HEK293-Zellen wurden mit 100 ng einer ChREBP-Mutante (P141A, P536A oder der Doppelmutante P141, 536) und gleichzeitig mit 500 ng ACC1-Luziferase-Reporterplasmid, 4 ng Renilla und 125 ng MIX γ transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMSCV (500 ng). Nach Stimulation mit 2,5 mM oder 25 mM glukosehaltigem Medium (Kapitel 3.3.4) wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in 150 μ l Passiven-Lysepuffer geerntet. Anschließend wurden zwei Substratlösungen, die zur Aktivitätsbestimmung der Firefly- und Renilla-Luziferase, als interne Kontrolle der Zellzahl und Effizienz der Transfektion,

entsprechend den Anweisungen des Herstellers hergestellt und verwendet. Nach der Messung wurde der Quotient aus beiden Luziferasemessungen gebildet.

3.3.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der nukleären Anreicherung von ChREBP in RetSat-depletierten primären Maushepatozyten wurde endogenes ChREBP durch Immunfluoreszenz markiert und durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

Hierfür wurden primäre Maushepatozyten zunächst isoliert (Kapitel 3.3.2), mit siRNA transfiziert und mit 2,5 mM bzw. 25 mM glukosehaltigem Medium stimuliert (Kapitel 3.3.5). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit der Paraformaldehydlösung für 20 min auf Eis fixiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift mit PBS folgte die Inkubation der Zellen in einer Permeabilisierungslösung für 15 min bei Raumtemperatur. Dann wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und in einer Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper entsprechend seiner jeweiligen Verdünnung (Kapitel 2.9.1) mit Blocklösung über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 555) (Kapitel 2.10), verdünnt in 3%igen BSA in PBS, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten drei Waschriffe mit PBS sowie die Anfärbung der Nuklei, mittels DAPI-Inkubation (Kapitel 2.10) für 5 min bei Raumtemperatur. Nach erneuten Waschriffen mit PBS wurden die auf Deckgläsern befindlichen Zellen mit Eindeckmedium eingedeckelt.

Die Visualisierung der Fluoreszenz-gekoppelten Proteine (Alexa Fluor 555 und DAPI) erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanningmikroskop (Leica DM 2500) mit Festkörper-Laserlichtanregung (405 nm für DAPI und 532 nm für Alexa Fluor 555). Zur Vermeidung von Bildinformationsverlusten wurde die geringste Laserintensität verwendet, die für ein adäquates Signal-Rausch-Verhältnis notwendig ist. Die Ergebnisse wurden durch Fotoaufnahmen dokumentiert und anschließend mit Hilfe der Software ImageJ 1.45s bearbeitet (Hintergrundsubtraktion).

Die Quantifizierung der nukleären Fluoreszenzsignale von ChREBP erfolgte mittels ImageJ 1.45s. Für jeden diploiden Hepatozyten wurde zunächst der Mittelwert aus Intensitäten

von sechs zufällig gelegten optischen Feldern innerhalb der Nuklei ermittelt. Diese Analyse erfolgte für jede Bedingung in mindesten 15 Hepatozyten. Anschließend wurde der Gesamtmittelwert aus den 15 Mittelwerten je Bedingung ermittelt.

3.4 Tierversuche

3.4.1 Gentransfer durch Adenoviren *in vivo*

Die hepatische RetSat-Depletion in adipösen C57Bl/6J-Mäusen wurde durch den Einsatz von Adenoviren des Serotyps fünf erzeugt. Die Injektion der adenoviralen Partikel erfolgte über die Schwanzvene (Kapitel 3.4.3). Nach intravenöser Injektion erreichen die Adenoviren über die Portalvene die Leber. Adenoviren akkumulieren in der Leber (Hepatotropismus), um dort vermutlich von den Kupfferschen-Zellen abgebaut zu werden [90, 91].

Die hepatische Verminderung der RetSat-Expression erfolgte durch adenovirale Expression von RetSat *short hairpin* (sh)RNA (sh-RetSat). Die Verwendung von shRNA, Vorläufer der siRNA mit einer Haarnadelstruktur, erzeugt die Depletion des Zielgens ebenfalls über den Mechanismus der RNA-Interferenz [86]. Für die Kontrollgruppe wurde sh- β Gal verwendet. Dabei wurde eine Dosierung der Adenoviren (Kapitel 2.17) von $1,16 \times 10^{10}$ ifu pro Maus eingesetzt.

3.4.2 Gentransfer durch Adeno-assoziierte-Viren

Die Generierung einer RetSat-Deletion in homozygoten RetSat-Mäusen wurde mit Hilfe des Cre/loxP-System (Kapitel 3.5) umgesetzt. Die hierfür benötigte Expression der Rekombinase Cre wurde mittels Adeno-assoziiierter-Viren (AAV) des Serotyps 2/8 (Kapitel 2.18) vermittelt. Um eine hepatische Cre-Expression zu erhalten, wurde ein leberspezifischer Promotor (LP1) bei den AAVs verwendet. Dieser beinhaltet Teile der *hepatic control region*, des humanen Apolipoproteins E, dem humanen $\alpha 1$ -Antitrypsinpromotor und dem modifizierten SV40 Intron vom kleinen T-Antigen [92].

Zur Etablierung der adäquaten Virusmenge wurden drei Virusmengen von AAV Cre angewandt: $1,4 \times 10^9$, $4,5 \times 10^9$ und $1,4 \times 10^{10}$ Genompartikel/ml. Die Injektionsmenge der Kontrollmaus (AAV GFP) wurde ebenfalls den jeweiligen Genompartikeln angepasst. Die

Herstellung und Bestimmung der Genompartikel der AAVs erfolgte durch Privatdozent Dr. Stefan Weger aus dem Institut für Virologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

3.4.3 Intravenöse Virusapplikation über die Schwanzvene

Die Injektion der Adenoviren bzw. der AAVs erfolgte mit Hilfe von Prof. Dr. Michael Schupp in die Schwanzvene. Um die Schwanzvene besser sichtbar zu machen, wurde die Maus in einem Plastik-Restrainer immobilisiert und der Schwanz für circa 30 s in 42 °C warmen Wasser erwärmt. Anschließend wird der Schwanz mit Zellstoff getrocknet und ein Volumen von 250 µl (Adenoviren bzw. AAVs verdünnt mit 0,9%iger Kochsalzlösung) in die Schwanzvene injiziert. Nach Injektion wurden die Mäuse aus dem Restraimer befreit. Durch kurzzeitigen Druck auf die Vene wurde verhindert, dass injizierte Lösung oder Blut austreten. Die Mäuse wurden zurück in den Käfig gesetzt und täglich kontrolliert.

3.4.4 Versuchsablauf

3.4.4.1 Hepatische RetSat-Depletion in adipösen Mäusen

Für den Hauptversuch wurden sechs bis acht Wochen alte männliche C57Bl/6J-Mäuse verwendet. Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche, erfolgte die Gabe einer zwölfwöchigen Hochfettdiät mit hohem Zuckeranteil (HFD/HS) (Kapitel 2.16), um eine Diät-induzierte Adipositas sowie Insulinresistenz zu erzeugen [93, 94].

Für die Injektion der Adeno shRNA wurden insgesamt 16 männliche C57Bl/6J-Mäuse verwendet. Dabei erhielten sechs Mäuse Adeno sh-RetSat und zehn Mäuse Adeno sh-βGal. Nach vier Tagen erfolgte der intraperitoneale Glukosetoleranztest (Kapitel 3.4.7) und nach sieben Tagen der intraperitoneale Insulintoleranztest (Kapitel 3.4.8). Am neunten Tag wurde zur Analyse der hepatischen Insulinsensitivität (Kapitel 3.4.9) Insulin bzw. den Kontrolltieren 0,9%iges Natriumchlorid intraperitoneal verabreicht, bevor die Tiere getötet wurden (Abbildung 5). Die Organe wurden schnellstmöglich entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

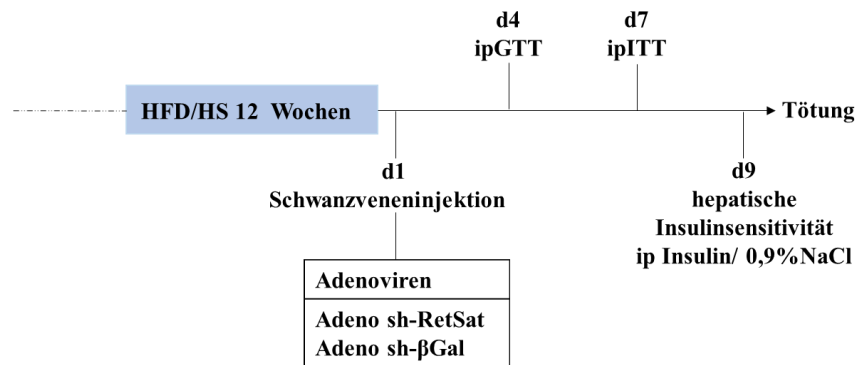


Abbildung 5: Ablauf der metabolischen Charakterisierung: C57Bl/6J-Mäuse erhielten für zwölf Wochen eine Hochfett- und Hochzuckerdiät (HFD/HS) bevor, mittels Schwanzveneninjektion von Adenoviren, die hepatische RetSat-Depletion (Adeno sh-RetSat) erfolgte. Die Kontrollgruppe erhielt Adeno sh-βGal. Nach vier Tagen erfolgte der intraperitoneale Glukosetoleranztest (ipGTT) und nach sieben Tagen der intraperitoneale Insulintoleranztest (ipITT). Am Tag der Tötung (Tag neun) wurde der Insulin-Signalweg durch intraperitoneale Gabe von Insulin bzw. 0,9%igen Natriumchlorid (NaCl) untersucht. d = Tag.

3.4.4.2 Hepatische RetSat-Deletion in RetSat-Mäusen

Zur Etablierung der benötigten Menge an AAV Cre, die für eine ausreichende RetSat-Deletion in der Leber notwendig ist, wurden acht bis zehn Wochen alte weibliche homozygote RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel (Kapitel 3.5) verwendet.

Nach einer Eingewöhnung von einer Woche wurde für jede AAV Cre- bzw. AAV GFP-Menge (Kapitel 3.4.2) eine Maus verwendet. Die Applikation der AVVs erfolgte ebenfalls über die Schwanzvene (Kapitel 3.4.3). Drei Wochen nach AAV-Injektion wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Bestimmung des Körpergewichts

Zur Erfassung des Körpergewichtes wurden die Mäuse mit Hilfe einer Schüssel auf einer Waage gewogen. Dabei wurde das Gewicht mit einer Genauigkeit von 0,1 g erfasst.

3.4.6 Bestimmung der Blutglukose

Die Blutglukose wurde mit dem Blutzuckermessgerät CONTOUR®NEXT und den CONTOUR®NEXT Sensoren bestimmt. Hierfür wurden die Tiere in einem Plastik-Restrainer immobilisiert und durch Punktion der Schwanzvene ein kleiner Blutropfen gewonnen.

3.4.7 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)

Für den ipGTT wurde den Tieren nach einer 16-stündigen Nüchternphase 0,5 g/kg Glukose, gelöst in 0,9%igen NaCl, intraperitoneal appliziert. Durch Entnahme von venösem Blut aus der Schwanzvene (Kapitel 3.4.6), unmittelbar vor Glukoseverabreichung (Zeitpunkt 0) sowie nach 15, 30, 60 und 120 min, wurde die Blutglukose bestimmt.

3.4.8 Intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT)

Am Tag sieben wurde mit denselben Mäusen ein ipITT durchgeführt. Hierfür wurde nach einer sechsstündigen Nüchternphase 0,75 U/kg Insulin (Insuman rapid, Sanofi), gelöst in 0,9%igem NaCl, intraperitoneal appliziert. Vor der Verabreichung (Zeitpunkt 0) sowie nach 30, 60 und 90 min, wurde Blut aus der Schwanzvene zur Glukosebestimmung gewonnen (Kapitel 3.4.6).

3.4.9 Hepatische Insulinsensitivität

Zur Analyse der hepatischen Insulinsensitivität am neunten Tag wurde nach einer 16-stündigen Nüchternzeit 1 U/Kg Insulin (Insuman rapid, Sanofi), gelöst in 0,9%igem NaCl, intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich 0,9%iges NaCl. Hierfür wurden für jede Versuchsgruppe je drei Tiere verwendet (Abbildung 6). Nach exakt 10 min wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und die Organe entnommen.



Abbildung 6: Einteilung der Versuchsgruppen zur Ermittlung der hepatischen Insulinsensitivität: Für die Induktion des Insulin-Signalweges wurde neun Tage nach der Virusinjektion (Adeno sh-RetSat bzw. Adeno sh-βGal) Insulin bzw. 0,9%iges Natriumchlorid intraperitoneal (ip) appliziert. Jede Versuchsgruppe bestand aus drei Mäusen.

3.5 Generierung einer neuen Mauslinie mit induzierbaren RetSat *knockout*

In Zusammenarbeit mit der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin in Steglitz (FEM), unter der Leitung von Dr. Geert Michel, wurde eine homozygote gefloخته RetSat-Mauslinie (RetSat flox/flox) generiert (Abbildung 7).

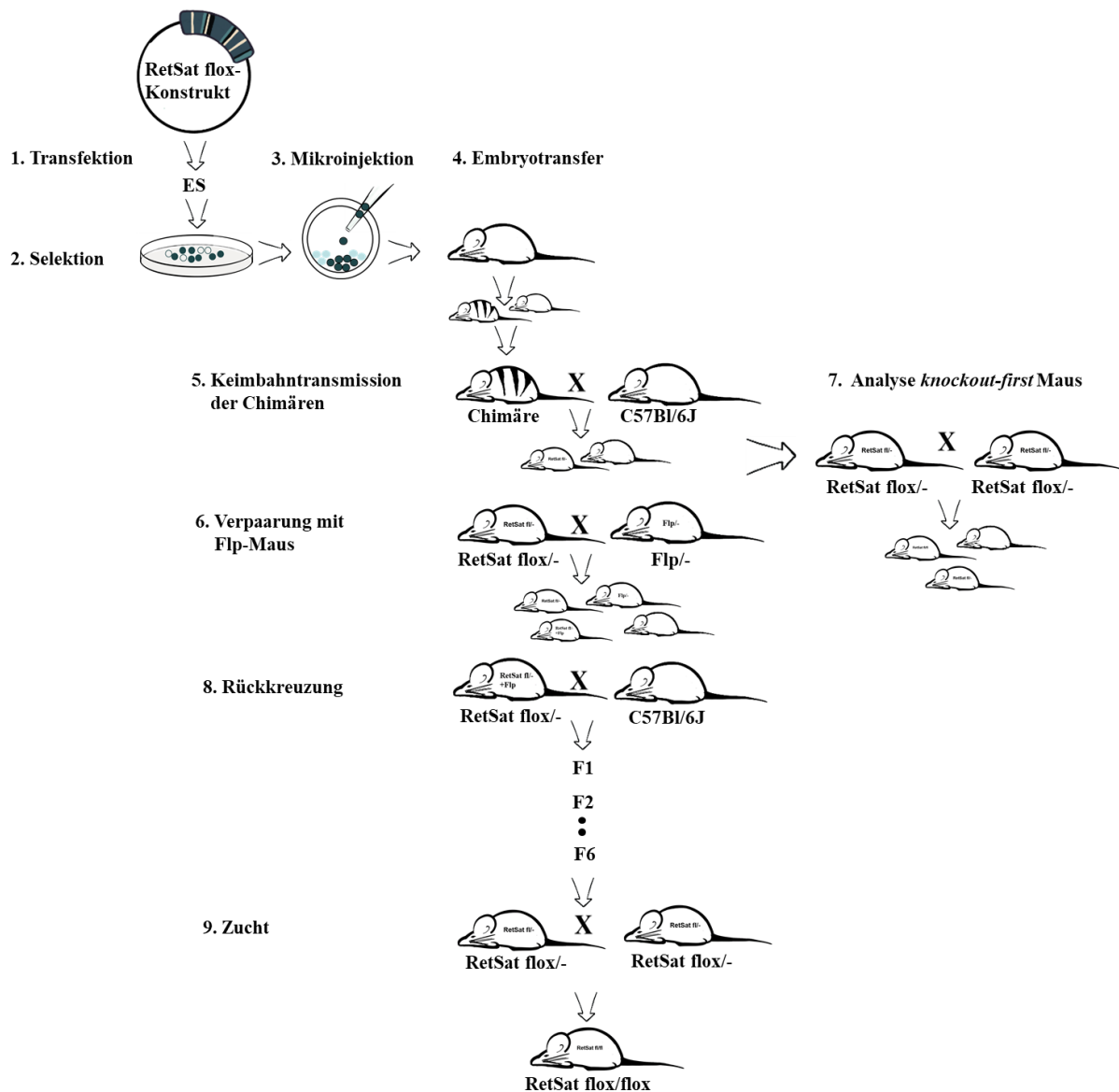


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung der RetSat flox/flox-Maus: Nach Transfektion von embryonalen Stammzellen (ES) mit dem RetSat flox-Konstrukt erfolgte die Selektion von positiven RetSat flox-ES-Zellen mittels Neomycin (Neo). Homolog rekombinierte ES-Zellen wurden in C57Bl/6N-Blastozysten injiziert und in pseudogravide C57Bl/6N-Mäuse transferiert. Nach Überprüfung der Chimären auf Keimbahntransmission erfolgte die Entfernung der Neo-Kassette, durch Verpaarung von heterozygoten RetSat-Mäusen (RetSat flox/-) mit *knockout-first* Mäusen mit einer heterozygoten FLP-rekombinanten-Mauslinie (FLP/-). Erhalt von homozygoten *knockout-first* Mäusen durch Verpaarung von RetSat flox/- mit *knockout-first* Allel untereinander. Zur Erreichung einer kongenen transgenen RetSat-Mauslinie erfolgten sechs Rückkreuzungen der RetSat flox/- mit konditionalem Allel mit C57Bl/6J-Mäusen. Etablierung einer homozygoten transgenen RetSat-Mauslinie (RetSat flox/flox) mit konditionalem Allel durch Verpaarungen von RetSat flox/- Mäusen untereinander.

Hierfür wurde im FEM das linearisierte RetSat flox-Konstrukt (*International Knockout Mouse Consortium* (ID: 27845)) mit pluripotenten murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (IDG 3.2 = C57Bl/6J x 129S6/SvEvTac/F1-Hybrid) elektroporiert. Für den gezielten Einbau des *RetSat*-Transgens besitzt das RetSat flox-Konstrukt auf beiden Seiten Sequenzhomologien zum Ziellokus (5'Arm und 3'Arm) (Abbildung 8). Mittels homologer Rekombination wurde das *RetSat*-Transgen zwischen den homologen Armen in den spezifischen *RetSat*-Genlocus integriert. Da das Ereignis der homologen Rekombination sehr selten ist und Zufallsintegrationen weit häufiger auftreten, wurden die ES-Zellklone vorselektiert. Hierfür besitzt das RetSat flox-Konstrukt einen innerhalb des homologen Bereichs liegenden positiven Selektionsmarker (Neomycin(Neo)-Kassette) sowie einen außerhalb liegenden negativen Selektionsmarker (Diphtherie-toxin A Fragment = DTA). Zellen bei denen Zufallsintegrationen stattfanden, sterben durch Expression des DTA. Bei der korrekten homologen Rekombination gehen die außerhalb der Sequenzhomologien liegenden Bereiche verloren, einschließlich des negativen Selektionsmarkers DTA. Anschließend erfolgte die Selektion positiver Zellklone mittels einem Neo-haltigen Kulturmedium. Durch Insertion der Neo-Kassette im RetSat flox-Konstrukt, als positiven Selektionsmarkers, überleben ES-Zellen mit integrierten *RetSat*-Transgen die Selektion (Abbildung 8).

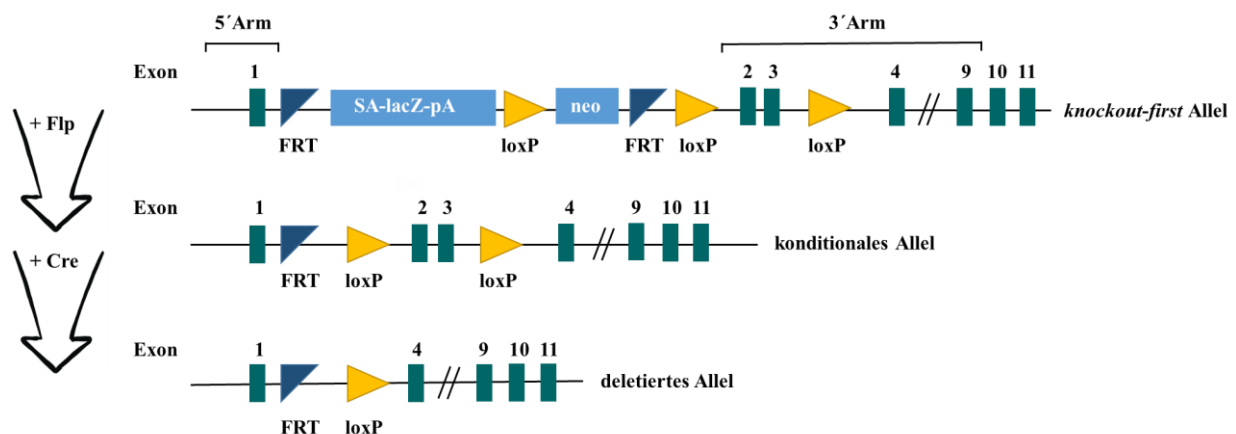


Abbildung 8: Schematische Darstellung des RetSat flox-Konstruktes: Das RetSat flox-Konstrukt besitzt auf beiden Seiten Sequenzhomologien zum Ziellokus (5'Arm (4294 bp) und 3'Arm (4740 bp)), die den gezielten Einbau des *RetSat*-Transgens ermöglichen. Das *RetSat*-Transgen (*knockout-first* Allel) enthält eine FRT-geflankte Selektionskassette (SA-LacZ-pA und neo) sowie die loxP-geflankten Exons zwei und drei der *RetSat*. Durch Expression der Rekombinase Flippase (Flp) wird die Selektionskassette entfernt und das konditionale Allel erzeugt. Das konditionale Allel ermöglicht durch Expression der Rekombinase Cre die Deletion der Exons zwei und drei der *RetSat* in zeitlicher und lokaler Begrenzung. SA = Spleiß-Akzeptor, pA = Polyadenylierungssignal, neo = Neomycin, // = Exons 5 bis 8.

Zur Bestätigung der korrekten einmaligen Rekombination des *RetSat*-Transgens in den *RetSat*-Genlocus erfolgte bei uns im Labor eine Southern Blot Analyse Neo-positiver Zellklone. Als transgen bestätigte Zellklone wurden am FEM in C57Bl/6N-Blastozysten injiziert und bis zu 15 Blastozysten in pseudogravide C57Bl/6N-Mäuse transferiert. Der Genotyp der verwendeten IDG 3.2 ES-Zellen ist männlich und dominant-heterozygot für die Fellfarbe *agouti*. Die Blastozysten wurden hingegen aus einem homozygoten *non-agouti*-Mausstamm gewonnen. *Agouti* steht hierbei für die dominante helle Fellfarbe. Dies ermöglicht die entstandenen Nachkommen anhand ihrer Fellfarbe, auf das Vorhandensein der Mutation hin, zu unterscheiden. Die Nachkommen mit *agouti*-Anteil werden als Chimären bezeichnet. Der Grad des Chimärismus wurde anhand der Fellfarbe von Mitarbeitern des FEM abgeschätzt. Dabei entsprach ein 100%iger Chimärismus beim Vorhandensein der Fellfarbe *agouti*, ein geringerer Chimärismus bei schwarz-*agouti* Färbung. Zur Überprüfung der männlichen Chimären auf Keimbahntransmission, d. h. die Weitergabe des *RetSat*-Transgens durch die Keimzellen an die Nachkommen, erfolgte eine Rückkreuzung mit weiblichen C57Bl/6J-Mäusen. Da die verwendeten ES-Zellen einen männlichen Karyotyp besitzen, wurden ausschließlich männliche Chimären für die Verpaarung mit C57Bl/6J-Mäusen verwendet. Weibliche Chimären sind häufig infertil und weisen keine Keimbahntransmission auf [95]. Der Genotyp aller nun folgenden Nachkommen wurde mittels Genotypisierungs-PCRs (Kapitel 3.1.8), der im FEM gewonnenen Schwanzbiopsien, bei uns im Labor bestimmt. Zur Entfernung der Neo-Kassette, die für die Selektion der ES-Zellen benötigt wurde, wurde das Flp/Frt-Rekombinationssystem angewendet [96]. Die Rekombinase Flippase (Flp) erkennt die Frt-Stellen und exzidiert die Neo-Kassette. Hierfür wurden heterozygote *RetSat*-Mäuse mit einer heterozygoten Flp-rekombinanten-Mauslinie verpaart (Abbildung 8). Durch die Kombination von Flp/Frt- und Cre/loxP-Rekombinationssystemen können nacheinander unterschiedliche DNA-Abschnitte entfernt werden. Dies ist für die Generierung der konditionalen *RetSat*-Maus notwendig. Homozygote *RetSat*-Mäuse mit Neo-Kassette (*knockout-first* Allel) besitzen aufgrund der integrierten Selektionskassette eine *RetSat*-Deletion in gesamten Organismus (*knockout-first* Maus). Für die Analyse der *knockout-first* Maus wurden heterozygote *RetSat*-Mäuse mit Neo-Kassette miteinander verpaart und die Nachkommen hinsichtlich vorhandener *knockout-first* Mutation untersucht.

Zur Erreichung eines kongenen, d. h. genetisch nahezu identischen, *RetSat* flox/flox-Mausstammes folgten sechs Rückkreuzungen der heterozygoten *RetSat*-Mäuse mit konditionalem

Allele mit C57Bl/6J-Mäusen. Durch Genotypisierung wurden aus jedem Wurf männliche heterozygote RetSat-Mäuse selektiert und erneut mit weiblichen C57Bl/6J-Mäusen verpaart. Nach Überprüfung des gewünschten genetischen C57Bl/6J-Hintergrunds konnte mit der Etablierung einer homozygoten RetSat flox/flox-Zucht durch Verpaarungen von heterozygoten RetSat-Mäusen begonnen werden.

Die konditionale Mutagenese mittels Cre/loxP-Systems, aus dem P1-Phagen, erlaubt die genetische Inaktivierung der *RetSat* in homozygoten RetSat-Mäusen in zeitlicher und lokaler Begrenzung [97, 98]. Die Rekombinase Cre erkennt die loxP-Stellen flankierten Exons zwei und drei der *RetSat* und exzidiert diesen DNA-Abschnitt (Abbildung 8). Das Leseraster wird verändert, sodass die Translation durch ein früh auftretendes Stoppkodon beendet wird.

3.6 Humane Leberproben

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression in humanen Leberproben untersucht. Dabei wurde die Entnahme, RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR in Kooperation mit Dr. Christian von Loeffelholz (DIfE, Potsdam & Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin & CSCC, Universitätsklinikum, Jena), Stephanie Döcke (DIfE, Potsdam), Prof. Dr. Michael Bauer (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin & CSCC, Universitätsklinikum, Jena), Prof. Dr. Martin Stockmann (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Charité, Berlin), Prof. Dr. Andreas F. H. Pfeiffer (DIfE, Potsdam & Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin, Charité, Berlin) und Prof. Dr. Andreas L. Birkenfeld (Paul Langerhans Institut, TU, Dresden & Klinik für Diabetes und Ernährungswissenschaften, King's College, London) durchgeführt. Die verwendeten qRT-PCR Primer sind dem Kapitel 2.12.3 zu entnehmen. Anhand der bereitgestellten Rohdaten erfolgten die Korrelationsanalysen.

Die histopathologische Beurteilung der vorliegenden hepatischen Steatose erfolgte anhand von Standardkriterien [99]. Die Leberproben wurden direkt nach der Entnahme schockgefroren. Das Studienprotokoll der klinischen Studie (Deutsches Register Klinischer Studien (DRKS): 00005450) entsprach den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen (Helsinki Deklaration des Weltärztebundes). Es wurden 29 Patienten für die Teilnahme ausgewählt, die definierten Einschluss- und Ausschlusskriterien wurden bereits publiziert [100].

3.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der gemessenen Einzelwerte wurde zunächst der Mittelwert ermittelt. Danach wurden Standardabweichung (Zellkulturexperimente) bzw. Standardfehler (Tierversuch) der Mittelwerte berechnet. Jedes Zellkulturexperiment wurde mindestens dreimal wiederholt und das repräsentativste wurde dargestellt. Als Signifikanztest wurde der parametrische Student-t-Test und die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewendet. Für die nukleäre Intensitätsanalyse wurde ANOVA mit Messwiederholungen angewendet und anschließend erfolgte der Post-Hoc-Test (Bonferroni Test). Alle anderen statistischen Auswertungen erfolgten mit dem parametrischen Student-t-Test, da aufgrund bisheriger Erfahrungen von einer Normalverteilung auszugehen ist. Humane Daten wurden auf Normalverteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnov-Test) und bei Normalverteilung mittels Pearson-Korrelationskoeffizient auf Signifikanz überprüft. Wenn die Daten nicht normalverteilt waren, wurde die Spearman-Korrelation angewendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 RetSat als neuer Regulator der hepatischen Glykolyse und Lipogenese

Die RetSat beeinflusst die Expression glykolytischer und lipogener Gene über den glukose-aktivierten Transkriptionsfaktor *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) in der Leber [19]. ChREBP vermittelt in der Leber die Aufnahme von Kohlenhydraten und ihre Umwandlung in Fette zur langfristigen Speicherung von Energie [22]. Bisherige Ergebnisse lassen ein Zusammenwirken beider Proteine im hepatischen Lipidstoffwechsel vermuten [19].

4.1.1 Expressionsniveau der *RetSat* in murinen adipösen Leberproben

Es ist bekannt, dass Fettleibigkeit zu einer erhöhten Lipogenese in der Leber führt [47, 101]. Aufgrund der funktionellen Rolle der RetSat im hepatischen Glukose- und Lipidstoffwechsel [19], sollte dessen Expressionsniveau in Diät-induzierten adipösen Mauslebern untersucht werden. Hierfür wurden Leberproben von dünnen ($29,7 \pm 1,61$ g) bzw. fettleibigen/adipösen ($47,9 \pm 2,83$ g) C57Bl/6J-Mäusen hinsichtlich *RetSat* mRNA Expression mittels qRT-PCR-Analyse untersucht.

Es konnte eine signifikant höhere hepatische *RetSat* mRNA Expression in den fettleibigen Mäusen im Vergleich zu den dünnen Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 9).

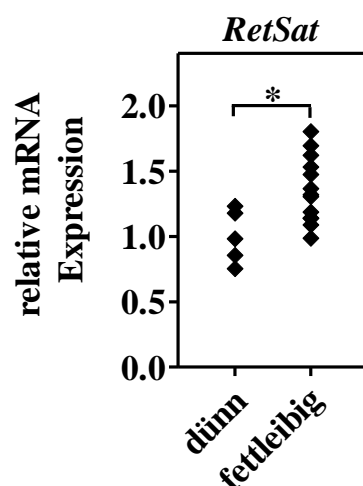


Abbildung 9: Hepatische *RetSat* mRNA Expression ist erhöht in fettleibigen Mäusen: qRT-PCR-Analyse der hepatischen *RetSat* mRNA Expression von C57Bl/6J-Mäusen nach zwölfwöchiger Gabe von Standardfutter (dünn, n = 5) bzw. einer Hochfettdiät mit hohem Zuckeranteil (fettleibig, n = 13). * Signifikanzniveau: p < 0,05.

4.1.2 Einfluss der hepatischen RetSat-Expression auf die durch Hochfettdiät-induzierte hepatische Steatose

Die Fütterung einer Hochfettdiät kann aufgrund der gesteigerten glykolytischen und lipogenen Stoffwechselwege zur Entstehung einer hepatischen Steatose führen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine RetSat-Depletion in Diät-induzierten adipösen Mäusen zu geringeren Serum- und Lebertriglyceriden führt [19]. Zum Nachweis von intrazellulären Triglyceriden in der Leber adipöser Mäuse mit RetSat-Depletion (sh-RetSat) bzw. der Kontrollgruppe (sh-βGal) sollte zusätzlich eine Lipidfärbung mittels *Oil-Red O* erfolgen.

Durch Western Blot Analyse konnte zunächst eine Reduktion der RetSat-Proteinexpression in Adeno sh-RetSat-behandelten Mäusen gezeigt werden. Pro Gruppe werden repräsentativ drei Tiere gezeigt (Abbildung 10A). Die Lipidfärbung zeigte in den Lebern mit RetSat-Depletion (Adeno sh-RetSat) einen deutlich geringeren Gehalt an Lebertriglyceriden im Vergleich zur Kontrollgruppe (Adeno sh-βGal) (Abbildung 10B).

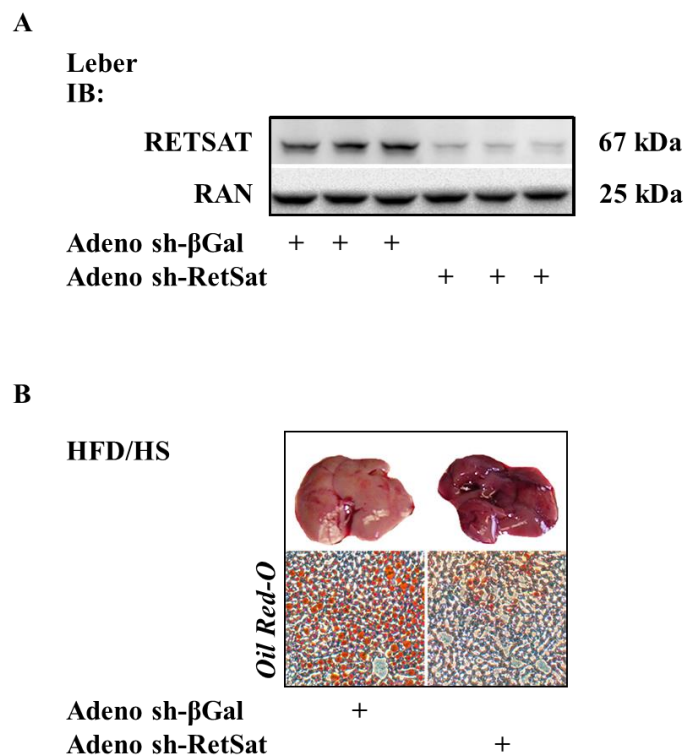


Abbildung 10: Verminderter Lebertriglyceridgehalt in adipösen Mäusen mit hepatischer RetSat-Depletion: A) Western Blot Analyse der RetSat-Proteinexpression und B) Lipidfärbung mit *Oil-Red O* von Lebern adipöser C57Bl/6J-Mäuse mit RetSat-Depletion (Adeno sh-RetSat). Die Kontrollgruppe erhielt Adeno sh-βGal. Als Ladekontrolle diente bei der Western Blot Analyse RAN. HFD/HS = Hochfettdiät mit hohem Zuckeranteil; IB = Immunblot.

4.1.3 Einfluss der hepatischen RetSat-Depletion auf die Glukosetoleranz

Eine hepatische RetSat-Depletion in adipösen Mäusen führte, neben der Abnahme an Serum- und Lebertriglyzeriden, auch zu signifikant geringeren *ad libitum* gefütterten- bzw. gefasteten (24 h) Blutglukosewerten [19]. Ob eine hepatische RetSat-Depletion in adipösen Mäusen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel hat, sollte in einem ersten Schritt durch einen intraperitonealen Glukosetoleranztest (ipGTT) untersucht werden. Hierfür wurde der ipGTT vier Tage nach Injektion von Adeno sh-RetSat (RetSat-Depletion) bzw. Adeno sh-βGal (Kontrollgruppe) in adipösen Mäusen durchgeführt.

Die RetSat-Depletion zeigte eine verbesserte Glukosetoleranz gegenüber der Kontrollgruppe, gekennzeichnet durch einen geringeren Anstieg der Blutglukosekonzentration nach Injektion der Glukose (Abbildung 11A) sowie einer geringeren *area under the curve* (AUC). Diese zeigte eine circa 20%ige Verbesserung der Glukosetoleranz gegenüber den Kontrollmäusen (Abbildung 11B).

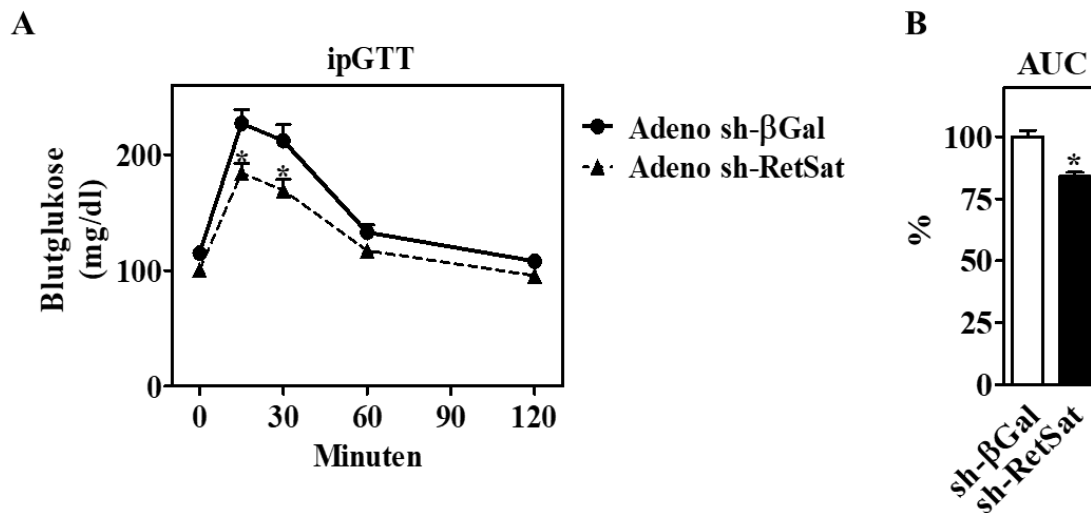


Abbildung 11: Verbesserte Glukosetoleranz nach hepatischer RetSat-Depletion: Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) der adipösen C57Bl/6J-Mäuse vier Tage nach Virus-Injektion von Adeno sh-RetSat (n = 6) bzw. Adeno sh-βGal (n = 10). Nach einer 16-stündigen Nüchternphase wurde den Mäusen 0,5 g/kg Glukose intraperitoneal appliziert. A) Die Blutglukose wurde unmittelbar vor Glukoseverabreichung (Zeitpunkt 0) sowie nach 15, 30, 60 und 120 min bestimmt und B) die *area under the curve* (AUC) dargestellt. * Signifikanzniveau: p < 0,05.

4.1.4 Einfluss der hepatischen RetSat-Depletion auf die Insulintoleranz

In einem zweiten Schritt sollte der Einfluss der hepatischen RetSat-Depletion in adipösen Mäusen auf die Insulintoleranz untersucht werden. Hierfür wurde sieben Tage nach Virus-Injektion ein intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT) durchgeführt.

Dabei konnte kein Unterschied in der Insulinsensitivität der adipösen Mäuse mit RetSat-Depletion (Adeno sh-RetSat) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Adeno sh-βGal) nachgewiesen werden (Abbildung 12A). Zusätzlich wurde der Einfluss der hepatischen RetSat-Depletion auf den Insulin-Signalweg untersucht. Hierfür wurde vor Tötung der Mäuse Insulin bzw. 0,9%iges NaCl intraperitoneal appliziert und anschließend Leberprotein mittels Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 12B).

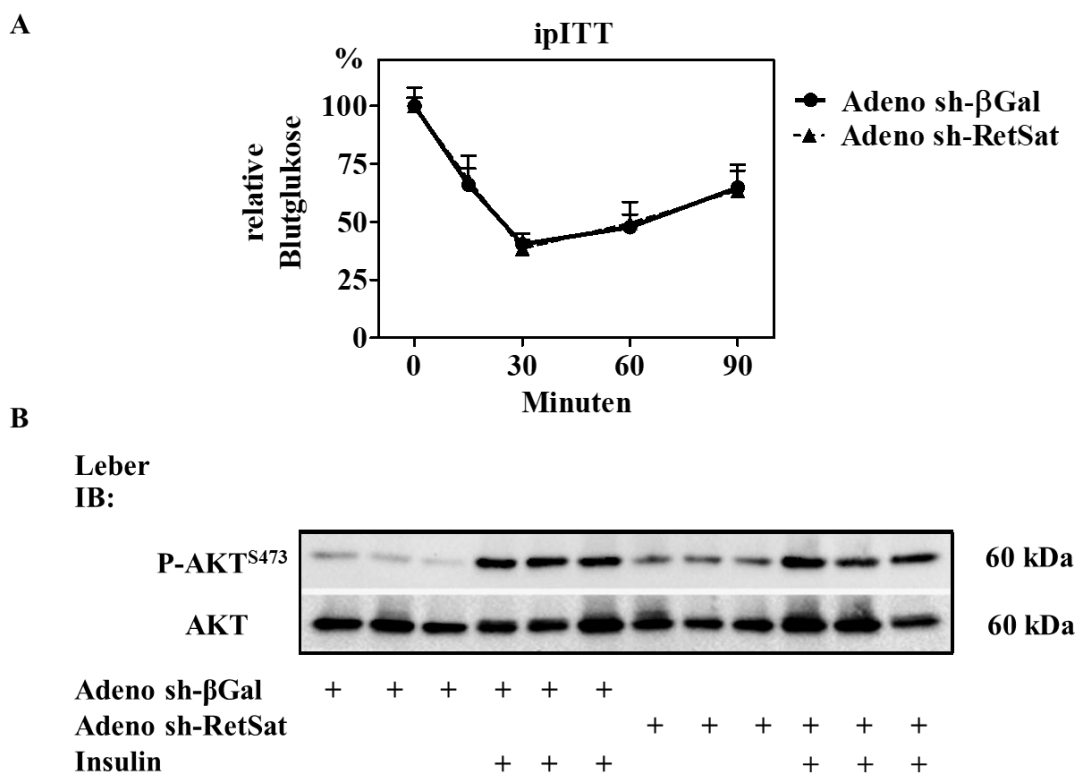


Abbildung 12: Kein Unterschied in der Insulintoleranz nach hepatischer RetSat-Depletion: A) Intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT) der adipösen C57Bl/6J-Mäuse sieben Tage nach Virus-Injektion von Adeno sh-RetSat (n = 6) bzw. Adeno sh-βGal (n = 8). Nach einer sechsständigen Nüchternphase wurde den Mäusen 0,75 U/kg Insulin intraperitoneal appliziert. Die Blutglukose wurde unmittelbar vor Glukoseverabreichung (Zeitpunkt 0) sowie nach 15, 30, 60 und 90 min bestimmt. B) Western Blot Analyse von hepatischen phosphorylierten Serin an Position 473 im Akt nach intraperitonealer Gabe von 1 U/kg Insulin bzw. 0,9%igen NaCl neun Tage nach Virus-Injektion von Adeno sh-RetSat (n = 6) bzw. Adeno sh-βGal (n = 6) und 16-stündiger Nüchternphase. IB = Immunblot.

Insulin führt zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB/Akt) durch Phosphorylierung der Aminosäuren Serin (473) und Threonin (308) [102]. Pro Gruppe werden drei Tiere gezeigt (Abbildung 12B). Die Gabe von Insulin führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung von Serin 473 des Akts in der Kontrollgruppe. Die Insulinabhängige Phosphorylierung konnte vergleichbar in den Mauslebern mit RetSat-Depletion gezeigt werden. Dabei wiesen die RetSat-depletierten Mauslebern einen höheren basalen Phosphorylierungsgrad der Aminosäure Serin an Position 473 im Akt auf.

4.1.5 Korrelation zwischen humaner hepatischer *RETSAT* mRNA Expression und Fettleibigkeit sowie dem Schweregrad einer hepatischen Steatose

Um eine Aussage über eine Relevanz der RetSat im Glukose- und Lipidstoffwechsel im Menschen zu treffen, wurden humane Leberproben hinsichtlich *RETSAT* mRNA Expression und einem Zusammenhang zwischen *Body-Mass-Index* (BMI) sowie dem Schweregrad einer bestehenden Steatose untersucht.

Bei der Untersuchung einer Korrelation zwischen humaner *RETSAT* mRNA Expression und der Höhe des BMI ergab der Pearson-Korrelationskoeffizient ($r = 0,46$; $r^2 = 0,208$) einen positiven linearen Zusammenhang. Der Zusammenhang war statistisch signifikant ($p = 0,013$) (Abbildung 13A). Außerdem konnte eine positive lineare Korrelation (Spearman-Korrelationskoeffizient: $r = 0,63$; $r^2 = 0,396$) zwischen dem Ausmaß einer Leberverfettung (Schweregrad der Steatose) und humaner *RETSAT* mRNA Expression gezeigt werden. Der Zusammenhang war statistisch höchst signifikant ($p = 0,001$) (Abbildung 13B).

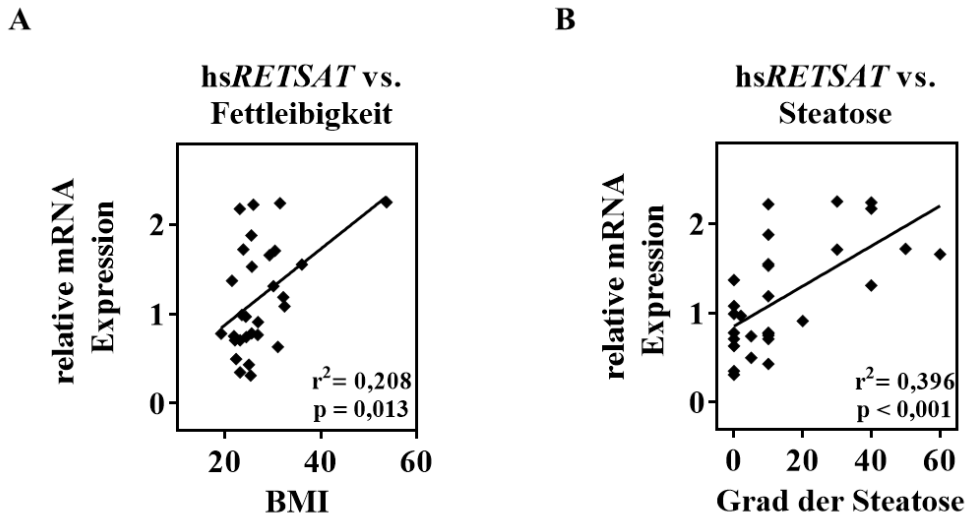


Abbildung 13: Humane hepatische *RETSAT* mRNA Expression korreliert mit Fettleibigkeit und dem Ausmaß einer hepatischen Steatose: Analyse humaner Leberproben ($n = 29$) hinsichtlich Korrelation zwischen *RETSAT* mRNA Expression und A) dem *Body-Mass-Index* (BMI) sowie B) dem Schweregrad der vorliegenden Steatose. r^2 = Bestimmtheitsmaß; A: Pearson- B: Spearman-Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; hs = human; vs. = versus.

4.1.6 Einfluss der RetSat-Depletion auf die nukleäre Anreicherung von ChREBP

Als funktioneller Link zwischen dem hepatischen Glukose- und Lipidstoffwechsel und der RetSat konnte der Transkriptionsfaktor *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) identifiziert werden. Bisherige Ergebnisse deuten auf eine verminderte Aktivität von ChREBP infolge einer RetSat-Depletion hin [19].

ChREBP transloziert bei hohen Glukosekonzentrationen in den Nukleus und induziert die Expression glykolytischer und lipogener Gene [20, 21]. Sollte eine RetSat-Depletion die nukleäre Anreicherung von ChREBP inhibieren und damit dessen Aktivität reduzieren, wäre eine geringere Menge an nukleären ChREBP in RetSat-depletierten primären Maushepatozyten zu erwarten. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von endogenem ChREBP infolge einer RetSat-Depletion näher untersucht.

4.1.6.1 Antikörpervalidierung für die Immunfluoreszenz in primären Maushepatozyten

Zunächst wurden die eingesetzten RetSat- und ChREBP-Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht. Hierfür wurden zunächst primäre Maushepatozyten isoliert. Zur Validierung des ChREBP-Antikörpers erfolgte eine Virus-vermittelte Überexpression von ChREBP (Adeno GFP ChREBP). Die Kontrollzellen erhielten hingegen Adeno GFP. Es konnte ein stärkeres ChREBP-Fluoreszenzsignal in den primären Maushepatozyten mit überexprimierten ChREBP gezeigt werden (Abbildung 14A). Zur Validierung des RetSat-Antikörpers erfolgte eine RetSat-Depletion durch den Einsatz von RetSat siRNA. Die Kontrollzellen erhielten Kontroll siRNA. In den RetSat siRNA-behandelten primären Maushepatozyten wurde eine deutliche Reduktion des RetSat-Fluoreszenzsignals im Vergleich zu den Kontrollzellen gezeigt (Abbildung 14B).

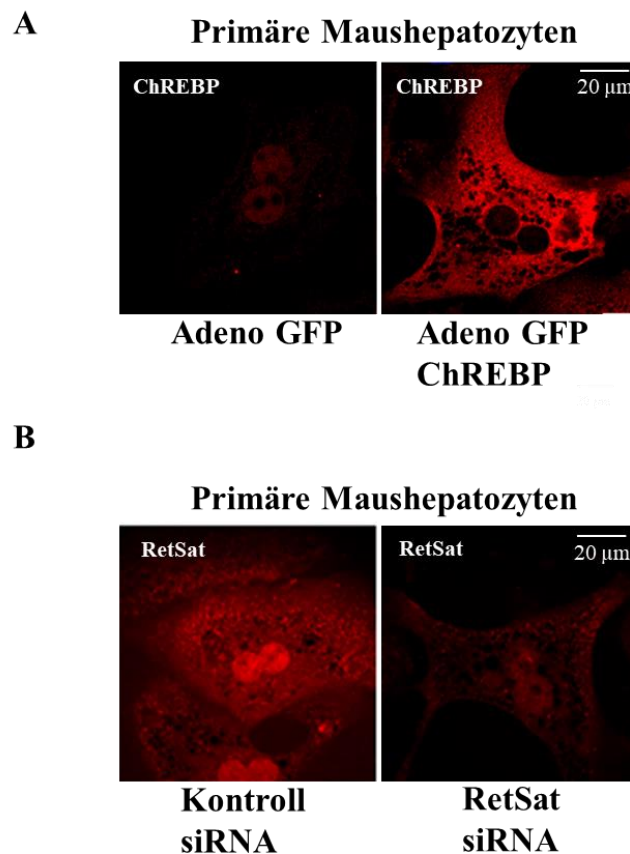


Abbildung 14: Validierung des ChREBP- und RetSat-Antikörpers: Isolation von primären Maushepatozyten und anschließende A) Überexpression von ChREBP (Adeno GFP ChREBP) durch adenoviralen Gentransfer. Die Kontrollzellen wurden mit Adeno GFP behandelt. B) RetSat-Depletion durch den Einsatz von RetSat siRNA. Die Kontrollzellen erhielten hingegen Kontroll siRNA. Anschließend wurde die RetSat und ChREBP mittels Immunfluoreszenz markiert und durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Maßstab = 20 µm.

4.1.6.2 Dezimierte nukleäre Anreicherung von ChREBP infolge der RetSat-Depletion in primären Maushepatozyten

Um den Einfluss einer RetSat-Depletion auf die nukleäre Anreicherung von ChREBP infolge hoher Glukosekonzentrationen zu untersuchen, wurden primäre Maushepatozyten isoliert und mit RetSat siRNA behandelt. Die Kontrollzellen erhielten Kontroll siRNA. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 2,5 mM oder 25 mM glukosehaltigem Medium. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von endogenem ChREBP sichtbar gemacht.

In den Kontrollzellen konnte ChREBP bei hoher Glukosekonzentration (25 mM) vorwiegend im Nukleus nachgewiesen werden (Abbildung 15A). Bei einer geringeren Glukosekonzentration (2,5 mM) konnte ChREBP gleichermaßen im Zytosol und Nukleus lokalisiert werden. Damit konnte die nukleäre Anreicherung von ChREBP infolge von hohen Glukosekonzentrationen in den Kontrollzellen gezeigt werden. In RetSat-depletierten Zellen konnte die Zunahme des Fluoreszenzsignals für ChREBP im Nukleus bei hohen Glukosekonzentrationen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 15B). Die nukleäre Intensitätsanalyse zeigte ebenfalls, dass in den RetSat-depletierten Zellen die nukleäre Anreicherung des ChREBPs infolge hoher Glukosekonzentrationen nicht stattfand (Abbildung 15C). Lediglich in den Kontrollzellen konnte ein 35%iges stärkeres Fluoreszenzsignal des nukleären ChREBP bei hohen Glukosekonzentrationen im Vergleich zur geringeren Glukosekonzentration gezeigt werden.

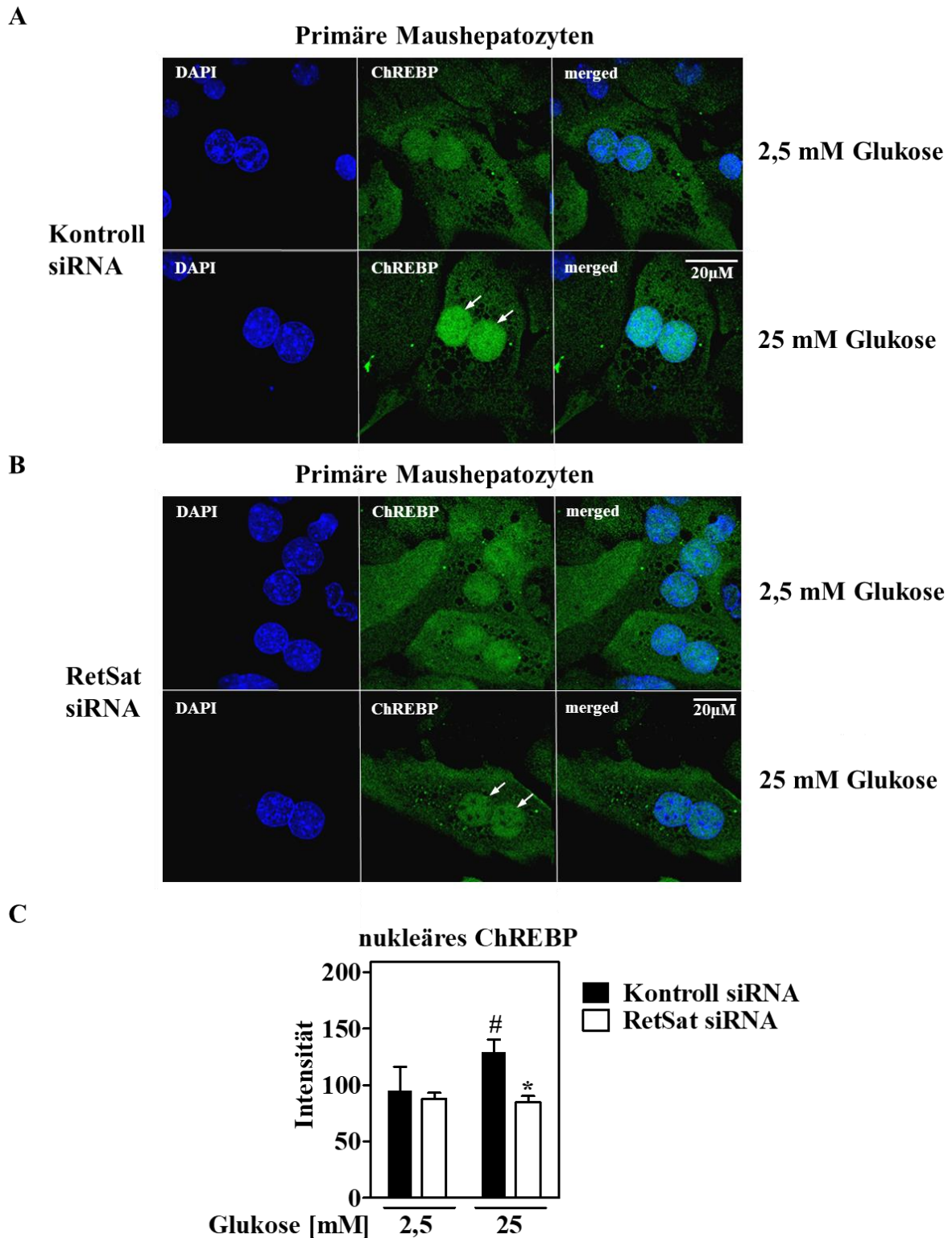


Abbildung 15: Dezimierte nukleäre Anreicherung von ChREBP infolge der RetSat-Depletion: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von ChREBP in primären Maushepatozyten nach Stimulation mit 2,5 mM bzw. 25 mM glukosehaltigem Medium in A) Kontrollzellen (Kontroll siRNA) bzw. B) RetSat-depletierten Zellen (RetSat siRNA) und dessen C) nukleäre Intensitätsanalyse mittels ImageJ Software. Nuclei wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab = 20 µm; # Signifikanzniveau: p = 0,05: Kontroll siRNA in 2,5 mM zu 25 mM; * Signifikanzniveau: p = 0,05: Kontroll- zu RetSat siRNA in 25 mM; Pfeile = nukleäres ChREBP.

4.1.7 Korrelation zwischen humaner hepatischer *RETSAT* mRNA Expression und Expression der ChREBP-Zielgene *PKLR* und *ACCI*

Ein Zusammenhang von hepatischer *RETSAT* mRNA Expression und der Expression von ChREBP-Zielgenen im Menschen sollte in humanen Leberproben, durch qRT-PCR und anschließender Korrelationsanalyse, untersucht werden.

Bei der Untersuchung einer Korrelation zwischen humaner *RETSAT* mRNA Expression und den ChREBP-Zielgenen *PKLR* [21] und *ACCI* [103,104] ergab der Pearson-Korrelationskoeffizient (*PKLR*: $r = 0,65$; $r^2 = 0,429$; *ACCI*: $r = 0,69$, $r^2 = 0,474$) einen positiven linearen Zusammenhang (Abbildung 16A und B). Der Zusammenhang war für beide ChREBP-Zielgene statistisch hoch signifikant ($p = 0,001$).

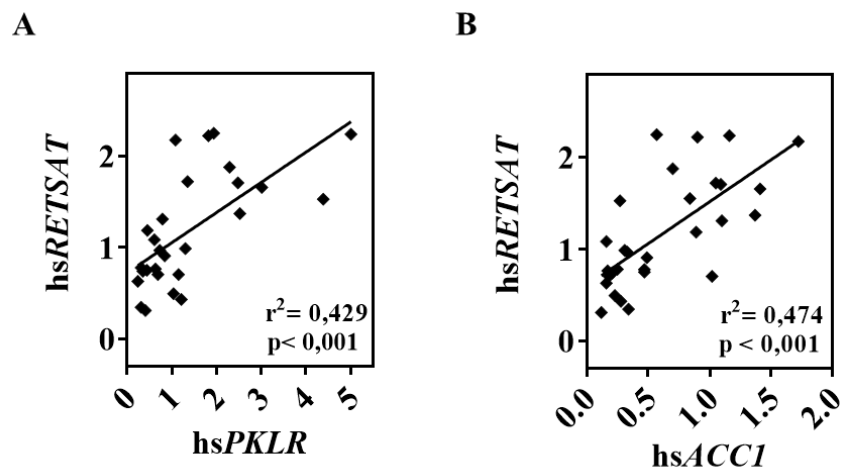


Abbildung 16: Humane hepatische *RETSAT* mRNA Expression korreliert mit Expression der ChREBP-Zielgene *PKLR* und *ACCI*: Analyse humaner Leberproben ($n = 29$) hinsichtlich Korrelation zwischen *RETSAT* mRNA Expression und A) *PKLR*- sowie B) *ACCI*-Expression. r^2 = Bestimmtheitsmaß; A + B: Pearson-Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; hs = human; vs. = versus.

4.2 Generierung einer neuen Mauslinie: RetSat flox/flox

In Zusammenarbeit mit dem FEM in Steglitz sollte eine konditionale RetSat *knockout*-Mauslinie (RetSat flox/flox) generiert werden. Das verwendete Cre/loxP-Rekombinationssystem erlaubt die genetische Inaktivierung der *RetSat* in zeitlicher und lokaler Begrenzung [97, 98].

Dafür wurde das RetSat flox-Konstrukt gezielt mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht. Nach Selektion positiver ES-Zellklone erfolgte deren Injektion in Blastozysten, die in pseudogravide Mäuse transferiert wurden. Chimären mit Keimbahntransmission wurden selektiert und mit Wildtyp(Wt)-Mäusen verpaart. Nach sechs Rückkreuzungen der heterozygoten RetSat (RetSat flox)-Mäuse mit Wt-Mäusen konnte mit der Etablierung einer homozygoten RetSat (RetSat flox/flox)-Zucht begonnen werden. Im Kapitel 3.5 ist der gesamte Ablauf detailliert beschrieben.

4.2.1 Validierung der Integration des RetSat flox-Konstruktes in ES-Zellen

Das RetSat flox-Konstrukt besitzt auf beiden Seiten Sequenzhomologien zum Ziellocus (5´Arm und 3´Arm), die den gezielten Einbau des *RetSat*-Transgens ermöglichen. Durch homologe Rekombination wurde das *RetSat*-Transgen zwischen den homologen Armen in den spezifischen *RetSat*-Genlocus integriert. Nach Elektroporation des RetSat flox-Konstruktes mit pluripotenten murinen ES-Zellen erfolgte die Kontrolle der korrekten einmaligen Rekombination des *RetSat*-Transgens in den *RetSat*-Genlocus mittels Southern Blot Analyse.

Hierfür wurde die genomische DNA elektroporierter ES-Zellen mit Pst1- bzw. EcoRV verdaut. Diese Enzyme schneiden mehrfach im Genom und lassen neben einem Wt-Fragment, bei Integration des *RetSat*-Transgens ein charakteristisches DNA-Fragment entstehen. Durch Integration des RetSat flox-Konstruktes wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Dies führt zu einer Verlängerung oder Verkürzung im Vergleich zum Wt-Fragment. Der Nachweis dieser Fragmente erfolgte mittels spezifischer Sonden (Pst1- bzw. EcoRV-Sonde). Bei Integration des 5´Arms (Pst1-Sonde) ergab sich ein 11296 bp, ohne Integration ein 7517 bp großes DNA-Fragment. Bei Integration des 3´Arms (EcoRV-Sonde) ergab sich ein 6673 bp, ohne Integration ein 9450 bp großes DNA-Fragment.

Als Negativkontrolle wurde zusätzlich genomische DNA einer Wt-ES-Zelle (IDG) verwendet. Erwartungsgemäß ließ die IDG lediglich das Wt-Fragment mit 7517 bp (Pst1-Sonde) bzw. mit 9450 bp (EcoRV-Sonde) nachweisen (Abbildung 17A und B). Von den hier acht repräsentativ dargestellten elektroporierten ES-Zellen konnten die ES-Zellklone eins, drei bis sechs und acht, als homolog rekombiniert identifiziert werden. Diese Zellklone ließen zusätzlich zum Wt-Fragment die Integration des RetSat flox 5' Arms (11296 bp Fragment) und -3' Arms (6673 bp Fragment) nachweisen. Der ES-Zellklon zwei zeigte hingegen nur die Integration des RetSat flox 5' Arms. Der ES-Zellklon sieben ließ in beiden Southern Blot Analysen keine spezifische Bande detektieren.

Von insgesamt 72 getesteten ES-Zellklonen konnten acht ES-Zellklone durch Southern Blot Analysen als einmalig korrekt integriert identifiziert werden. Damit lag die Rekombinationsfrequenz bezogen auf die Gesamtzahl der getesteten Einzelklone bei 11,1 %. Die homologen rekombinierten ES-Zellklone eins und sechs wurden im FEM in Steglitz für die Blastozysteninjektion verwendet.

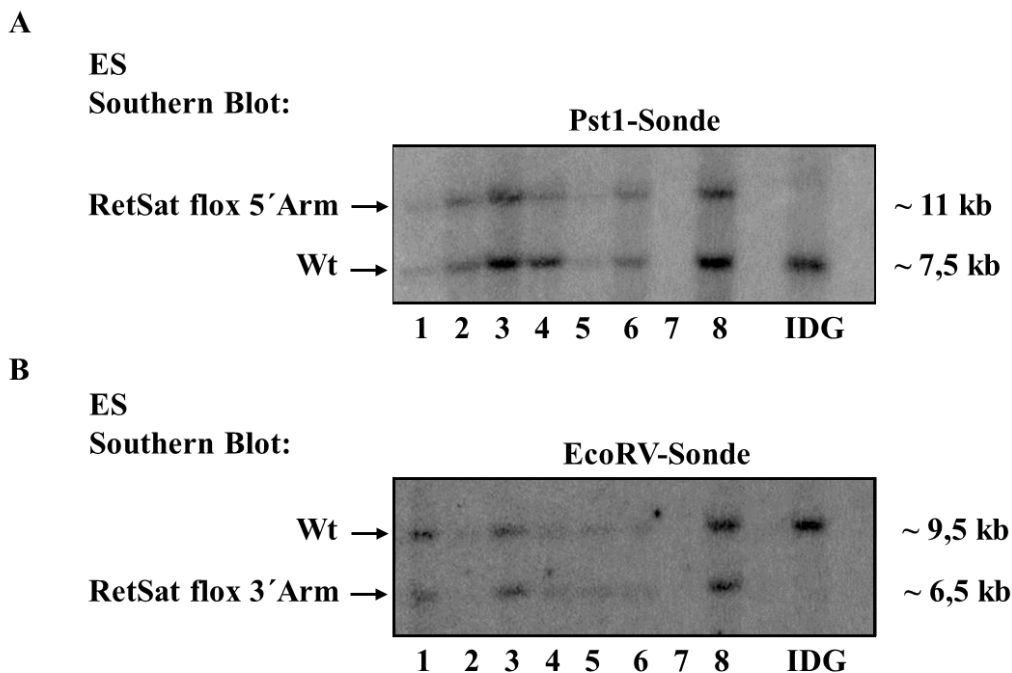


Abbildung 17: Bestätigung der korrekten einmaligen Rekombination des *RetSat*-Transgens in den *RetSat*-Genlokus: Southern Blot Analyse der genomischen DNA aus embryonalen Stammzellen (ES) durch den Einsatz spezifischer Sonden A) Nachweis des 5' Arm mittels Pst1-Sonde und B) Nachweis des 3' Arms mittels EcoRV-Sonde. Als Kontrolle wurde eine Wildtyp(Wt)-ES-Zelle verwendet (IDG). ES-Klone eins bis acht.

4.2.2 Überprüfung der Chimären auf Keimbahntransmission

Nach Blastozysteninjektion und Embryotransfer wurden insgesamt 22 Jungtiere geboren, von denen sieben Tiere einen Chimärismus zwischen 70 und 100 % aufwiesen (Tabelle 11). Dies ergab eine Chimärenrate von 31,8 %, wobei 86 % der Chimären männlich waren.

Lediglich Chimäre mit Keimbahntransmission können das mutierte *RetSat*-Allel an ihre Nachkommen weitervererben. Für die Selektion dieser Chimären wurden die männlichen Chimären mit weiblichen C57Bl/6J-Mäusen verpaart und dessen Nachkommen mittels Genotypisierung auf das Vorhandensein des *RetSat*-Transgens untersucht. Die weibliche Chimäre wurde für diese Analyse nicht verwendet. Aus den sechs Zuchtpaaren gingen insgesamt 74 Nachkommen hervor, dabei wiesen 15 Jungtiere (20,3 %) die erwünschte genetische Veränderung auf. Es konnte die Keimbahntransmission des *RetSat*-Transgens durch drei Chimären verifiziert werden.

Tabelle 11: Übersicht der erzeugten Chimären

Chimäre	Geschlecht	Chimärismusgrad [%]	Fertilität	Keimbahntransmission
1	m	100	ja	ja
2	m	100	ja	ja
3	w	70	-	-
4	m	100	ja	nein
5	m	100	ja	ja
6	m	95	nein	-
7	m	100	ja	nein

Die Chimären mit Keimbahntransmission wurden anschließend mit C57Bl/6J-Mäusen verpaart. Die heterozygoten Nachkommen (heterozygote *RetSat*-Mäuse mit *knockout-first* Allel) wurden zum einen für die Verpaarung mit der Flp-Maus (Kapitel 3.5) sowie zum anderen für die Analyse der *RetSat*-Expression in Mäusen mit *knockout-first* Allel (Kapitel 4.2.3) verwendet.

4.2.3 Analyse der RetSat-Expression in Mäusen mit *knockout-first* Allel

Das verwendete RetSat flox-Konstrukt bewirkt durch Integration der Reporter-Kassette im ersten Intron der *RetSat* eine Deletion der RetSat (*knockout-first* Allel). Dabei initiiert ein Polyadenylierungssignal der Reporter-Kassette die Termination des RetSat-Transkripts, wodurch die Exons zwei bis elf der *RetSat* nicht länger translatiert werden sollten. Während bei Heterozygotie noch ein Wt-Allel mit funktionierender RetSat dem Organismus zur Verfügung steht, sollten homozygote Mäuse eine RetSat-Deletion im gesamten Organismus (*knockout-first* Maus) besitzen. Um die RetSat Expression in *knockout-first* Mäusen untersuchen zu können, wurden heterozygote RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel miteinander verpaart. Die Nachkommen wurden mittels Genotypisierung auf das Vorhandensein des *RetSat*-Transgens getestet und Leberproben hinsichtlich *RetSat* mRNA Expression und RetSat-Proteinexpression untersucht.

Die Genotypisierung wies in sechs Tieren das *RetSat*-Transgen und in einem Tier das Wt-Allel mittels Neo-PCR nach. Die Wt-Maus zeigte eine circa zweifach höhere *RetSat* mRNA Expression im Vergleich zu den heterozygoten (Het) RetSat-Mäusen (Abbildung 18A). Die *knockout-first* Maus, die homozygot (Ho) für das RetSat flox-Konstrukt war, zeigte *RetSat* mRNA Levels auf einem Hintergrundniveau.

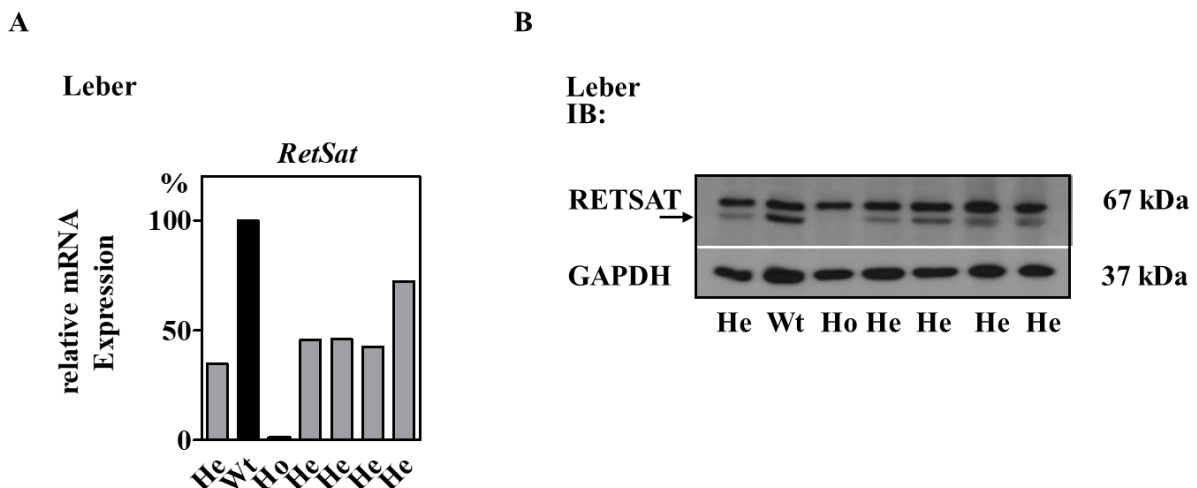


Abbildung 18: RetSat-Expression in Mäusen mit *knockout-first* Allel: Heterozygote RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel wurden miteinander verpaart und Leberproben der Nachkommen hinsichtlich A) *RetSat* mRNA Expression via qRT-PCR-Analyse und B) RetSat-Proteinexpression via Western Blot Analyse untersucht. Als Ladekontrolle diente bei der Western Blot Analyse Gapdh. He = heterozygot; Ho = homozygot; Wt = Wildtyp; IB = Immunblot; Pfeil = RetSat-Proteinbande.

Auch durch Analyse der RetSat-Proteinexpression wurde das Ergebnis der Genotypisierung und der qRT-PCR bestätigt. Die Wt-Maus zeigte die höchste RetSat-Proteinexpression. Während die heterozygoten Mäuse eine geringere RetSat-Proteinexpression im Vergleich zum Wt aufwiesen, konnte die Deletion der RetSat auch auf Proteinebene in der *knockout-first* Maus gezeigt werden (Abbildung 18B).

4.2.4 Überprüfung des genetischen Hintergrunds der transgenen RetSat-Mauslinie

Durch Verpaarung der heterozygoten RetSat-Mäuse mit *knockout-first* Allel mit der Flp-Maus konnten heterozygote RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel erzeugt werden (Kapitel 3.5). Diese wurden im Weiteren für die Rückkreuzungen auf einen genetisch identischen C57Bl/6J-Hintergrund verwendet.

Für die Generierung der transgenen RetSat-Mauslinie wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) mit C57Bl/6J x 129S6/SvEvTac-Hintergrund bzw. Blastozysten und die Flp-Maus mit C57Bl/6N-Hintergrund verwendet. Um den gewünschten C57Bl/6J-Hintergrund zu erreichen, wurden die heterozygoten RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel mit C57Bl/6J-Mäusen verpaart (Rückkreuzung). Es fanden sechs Rückkreuzungen statt. Der C57Bl/6J-Hintergrund besitzt als alleiniges Merkmal eine Mutation im *nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (*Nnt*)-Gen. Dies führt zur Deletion des Exons sieben bis elf der *Nnt* [80].

Mittels PCR-Analyse konnte die Deletion des Exons neun (PCR-Fragment: 418 bp) der *Nnt* und damit die Deletion des *Nnt*-Gens in heterozygoten RetSat-Mäusen mit konditionalem Allel der sechsten Rückkreuzung (F6) gezeigt werden (Abbildung 19).

Gelelektrophorese:

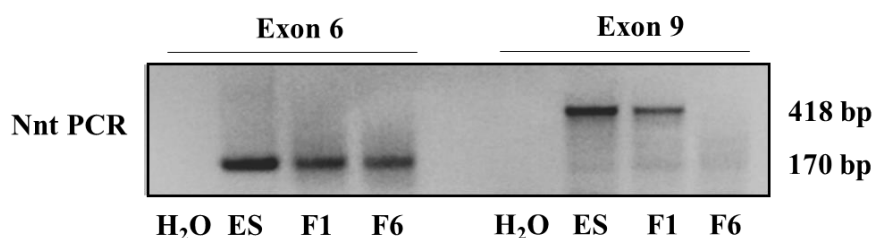


Abbildung 19: Überprüfung des C57Bl/6J-Hintergrund der RetSat-Mäuse nach sechs Rückkreuzungen: PCR-Analyse (Nnt PCR) der genomischen DNA von embryonalen Stammzellen (ES) heterozygoter RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel der ersten (F1) und sechsten (F6) Rückkreuzung, hinsichtlich des Vorhandenseins des Exons sechs und neun der *nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (*Nnt*). Eine Negativkontrolle mit Wasser (H₂O) wurde für beide PCR-Ansätze mitgeführt.

In den ES-Zellen sowie den Nachkommen der ersten Rückkreuzung (F1) konnte hingegen Exon neun nachgewiesen werden. Als Kontrolle erfolgte der parallele Nachweis des Exons sechs (PCR-Fragment: 170 bp) der *Nnt*, welches in allen Ansätzen detektiert werden konnte.

4.2.5 Effizienz der durch Rekombinase Cre-vermittelten hepatischen RetSat-Deletion

Nach Überprüfung des gewünschten genetischen C57Bl/6J-Hintergrunds konnte durch Verpaarungen von heterozygoten RetSat-Mäusen mit konditionalem Allel untereinander homozygote RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel erzeugt werden. Zur Bestätigung der Funktionalität des *RetSat*-Transgens im *RetSat*-Genlokus erfolgte die Überexpression der Rekombinase Cre mittels Adeno-assoziiierter-Viren (AAV) in den homozygoten RetSat-Mäusen mit konditionalem Allel. Zur Etablierung der adäquaten Virusmenge wurden drei Virusmengen ($1,4 \times 10^9$, $4,5 \times 10^9$ und $1,4 \times 10^{10}$ Genompartikel/ml) angewandt. Nach drei Wochen wurde die *RetSat* mRNA Expression und RetSat-Proteinexpression in der Leber bestimmt.

Mit steigender AAV Cre-Menge konnte eine zunehmende Reduktion der *RetSat* mRNA Expression sowie RetSat-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren (AAV GFP) erreicht werden. (Abbildung 20A und B).

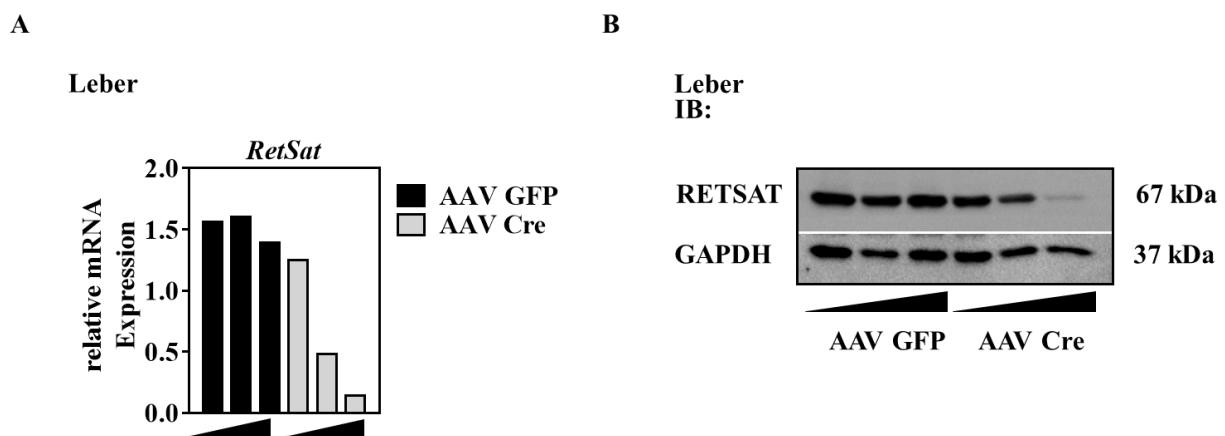


Abbildung 20: RetSat-Expression in Mäusen mit konditionalem RetSat-Allel nach Expression der Rekombinase Cre: Analyse der Leberproben von homozygoten RetSat-Mäusen mit konditionalem Allel drei Wochen nach Virus-Injektion von drei AAV Cre- (n = 1) bzw. AAV GFP-Mengen (n = 1) hinsichtlich der A) *RetSat* mRNA Expression via qRT-PCR-Analyse und B) RetSat-Proteinexpression via Western Blot Analyse. Als Ladekontrolle diente bei der Western Blot Analyse Gapdh. AAV = Adeno-assoziierte-Viren; IB = Immunblot; Dreieck = ansteigende AAV-Menge.

4.3 EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierung im ChREBP

Der Effekt der hepatischen RetSat-Depletion auf ChREBP in adipösen Mäusen könnte durch Beeinflussung der EGLN3 vermittelt sein [19]. In Vorarbeiten konnte *in vitro* und *in vivo* eine Reduktion von ChREBP und dessen Zielgenen infolge einer verminderten EGLN3-Expression gezeigt werden. Zusätzlich weist eine ChREBP-EGLN3-Proteininteraktion und mehrere Prolinhydroxylierungen im ChREBP auf einen funktionellen Zusammenhang hin [19, 60].

4.3.1 Quantitative Untersuchung der Prolinhydroxylierung im ChREBP

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Prolinhydroxylierungen im ChREBP durch EGLN3 vermittelt sind. Hierfür erfolgte ein quantitativer Nachweis von prolinhydroxyliertem ChREBP durch den Einsatz eines Hydroxyprolin-Antikörpers. HEK293-Zellen wurden mit ChREBP-Wildtyp(Wt)-Plasmid transfiziert und EGLN3 mittels adenoviraler Infektion koexprimiert. Die Kontrollzellen erhielten Adeno GFP. Die Proteinextrakte wurden mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Proteinextrakte wurden auf zwei identischen SDS-Gelen aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, erfolgte die Inkubation entweder mit dem ChREBP-(CHREBP-Blot) oder Hydroxyprolin-Antikörper (Pro-OH-Blot). Die durch den CHREBP-Blot eindeutig identifizierte Migrationshöhe von ChREBP, erlaubte im Pro-OH-Blot auf derselben Migrationshöhe die Betrachtung von prolinhydroxyliertem ChREBP.

Die Überexpression von EGLN3 führte zu einer erhöhten Menge an Prolinhydroxylierungen im ChREBP (Abbildung 21).

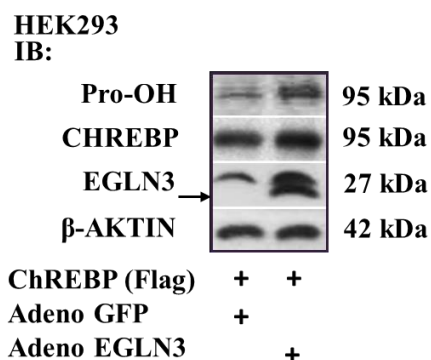


Abbildung 21: Zunahme der Prolinhydroxylierungen im ChREBP infolge der ektopen Expression der EGLN3: Western Blot Analyse der Prolinhydroxylierung von überexprimiertem ChREBP (Flag) in HEK293-Zellen nach Koexpression von EGLN3 oder GFP. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Pro-OH = Prolinhydroxylierung; IB = Immunblot; Pfeil = EGLN3-Proteinbande.

4.3.2 Zielgerichtete Mutagenese: Substitution der Proline an Position 141 und 536 im ChREBP α

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proline an Position 141 und 536 im ChREBP α für die zielgerichtete Mutagenese aus folgenden Gründen ausgewählt: Zum einen erreichten die nachgewiesenen Prolinhydroxylierungen in diesen Positionen den höchsten *score* in der vorrangegangenen massenspektrometrischen Untersuchung und stellten damit die am wahrscheinlichsten Prolinhydroxylierungen im ChREBP dar. Zum anderen sind die Proline 141 und 536 in bekannten Domänen des ChREBPs lokalisiert und weisen eine hohe Sequenzhomologie zwischen verschiedenen Spezies auf, wodurch eine funktionelle Bedeutung wahrscheinlich ist [60].

Einleitend hierzu wird die Lokalisation sowie die Peptidsequenz der ausgewählten Proline 141 und 536 schematisch dargestellt (Abbildung 22). Die Proline (P) 141 und 536 des ChREBP α wurden mittels zielgerichteter Mutagenese gegen Alanin (A) ausgetauscht (Substitution). Die generierten ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie die Doppelmutante P141,536A) wurden hinsichtlich der ChREBP-Proteinstabilität und -Aktivität untersucht.

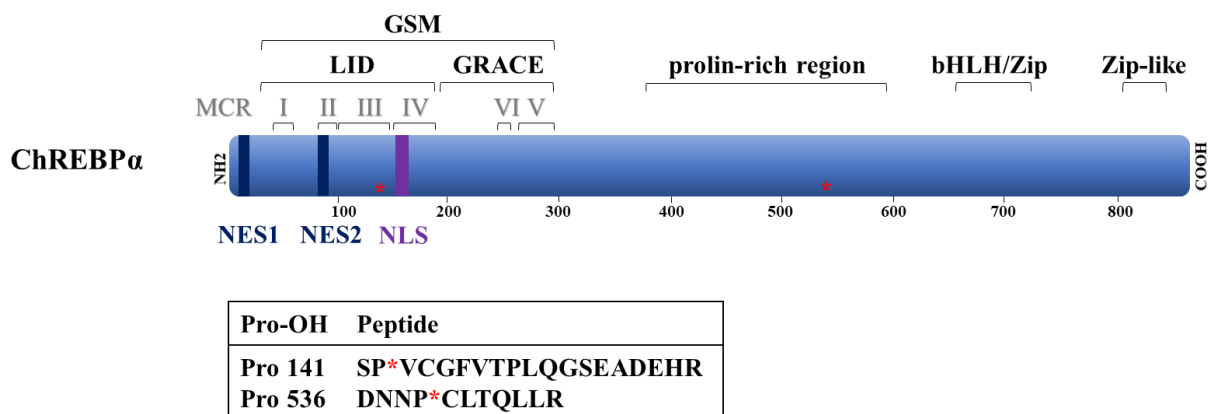


Abbildung 22: Proteinstruktur von ChREBP α mit Darstellung der Prolinhydroxylierung an Position 141 und 536: Schematische Darstellung mit Angabe funktioneller Motive des ChREBP α : GSM = *glucose-sensing module* (Aminosäure (AS) 37 bis 298), LID = *low-glucose inhibitory domain* (AS 37 bis 192), GRACE = *glucose-response activation conserved element* (AS 197 bis 298), *prolin-rich region* (AS 387 bis 596), bHLHZip = *basic helix-loop-helix/leucine-zipper domain* (AS 661 bis 728), Zip-like = *leucine-zipper-like domain* (AS 806 bis 846), NES1= *nuclear export signal 1*(AS 5 bis 15), NES2 = *nuclear export signal 2* (AS 85 bis 95), NLS = *nuclear localization signal* (AS 158 bis 175) und MCRI - IV= *mondo conserved regions I - VI*. Pro = Prolin; * Lokalisation der Prolinhydroxylierung (Pro-OH) an Position 141 und 536 im ChREBP.

4.3.2.1 Einfluss der Prolin-Substitution auf ChREBP-Proteinstabilität

Um die Abhängigkeit der ChREBP-Proteinstabilität von den Prolinhydroxylierungen an Position 141 und 536 im ChREBP zu untersuchen, wurden die generierten ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie die Doppelmutante P141,536A) in HEK293-Zellen überexprimiert. Als Kontrolle diente eine Überexpression von ChREBP α , im Folgenden immer als ChREBP-Wt bezeichnet. Ein Ansatz mit ausschließlicher Transfektion des pMSCV-Plasmids (Leervektor) diente als Negativkontrolle.

Um auszuschließen, dass veränderte Proteinmengen der ChREBP-Mutanten lediglich auf einer geringeren mRNA Expression beruhen, wurde zunächst mittels qRT-PCR die *ChREBP* mRNA Expression ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der ChREBP-Mutanten im Vergleich zum ChREBP-Wt gezeigt werden (Abbildung 23A). Die Analyse der Proteinmengen zeigte ebenfalls keine veränderte Proteinmenge der ChREBP-Mutanten im Vergleich zum ChREBP-Wt (Abbildung 23B).

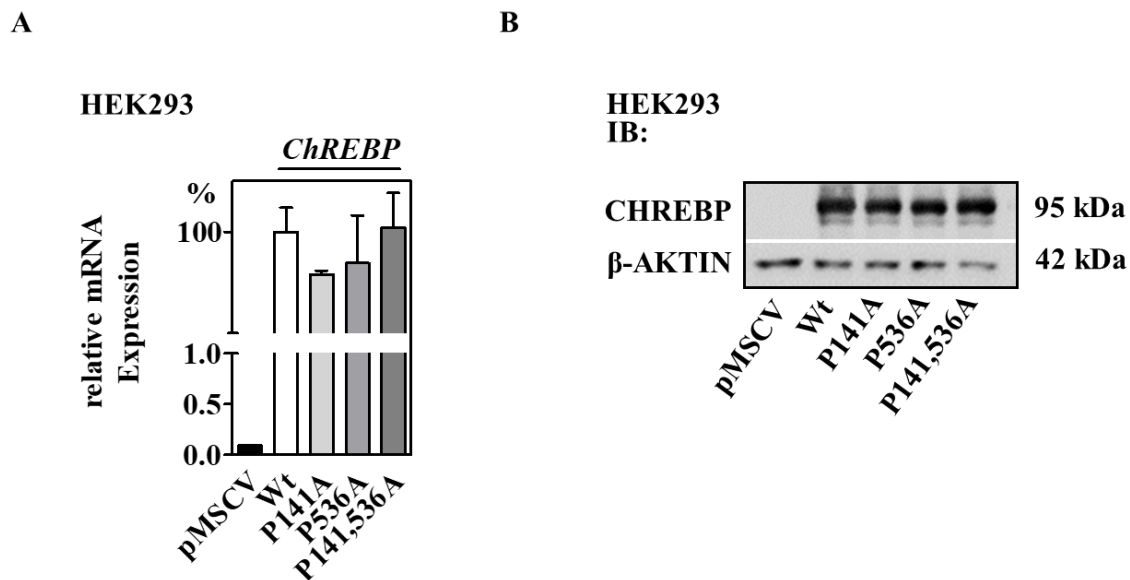


Abbildung 23: Kein Unterschied in der Proteinstabilität der ChREBP-Mutanten: A) qRT-PCR-Analyse und B) Western Blot Analyse von ChREBP nach Transfektion von ChREBP-Wildtyp(Wt) und der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie der Doppelmutante P141,536A) in HEK293-Zellen. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMSCV. Als Ladekontrolle diente bei der Western Blot Analyse β -Aktin. P = Prolin; A = Alanin; IB = Immunblot.

4.3.2.2 Einfluss der Prolin-Substitution auf ChREBP-Aktivität

Da kein Unterschied in der Proteinstabilität der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie der Doppelmutante P141,536A) gezeigt werden konnte, sollten die ChREBP-Mutanten in einem nächsten Schritt hinsichtlich ihrer transkriptionellen Aktivität untersucht werden.

Hohe Glukosekonzentrationen führen zu einer Aktivierung von ChREBP [21]. ChREBP bindet an ChoRE-Motive in den Promotorregionen der Zielgene, wie zum Beispiel *ACC1*, und induziert deren Genexpression [103, 104]. Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität der ChREBP-Mutanten, im Vergleich zum ChREBP-Wt, wurde durch ein Luziferase Assay in HEK293-Zellen analysiert. Hierfür wurde das ACC1-ChoRE-Luziferase-Reporterplasmid verwendet [89]. Durch Bindung von ChREBP an das ChoRE-Motiv wird das Enzym Luziferase exprimiert. Die im Anschluss gemessene Lichtemission ist proportional zur Luziferasemenge.

Hierfür wurden die ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie die Doppelmutante P141,536A) bzw. der ChREBP-Wt mit dem ACC1-ChoRE-Luziferase-Reporterplasmid in HEK293-Zellen koexprimiert. Vor Analyse wurden die HEK293-Zellen in Medium mit 2,5 mM bzw. 25 mM Glukose kultiviert.

Die generierten ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und die Doppelmutante P141,536A) sowie der ChREBP-Wt zeigten eine vergleichbare basale ChREBP-Aktivität bei niedriger Glukosekonzentration (Abbildung 24). Durch Änderung der Glukosekonzentration von 2,5 mM auf 25 mM konnte im Ansatz mit dem Leervektor pMSCV nur eine geringe Zunahme der Luziferase Aktivität nachgewiesen werden (Hintergrundniveau). Eine Überexpression von ChREBP-Wt führte hingegen zu einem starken Anstieg der Luziferase Aktivität durch Änderung der Glukosekonzentration von 2,5 mM auf 25 mM. Dabei war die Luziferase Aktivität von ChREBP-Wt signifikant höher als das Hintergrundniveau des Leervektors pMSCV bei einer Glukosekonzentration von 25 mM. Die ChREBP-Mutanten zeigten eine eingeschränkte (ChREBP-P536A) bzw. sehr stark dezimierte Luziferase Aktivität (ChREBP-P141A sowie die Doppelmutante ChREBP-P141,536A), durch Änderung der Glukosekonzentration von 2,5 mM auf 25 mM im Vergleich zum ChREBP-Wt.

HEK293

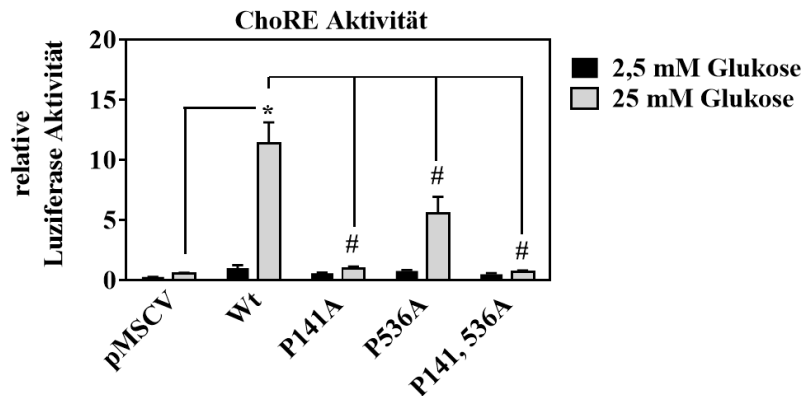


Abbildung 24: Verminderte Aktivität der ChREBP-Mutanten: Luziferase Assay nach Koexpression der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und der Doppelmutante P141,536A) und ChREBP-Wt mit den ACC1-ChoRE-Luziferase-Reporterplasmid in HEK293-Zellen. Die HEK293-Zellen wurden vor der Analyse für 24 h in Medium mit 2,5 mM bzw. 25 mM Glukose kultiviert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMSCV. ChoRE = *carbohydrate response element*, * Signifikanzniveau: $p < 0,05$: pMSCV zu ChREBP-Wt in 25 mM; # Signifikanzniveau: $p < 0,05$: ChREBP-Wt zu ChREBP-Mutanten in 25 mM.

4.3.2.3 Effekt der ektope Expression der ChREBP-Mutanten in einem ChREBP-defizienten System auf *Txnip*

Die ChREBP-Mutanten zeigten eine eingeschränkte (ChREBP-P536A) bzw. sehr stark dezimierte transkriptionelle Aktivität (ChREBP-P141A und die Doppelmutante ChREBP-P141,536A) im Vergleich zum ChREBP-Wt im Luziferase Assay. In einem physiologischerem Zellkontext sollten die ChREBP-Mutanten die Expression bekannter ChREBP-Zielgene weniger induzieren als der ChREBP-Wt.

Hierfür wurde eine ChREBP-defiziente murine Hepatozytenzelllinie AML12 verwendet, welche mittels CRISPR/Cas9-Technik [105] durch Diplom Ingenieur Matthias Münzner zuvor hergestellt wurde. Eine *guide* (g) ChREBP-RNA wurde hierfür mit der Endonuklease Cas9 zunächst in AML12-Zellen koexprimiert. Der Cas9-g ChREBP-RNA-Komplex bindet an die spezifische Ziel-DNA und die Cas9 erzeugt nahe der Bindungsstelle einen Doppelstrangbruch im *ChREBP*. Durch anschließende Reparaturmechanismen können Veränderungen im *ChREBP* in Form von Deletionen oder Insertionen auftreten. Diese Modifikationen können zu einer Inaktivierung von *ChREBP* führen. Die Überprüfung der ChREBP-defizienten AML12-Zellen erfolgte durch Sequenzierung (Daten nicht gezeigt) und Western Blot Analyse.

Die Deletion des ChREBP konnte zunächst mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 25A). Nach Überexpression der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie der Doppelmutante P141,536A) bzw. des ChREBP-Wt in den ChREBP-defizienten AML12-Zellen und anschließender Inkubation in Medium mit 2,5 mM bzw. 25 mM Glukose, wurde die mRNA Expression des bekannten ChREBP-Zielgens *Txnip* mittels qRT-PCR bestimmt. Als Negativkontrolle diente erneut der Leervektor pMSCV.

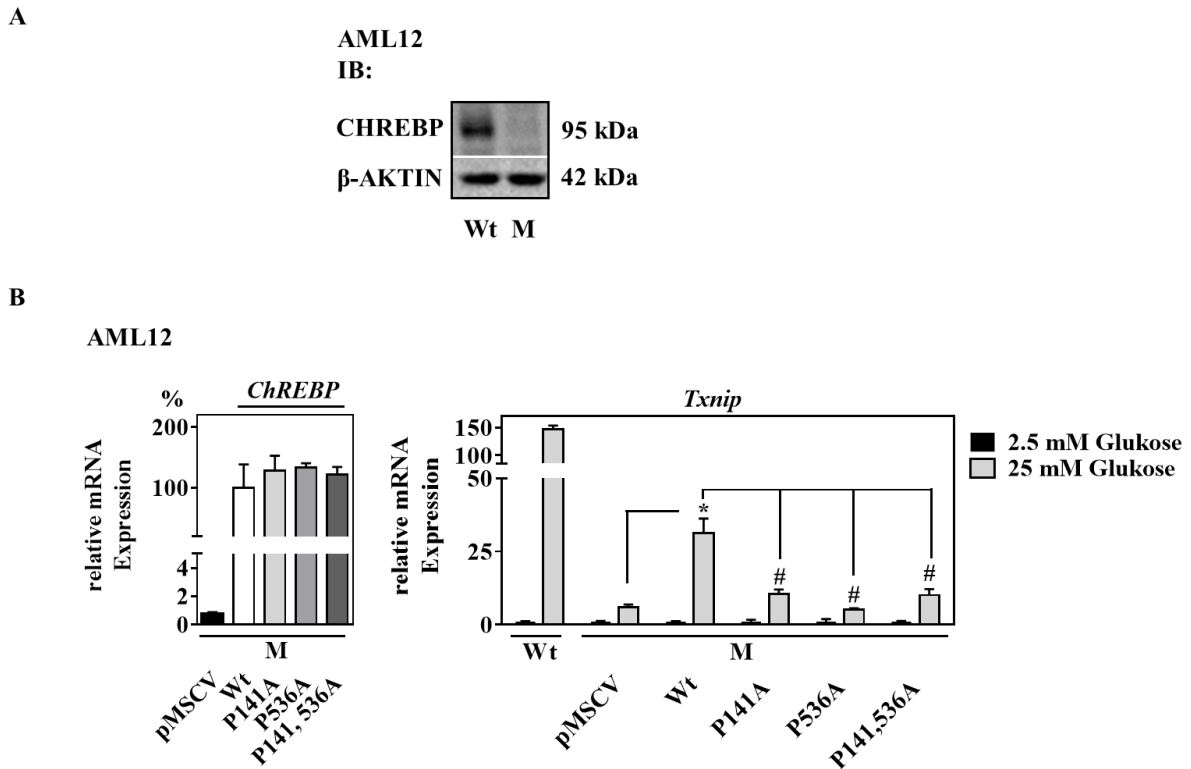


Abbildung 25: Effekt der ectopen Expression von ChREBP-Wt und der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A und der Doppelmutante P141,536A) in einem ChREBP-defizienten System auf das ChREBP-Zielgen *Txnip*: A) Western Blot Analyse der Proteinextrakte aus AML12-Zellen mit intaktem ChREBP (Wildtyp = Wt) bzw. der ChREBP-defizienten AML12-Zellen (Mutante = M). Als Ladekontrolle diente β-Aktin. B) qRT-PCR-Analyse von *ChREBP* und *Txnip* nach Transfektion von ChREBP-Wt und der ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie der Doppelmutante P141,536A) in den ChREBP-defizienten AML12-Zellen. Zur Analyse der *Txnip* Induktion wurden die transfizierten ChREBP-defizienten AML12-Zellen vor der Analyse für 24 h in Medium mit 2,5 mM bzw. 25 mM Glukose kultiviert. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMSCV. Zusätzlich wurde als Kontrolle AML12-Zellen mit intaktem ChREBP verwendet. P = Prolin; A = Alanin; IB = Immunblot, * Signifikanzniveau: $p < 0,05$: pMSCV zu ChREBP-Wt in 25 mM; # Signifikanzniveau: $p < 0,05$: ChREBP-Wt zu ChREBP-Mutanten in 25 mM.

In den AML12-Zellen mit intaktem ChREBP konnte ein starker Anstieg der *Txnip* mRNA Expression durch Änderung der Glukosekonzentration von 2,5 mM auf 25 mM gezeigt werden (Abbildung 25B). Die ChREBP-defizienten AML12-Zellen wiesen hingegen im Ansatz mit dem Leervektor pMSCV nur eine geringe Zunahme der *Txnip* mRNA Expression (Hintergrundniveau) auf. Durch Transfektion des ChREBP-Wt in den ChREBP-defizienten AML12-Zellen konnte die Expression der *Txnip* mRNA signifikant zum Hintergrundniveau des Leervektors pMSCV in 25 mM glukosehaltigen Medium erhöht werden. Die Überexpression der ChREBP-Mutanten in den ChREBP-defizienten AML12-Zellen zeigte hingegen, dass die Induktion der *Txnip* mRNA Expression durch 25 mM glukosehaltigem Medium signifikant geringer ist als mit ChREBP-Wt.

4.3.2.4 Auswirkung der Prolin-Substitution auf die ChREBP-EGLN3-Proteininteraktion

Eine Proteininteraktion von ChREBP- und EGLN3 konnte bereits in Vorarbeiten identifiziert werden [60]. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die Substitution am Prolin an Position 141 bzw. 536 im ChREBP eine Auswirkung auf die ChREBP-EGLN3-Proteininteraktion hat.

Hierfür wurden die Flag-markierten ChREBP-Mutanten (P141A, P536A sowie die Doppelmutante P141,536A) bzw. der ChREBP-Wt in HEK293-Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit ausschließlicher Transfektion des pMSCV-Plasmids als Negativkontrolle verwendet. Gleichzeitig erfolgte die Überexpression der EGLN3 durch adenovirale Infektion. Die Kontrollzellen erhielten Adeno GFP. Anschließend wurden die Flag-markierten Proteine durch Anti-Flag-Agarose-Beads präzipitiert und die Proteinextrakte mittels Western Blot Analyse untersucht.

Die Inputproben zeigten eine vergleichbare Überexpression der jeweiligen ChREBP-Mutante bzw. des ChREBP-Wt. Ebenfalls konnte die Überexpression der EGLN3 in den HEK293-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 26). Die Anreicherung der ChREBP-Mutanten bzw. ChREBP-Wt in den IP-Proben, mittels Anti-Flag-Agarose-Beads, war erfolgreich. Außerdem zeigte Gapdh, dass nicht gebundene Proteine in der IP-Probe nicht nachgewiesen werden konnten. Die IP-Probe ohne Überexpression eines Flag-markierten ChREBP ließ keine Bande detektieren. Die IP-Probe mit ausschließlicher Überexpression des ChREBP-Wt und der

Koexpression von GFP ließ keine EGLN3 nachweisen. Die IP-Probe mit Überexpression der EGLN3 und dem jeweiligen ChREBP (Wt, P141A, P536A und die Doppelmutante P141,536A) zeigte hingegen, dass die EGLN3 in allen Ansätzen als Interaktionspartner vergleichbar präzipitiert werden konnte.

HEK293
IB:

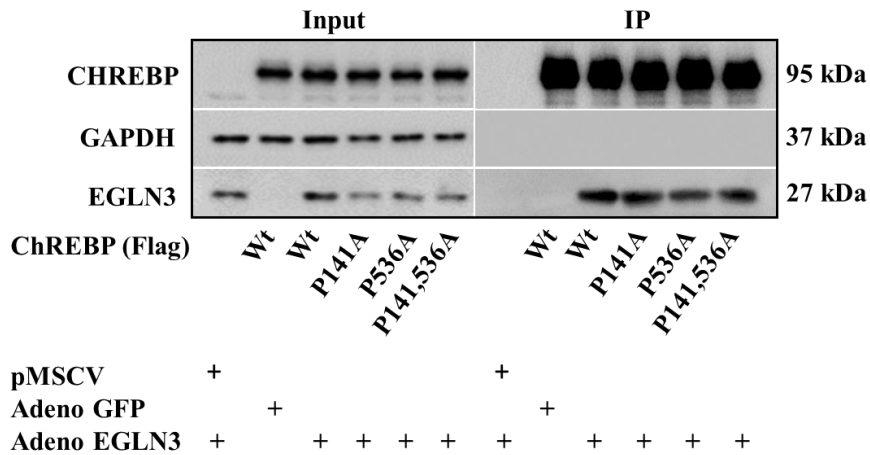


Abbildung 26: ChREBP-Mutanten zeigen keinen Unterschied in der Proteininteraktion mit der EGLN3: CO-IP aus HEK293-Zellen mit überexprimierten Flag-markierten ChREBP-Mutanten (P141, P536 und der Doppelmutante P141, 536) bzw. ChREBP-Wt und gleichzeitiger Koexpression von EGLN3 bzw. GFP, durch adenoviralen Gentransfer. Der Leervektor pMSCV wurde als Negativkontrolle verwendet. Als Ladekontrolle diente bei der Western Blot Analyse Gapdh. P = Prolin; A = Alanin; IB = Immunblot; IP = Immunpräzipitation.

5 Diskussion

5.1 Beteiligung der RetSat an der Entwicklung einer hepatischen Steatose

Vorversuche zu dieser Arbeit zeigten, dass eine hepatische RetSat-Depletion in adipösen Mäusen den gestörten Glukose- und Lipidstoffwechsel korrigiert. Aus diesen bisherigen Ergebnissen geht eine verminderte Aktivität von ChREBP infolge einer RetSat-Depletion in der Leber hervor [19]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterführende Experimente durchgeführt, um den vermuteten Zusammenhang von RetSat und ChREBP in der Leber noch näher zu untersuchen. Diese Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits zusammen mit den vorausgegangenen Arbeiten von Prof. Dr. Michael Schupp und Frau. Dr. Nicole Witte veröffentlicht [106].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hepatische *RetSat*-Expression, analog zur *ChREBP*-Expression [47, 107], in adipösen Mäusen erhöht ist und in humanen Leberproben mit dem BMI positiv korreliert. Zusätzlich konnte eine positive Korrelation zwischen humaner hepatischer *RETSAT*-Expression und dem Ausmaß einer hepatischen Steatose nachgewiesen werden. Damit wurden höhere *RETSAT* mRNA Expressionen mit steigendem BMI sowie dem Ausmaß einer Leberverfettung festgestellt. Eine gesteigerte hepatische Expression der *RetSat* und *ChREBP* infolge von Adipositas sowie ein vergleichbares Expressionsmuster in den verschiedenen Organen [19], weist auf ein Zusammenwirken beider Proteine in der hepatischen Lipogenese hin. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen RetSat und ChREBP konnte bereits durch Dr. Witte in primären Maushepatozyten gezeigt werden. In RetSat-depletierten Maushepatozyten konnte die verminderte mRNA Expression von ChREBP-Zielgenen durch ektopische Expression von ChREBP partiell wieder gesteigert werden. Dies bestätigt, dass die verminderte mRNA Expression der ChREBP-Zielgene infolge einer RetSat-Depletion über ChREBP vermittelt ist [19]. Durch Analyse der humanen Leberproben konnten erste Hinweise aufgezeigt werden, dass die bisherigen zell- und tierexperimentellen Ergebnisse der Effekte einer verminderten hepatischen RetSat-Expression auf den Menschen übertragbar sein könnten.

Etwa 30 % der Leberfette von NAFLD-Patienten stammen allein aus einer gesteigerten hepatischen Lipogeneserate [108]. Der Zusammenhang von einer erhöhten hepatischen Lipogeneserate und der ChREBP-Aktivität wurde in *ob/ob*-Mäusen untersucht. Neben dem Adipositas-Modell stellen *ob/ob*-Mäuse auch ein Modell zur Untersuchung einer hepatischen Steatose dar, da sie infolge gesteigerter glykolytischer und lipogener Stoffwechselwege eine

hepatische Steatose entwickeln [44]. Diese *ob/ob*-Mäuse zeichnen sich durch eine erhöhte hepatische *ChREBP*-Expression und nukleäre ChREBP-Proteinmenge im gefütterten sowie im gefasteten Zustand aus [47]. Da eine Überstimulation von ChREBP mit der Entstehung einer hepatischen Steatose assoziiert wird [44 – 47], liegt die Vermutung nahe, dass die RetSat durch Beeinflussung der ChREBP-Aktivität an der Entstehung einer hepatischen Steatose beteiligt ist. Diese Vermutung unterstützt, dass mit steigendem Expressionsniveau der humanen *RETSAT* ebenfalls höhere Expressionen der ChREBP-Zielgene *PKLR* und *ACCI* in der Leber festgestellt werden konnten.

Die Effekte der in der Literatur beschriebenen hepatischen ChREBP-Defizienz in adipösen Mäusen, wurden ebenfalls durch eine hepatische Depletion der RetSat in Vorarbeiten beobachtet. So führte eine hepatische RetSat-Depletion in Diät-induzierten adipösen Mäusen zu einer reduzierten Lipogenese und damit u. a. zur Reduktion der Serum- und Lebertriglyzeride [19]. Die Abnahme der Lebertriglyzeride konnte durch diese Arbeit mittels Lipidfärbung bestätigt werden. Die hepatische RetSat-Depletion verbesserte die durch Hochfettdiät-induzierte hepatische Steatose. Dieser Effekt konnte ebenfalls in *ob/ob*-Mäusen mit ChREBP-Depletion gezeigt werden. Eine Reduktion der ChREBP-Zielgene, wie *FASN*, *ACCI* und *SCDI*, führte zu einer verminderten hepatischen Lipogenese, was zu einem reduzierten Leberfettgehalt führte. Der Rückgang der hepatischen Steatose in *ob/ob*-Mäusen mit ChREBP-Depletion verbesserte die Insulinsensitivität der Leber, was zur Abnahme der Blutglukosewerte und damit zur verbesserten Glukosetoleranz führte [47].

In Diät-induzierten adipösen Mäusen verbesserte eine RetSat-Depletion ebenfalls die gestörte Glukosetoleranz, wodurch der ChREBP-RetSat-Zusammenhang weiter verstärkt wird. Dabei wiesen die adipösen Mäuse mit RetSat-Depletion basal sowie auch im Verlauf des ipGTT geringere Blutglukosewerte als die Kontrollgruppe auf. Dies bestätigt, die in Vorarbeiten bereits erzielten Ergebnisse der geringeren *ad libitum* gefütterten- bzw. gefasteten Blutglukosewerte adipöser Mäuse mit RetSat-Depletion [19]. Im Unterschied zur ChREBP-Defizienz in *ob/ob*-Mäusen [47] führte eine RetSat-Depletion in adipösen Mäusen jedoch nicht zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität. Im gesunden Organismus bewirkt Insulin die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB/Akt) durch Phosphorylierung der Aminosäuren Serin an Position 473 und Threonin an Position 308 [102]. Die aktivierte Akt kontrolliert folgend u. a. den Glukosetransport und die Glykogensynthese [102, 109, 110]. Eine Akkumulation von Lipiden in der Leber führt hingegen zur Störung des Insulin-Signalweges [111] und damit zur verminderten

Phosphorylierung der Akt. Die Betrachtung des Insulin-Signalweges der adipösen Mäuse der Kontrollgruppe sowie der mit hepatischer RetSat-Depletion zeigte eine vergleichbare insulinabhängige Phosphorylierung der Akt. Damit hatte die hepatische RetSat-Depletion keinen Einfluss auf die insulinabhängige Phosphorylierung der Akt in diesem adipösen Mausmodell.

Dies erscheint zunächst unerwartet, da ein Rückgang der hepatischen Steatose infolge der hepatischen RetSat-Depletion und eine verbesserte Glukosetoleranz ebenfalls eine verbesserte Insulinsensitivität vermuten lässt. Zwar wird in der Mehrzahl der Fälle eine hepatische Steatose mit Insulinresistenz assoziiert [112], jedoch zeigten auch Studien, dass eine Akkumulation von Lipiden in der Leber nicht immer zur hepatischen Insulinresistenz führen muss [113 – 118]. Auch im Falle von ChREBP führte eine adenovirale Überexpression von dephosphoryliertem ChREBP an Ser196 und Thr666 in der Leber zwar zum Anstieg der Lebertriglyzeride und zur Entwicklung einer hepatischen Steatose, jedoch ohne das Auftreten einer Insulinresistenz [118].

Unerwartet war zusätzlich, dass die RetSat-depletierten Mauslebern einen höheren basalen Phosphorylierungsgrad der Aminosäure Serin 473 im Akt aufwiesen. Höhere basale Akt-Phosphorylierungen deuten zwar auf eine Insulinresistenz hin [119], jedoch konnte dies im ipITT nicht bestätigt werden. Da die hepatische RetSat-Depletion keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität hat, könnte die erhöhte basale Akt-Phosphorylierung auf eine Beeinflussung anderer Akt-abhängiger Stoffwechselwege hindeuten. Neben der Beeinflussung des Glukosetransportes und der Glykogensynthese, spielt die Akt auch eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, beim Zellwachstum und bei der Inaktivierung proapoptischer Faktoren [120]. Damit stellt die Aktivierung der Akt einen zentralen Regulationsmechanismus bei der Krebsentstehung dar. Eine Akt-Aktivierung begünstigt das Tumorzellüberleben durch eine erhöhte Angiogenese, Metastasierung, Gewebeinvasion und einer Umgehung der Immunabwehr [121] und wird für eine Vielzahl humaner Tumorerkrankungen beschrieben [122]. Ob die RetSat möglicherweise eine Rolle in der Krebsentstehung besitzt ist derzeitig noch nicht aufgeklärt. Interessanterweise wurde in einer Studie mittels *whole exome sequencing* eines Sarkoms der Zunge zwei *Missense*-Mutationen im *RETSAT*-Gen identifiziert [123], was einen potentiellen Zusammenhang vermuten lässt.

Auch ChREBP wurde in neueren Studien mit der Tumorgenese und Krebspathologie in Verbindung gebracht. Beispielsweise konnte beim Mammakarzinom eine deutliche Zunahme der ChREBP-Expression mit der malignen Progression, mittels Immunhistochemie, gezeigt werden [124]. Es ist bekannt, dass sich Krebszellen durch einen veränderten Glukose-

stoffwechsel auszeichnen. Demnach nutzen die Krebszellen vorwiegend die Glykolyse zur ATP-Gewinnung anstelle der oxidativen Phosphorylierung und weisen damit hohe Laktatkonzentrationen auf (Warburg-Effekt oder auch aerobe Glykolyse der Krebszellen) [125]. Die Autoren von Tong *et al.* zeigten, dass ChREBP für die Proliferation von Darmkrebszellen benötigt wird. Eine verminderte ChREBP-Expression führte neben einer reduzierten Triglyzerid- und RNA-Synthese auch zu Einschränkungen im Anabolismus und in der aeroben Glykolyse der Krebszellen. Außerdem konnte eine gesteigerte oxidative Phosphorylierung nachgewiesen werden. Zusätzlich führte die Hemmung von ChREBP zu einer p53-Aktivierung und induzierte den Arrest der Darmkrebszellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ChREBP eine Rolle bei der Unterdrückung der p53-Aktivität sowie bei der Verschiebung des Glukosestoffwechsels von der oxidativen Phosphorylierung zur aeroben Glykolyse in Krebszellen spielt [126]. Interessanterweise konnte Dr. Witte zeigen, dass eine hepatische RetSat-Depletion in primären Maushepatozyten ebenfalls zu einer Zunahme der oxidativen Phosphorylierung führt [19]. Die Studienlage deutet insgesamt auf eine Beteiligung der RetSat an der Krebsentwicklung hin, möglicherweise auch im Zusammenwirken mit ChREBP.

Metabolische Erkrankungen, wie die NAFLD, sind häufig mit einer gesteigerten Lipogenese in der Leber assoziiert. Eine Inhibition der hepatischen RetSat durch Beeinflussung der ChREBP-Aktivität könnte einen therapeutischen Nutzen zur Senkung von Serum- und Lebertriglyzeriden und damit zur Behandlung einer hepatischer Steatose, Dyslipidämien sowie einer Hyperglykämie haben [106].

5.2 RetSat reguliert die nukleäre Anreicherung von ChREBP

Die verminderte ChREBP-Aktivität infolge der RetSat-Depletion in der Leber [19] konnte durch eine verminderte nukleäre Anreicherung von endogenem ChREBP in RetSat-depletierten primären Maushepatozyten bei hohen Glukosekonzentrationen erklärt werden. Der genaue Mechanismus konnte nicht identifiziert werden.

Da insbesondere posttranslationale Modifikationen von ChREBP dessen nukleäre Anreicherung bei hohen Glukosekonzentrationen beeinflussen, wird eine RetSat abhängige EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierung im ChREBP als Mechanismus vermutet. Damit könnte die Prolinhydroxylierung die nukleäre Anreicherung von ChREBP verstärken. Die Identifizierung der EGLN3 als stärkstes RetSat-reguliertes proteinmodifizierendes Enzym, durch die

Auswertung eines Expressionsarrays RetSat-depletierter primärer Maushepatozyten, stellte dabei den Ausgangspunkt dar [19]. Die Rolle der Prolinhydroxylierung im ChREBP wird im Kapitel 5.4 näher betrachtet.

Andererseits könnte die RetSat auch an der Herstellung von ChREBP-aktivierenden Metaboliten bzw. an der Degradation von ChREBP-hemmenden Metaboliten beteiligt sein. Da die Effekte einer hepatischen RetSat-Depletion auf die ChREBP-Aktivität unabhängig vom identifizierten Produkt 13,14-Dihydroretinol sind, deutet dies auf weitere enzymatische Funktionen bzw. Produkte hin [19]. Es wird vermutet, dass RetSat an der Degradation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren beteiligt ist [127]. Interessanterweise zeigten die Autoren von Dentin *et al.*, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, die Aktivität von ChREBP hemmen. Zum einen sollen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren die Reifung und Stabilität der mRNA von ChREBP vermindern oder/und deren Degradation steigern. Zum anderen sollen sie die DNA-Bindung von ChREBP sowie dessen nukleäre Anreicherung infolge hoher Glukosekonzentrationen hemmen [49]. Damit könnte die reduzierte ChREBP-Aktivität infolge der hepatischen RetSat-Depletion auch in einem Anstieg an mehrfach ungesättigten Fettsäuren begründet sein. Da die durchgeführte Fixierung, innerhalb der Immunfärbung, die Sekundärstruktur von Proteinen beeinflussen kann [128], mussten die verwendeten Antikörper für ChREBP und RetSat zunächst hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht werden. Durch Überexpression von ChREBP in primären Maushepatozyten konnte eine Zunahme des ChREBP-, durch RetSat-Depletion eine Abnahme des RetSat-Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Diese erwartungsgemäße dynamische Regulierung des Fluoreszenzsignals für RetSat und ChREBP bestätigte die Spezifität der verwendeten Antikörper.

5.3 Generierung einer konditionalen RetSat *knockout*-Mauslinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem FEM erfolgreich eine konditionale RetSat *knockout*-Mauslinie generiert. Die dabei angewandte Strategie beruhte auf dem Cre/loxP-Rekombinationssystem [97, 98]. Dabei wurden die Exons zwei und drei des *RetSat*-Allels durch zwei loxP-Stellen flankiert (gefloxt). Aufgrund der geringen Größe und des Integrationsortes der loxP-Stellen bleibt die RetSat-Expression in den geflochten RetSat-Mäusen zunächst ungestört. Erst durch Expression der Rekombinase Cre wird der gefloxt DNA-

Abschnitt exzidiert [129], und die Translation der *RetSat* wird durch ein früh auftretendes Stoppkodon beendet. Dabei ist das Ausmaß der *RetSat*-Deletion nur von dem Expressionsprofil der Rekombinase Cre abhängig. Eine dauerhafte Cre-Expression kann aufgrund von „Pseudo-loxP-Stellen“ im Säuger genom zu pleiotropen Effekten führen [130 – 132]. Daher werden induzierbare Rekombinasen, die eine zeitliche Kontrolle der Rekombinase-Expression ermöglichen, häufig eingesetzt [133]. Aufgrund der großen Anzahl induzierbarer gewebsspezifischer Cre-rekombinanter-Mauslinien besteht die Möglichkeit, durch Kreuzung einer gewebsspezifischen Cre-Mauslinie mit der neu generierten *RetSat*-Mauslinie, eine *RetSat*-Deletion in jedem beliebigen Organ zeitlich kontrolliert zu erzeugen [134]. Mit den bisher vorhandenen *RetSat*-Mausmodellen lassen sich Fragen der organspezifischen *RetSat*-Funktion nicht bzw. nicht ausreichend beantworten.

Erste Studien aus dem Jahr 2010 basieren auf Untersuchungen eines Mausmodells mit einem *RetSat* Ganzkörper-*knockout*. Diese *RetSat*-Mäuse zeichnen sich durch eine veränderte Körperzusammensetzung (Muskel/Fettgewebe), mit einem höheren Anteil an Fettgewebe, aus. Ein spezifischer Phänotyp konnte in diesem *RetSat*-Mausmodell nicht beobachtet werden. Allerdings beruht die metabolische Charakterisierung der *RetSat*-Maus mit Ganzkörper-*knockout* lediglich auf den Vergleich von heterozygoten und homozygoten *RetSat*-Mäusen. Der Vergleich mit Wildtyp-Mäusen fehlt [135]. Des Weiteren kann eine konstitutive Ausschaltung von Genen während der Entwicklung auch zu kompensatorischen Prozessen führen [136]. So wäre es vorstellbar, dass in diesem Mausmodell mit *RetSat* Ganzkörper-*knockout* die Funktion der *RetSat* durch andere Enzyme übernommen wurde.

In einem Mausmodell mit akuter hepatischer *RetSat*-Depletion in adipösen Mäusen konnte hingegen eine physiologische Rolle der *RetSat* im hepatischen Glukose- und Fettstoffwechsel gezeigt werden [106]. Jedoch waren die Effekte einer hepatischen *RetSat*-Depletion, aufgrund der Adenovirus-vermittelten siRNA-Expression, nur innerhalb eines begrenzten Zeitraumes (maximal zehn Tage nach Virusapplikation) möglich [137]. Damit konnte der Langzeiteffekt einer hepatischen *RetSat*-Deletion bisher noch nicht untersucht werden. Zudem besitzen Adenoviren toxische und immunogene Eigenschaften [138, 139], welche zu Fehlinterpretationen führen können.

Neben der traditionellen Genmodifikation mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen werden auch in neueren Ansätzen spezifische Nukleasen verwendet, um transgene Mäuse zu generieren [140 – 142]. Die Nukleasen erzeugen sequenzspezifische Doppelstrang-

brüche in der DNA, die unter Ausnutzung der zelleigenen Reparaturmechanismen zu spezifischen Mutationen, wie Deletionen oder Insertionen, führen. Dabei sind die eingesetzten Zinkfingernukleasen und transkriptionsaktivatorartige Effektor-nukleasen (TALEN) keine natürlich vorkommenden Enzyme, sondern müssen zunächst generiert werden. Zwar konnten bereits Ratten mit konditionalem Gen *knockout* durch Zinkfingernukleasen erzeugt werden [143], allerdings ist auch deren Design und Generierung komplex und zeitaufwendig. Schneller und einfacher können transgene Tiere durch die neuere CRISPR/Cas9-Technik generiert werden [144]. Die natürlich vorkommende Nuklease Cas9 erkennt anhand einer RNA-Matrize den komplementären DNA-Strang und vollzieht einen DNA-Doppelstrangbruch, wodurch Gene entfernt, eingefügt oder ausgeschaltet werden können [105]. Der entscheidende Vorteil gegenüber den Zinkfingernukleasen und TALEN: Es muss kein neues Protein für die jeweilige Zielsequenz neu generiert werden. Lediglich die RNA-Matrize muss an die Zielsequenz angepasst werden. Auch gefloxt transgene Mäuse konnten bereits erfolgreich mittels CRISPR/Cas9 generiert werden [144 – 147]. Damit stellt die CRISPR/Cas9-Technik eine zeit- und kostensparende Alternative zur hier verwendeten traditionellen Genmodifikation, mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen, dar.

5.3.1 Etablierung der konditionalen *RetSat knockout*-Maus

Seit 1989 stellt die homologe Rekombination in embryonalen Stammstellen eine Möglichkeit zur gezielten Veränderung von Genen in Mäusen dar [148]. Auch das *RetSat* flox-Konstrukt konnte durch diese Methode erfolgreich in den murinen *RetSat*-Genlocus integriert werden. Zur Selektion der ES-Zellen nach Elektroporation mit dem *RetSat* flox-Konstrukt fand zunächst eine Positiv-Negativ-Selektion statt (Kapitel 3.5), welche äußerst effizient Zufallsintegrationen aussortiert [149, 150]. Durch Kombination eines positiven- (Neo) mit einem außerhalb der homologen Bereiche gelegenen negativen (DTA) Selektionsmarkers, kann der Anteil der homologen rekombinanten Zellklone um das 10- bis 1000-fache erhöht werden [151, 152]. Von insgesamt 72 vorselektierten ES-Klonen konnten acht ES-Klone mit korrekter einmaliger homologer Rekombination für den 5' Arm und 3' Arm im *RetSat*-Genlocus identifiziert werden. Dies entspricht einer Rekombinationsfrequenz von 11,1 %.

Eine homologe Rekombination ist ein seltenes Ereignis, wobei die Rekombinationsfrequenz von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist. Zum einen ist die vorherrschende Chromatin-

struktur am Integrationsort von entscheidender Bedeutung [153], zum anderen haben die verwendeten Sequenzhomologien des Targeting-Vektors einen erheblichen Einfluss. Dabei erhöht die Länge der Homologiearme die Rekombinationsfrequenz [154]. Der Homologiebereich sollte zwischen 5 bis 15 kb groß sein, um eine effiziente homologe Rekombination gewährleisten zu können [154 – 156]. Das RetSat flox-Konstrukt beinhaltet eine Sequenzhomologie von etwa 9 kb und liegt damit in der empfohlenen Größenordnung. Studien zeigten auch, dass C57BL/6-abgeleitete ES-Zelllinien eine hohe Rekombinationsfrequenz aufweisen [157, 158]. Die hier verwendete embryonale Stammzelllinie IDG 3.2 (C57Bl/6J x 129S6/SvEvTac/F1-Hybrid) besitzt einen 50%igen C57Bl/6J-Hintergrund. Generell weisen F1-Hybrid-ES-Zellen eine höhere Effizienz als gewöhnliche Inzucht ES-Zellen auf [158, 159]. Während reine C57Bl/6-ES-Zellen aufwändige Kultivierungsbedingungen benötigen, um die Keimbahnfähigkeit beizubehalten [95, 160], zeigten sich bei ES-Zelllinien aus 129er-Unterstämmen häufig Probleme, wie schlechte Zuchterfolge [157]. Zusätzlich stammen die ES-Zellen der 129er-Mauslinie von unterschiedlichen 129er-Unterstämmen ab, wodurch eine unerwünschte Variabilität im genetischen Hintergrund der transgenen Mäuse entsteht [161]. Die Verwendung einer F1-Hybrid-ES-Zelle aus C57Bl/6J und 129S6/SvEvTac bietet daher den Vorteil einer genetisch und phänotypisch stabileren Mauslinie sowie einer verbesserten Fertilität bei der Zucht [157, 162, 163]. Letztendlich bestimmt auch die Quantität und Qualität der genomischen DNA der ES-Zellen die Rekombinationsfrequenz. Da in einigen Fällen die genomische DNA nicht ausreichend für ein aussagekräftiges Southern Blot Signal war (Zellklon 7), blieben weitere homolog rekombinierte Zellklone möglicherweise unentdeckt, welche zu einer noch besseren RetSat flox-Rekombinationsfrequenz geführt hätten.

Zwei der acht bestätigten ES-Zellklone wurden für die Blastozysteninjektion ausgewählt und in pseudogravide C57Bl/6N-Mäuse transferiert. Daraus entwickelten sich sieben Chimären (Chimärenrate 31,8 %) mit einem Chimärismus zwischen 70 und 100 %. Der Chimärenanteil, der durch die Fellfarbe reflektiert wird, stimmt dabei größtenteils mit der prozentualen Verteilung des Chimärismus in den Geweben und Organen überein [164]. Da sich aus weiblichen embryonalen Zellen (Blastozysten) und männlichen manipulierten ES-Zellen sehr häufig männliche Chimäre entwickeln [165], war es nicht überraschend, dass sechs der sieben erhaltenen Chimären männlich waren (männliche Chimärenrate 86 %). Drei dieser Chimären zeigten nach Verpaarung mit C57Bl/6J-Mäusen die erwünschte Keimbahntransmission auf, d. h. sie vererbten das RetSat flox-Konstrukt an ihre Nachkommen weiter. Aus der Chimäre

sechs gingen keine Nachkommen hervor, was höchstwahrscheinlich in einer Infertilität der Chimäre begründet war. Da die verwendeten ES-Zellen einen männlichen Karyotyp besitzen, wurden ausschließlich männliche Chimären für die Verpaarung mit C57Bl/6J-Mäusen verwendet. Weibliche Chimären sind häufig infertil und weisen keine Keimbahntransmission auf [97].

Das verwendete RetSat flox-Konstrukt bietet die Möglichkeit eine konventionelle RetSat *knockout*-Maus (Ganzkörper-*knockout*) sowie eine konditionale RetSat *knockout*-Maus zu generieren. Durch die Kombination von Flp/Frt- und Cre/loxP-Rekombinationssystemen können nacheinander unterschiedliche DNA-Abschnitte entfernt werden [166]. Das RetSat flox-Konstrukt besitzt eine Frt-flankierte Selektionskassette, bestehend aus der promotorlosen Reporter-kassette (SA-LacZ-pA) und der Neomycin(Neo)-Kassette mit eigenem Promotor, die für die Selektion der ES-Zellen benötigt wurde. Durch Integration der Reporter-genkassette im ersten Intron der *RetSat* wird diese mit dem Transkript der *RetSat* posttranskriptional fusioniert und kann damit die gewebsspezifische Expression der RetSat aufzeigen. Gleichzeitig wird das Fusionstranskript am Polyadenylierungssignal (pA) beendet, sodass die Exons zwei bis elf der *RetSat* nicht länger translatiert werden sollten. In der Regel führt damit die Integration der Reporter-kassette zu einem ausgeschalteten Gen (*knockout-first* Allel) [167, 168]. Während bei Heterozygotie noch ein Wildtyp Allel mit funktionierender RetSat dem Organismus zur Verfügung steht, sollten homozygote Mäuse eine RetSat-Deletion im gesamten Organismus (*knockout-first* Maus) aufweisen. Bei der Analyse der *knockout-first* Maus konnte eine Deletion der hepatischen RetSat auf RNA und Proteinebene bestätigt werden. Für die Generierung der konditionalen RetSat *knockout*-Maus wurden nun die heterozygoten Nachkommen der Keimbahnchimären mit *knockout-first* Allel mit einer heterozygoten Flp-rekombinanten-Mauslinie verpaart. Die exprimierte Rekombinase Flippase (Flp) exzidiert die Frt-Stellen- flankierte Selektionskassette (konditionales Allel) [96]. Neben der Reporter-kassette wurde die Neo-Kassette ebenfalls entfernt, da einige Studien einen negativen Einfluss auf benachbarte Genabschnitte aufgrund der starken Promotorsequenz belegen [169, 170].

Bei der Untersuchung von transgenen Mäusen ist es wichtig, dass sich die zu untersuchenden Tiere lediglich durch das manipulierte Gen unterscheiden. Erste Studien in den 70er Jahren zeigten bereits einen Unterschied in der Ausprägung der Mutation im Diabetes (*db*) bzw. *obese* (*ob*)-Genlokus, in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mäuse auf. Während Mäuse mit C57Bl/6J-Hintergrund Adipositas und einen milden Diabetes aufwiesen, entwickelten die

Mäuse mit C57Bl/KsJ-Hintergrund Adipositas mit einem deutlich diabetischen Phänotyp [171, 172]. Mehrfach konnte nachfolgend der Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Ausprägung eines Phänotyps bestätigt werden. So wurden beispielsweise unterschiedliche Effekte auf die Glukosehomöostase in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund nachgewiesen. C57Bl/6J-Mäuse zeigten signifikant höhere *ad libitum* sowie Nüchternblutglukosewerte gegenüber den DBA/2-Mäusen und entwickelten nach intraperitonealer Glukoseinjektion ebenfalls höhere Blutglukosewerte [173].

Da bei der Generierung der RetSat-Chimären ES-Zellen mit Mischhintergrund (C57Bl/6J x 129S6/SvEvTac/F1-Hybrid) sowie Blastozysten mit C57Bl/6N-Hintergrund verwendet wurden, weisen diese Chimären eine große Variabilität im genetischen Hintergrund auf. Die Rückkreuzung auf einen einheitlichen genetischen Hintergrund ist daher sinnvoll. Hierfür wurden die RetSat-Mäuse mit konditionalem Allel mit Mäusen des Inzuchtstammes C57Bl/6J verpaart. Ein Vorteil der Mäuse mit C57Bl/6-Hintergrund ist die Anfälligkeit für fütterungsbedingte Fettleibigkeit und Hyperglykämie [174]. Damit eignet sich dieser genetische Hintergrund sehr gut für die geplanten metabolischen Untersuchungen der konditionalen RetSat *knockout*-Mauslinie. In der Regel erhält man nach zehn Rückkreuzungen eine genetische Uniformität (> 99,9 %) und damit eine kongene Mauslinie [175]. Der gewünschte C57Bl/6J-Hintergrund besitzt als alleiniges Merkmal eine Deletion der Exons sieben bis elf im *nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt)*-Gen [80] und stellte damit das gewünschte Rückkreuzungsziel dar. Während in den ES-Zellen mit Mischhintergrund und in Nachkommen der ersten Rückkreuzung (F1) eine Deletion des Exons neun der *Nnt* nicht gezeigt werden konnte, wiesen Nachkommen der sechsten Rückkreuzung (F6) diese Deletion auf. Laut Literatur ist aber erst von einer genetischen Uniformität von lediglich 98,44 % nach sechs Rückkreuzungen auszugehen. Allerdings kommt hinzu, dass durch Verwendung der F1-Hybrid-ES-Zellen aus C57Bl/6J x 129S6/SvEvTac bereits zu Beginn ein 50%iger C57Bl/6J-Hintergrund vorhanden war. In Kombination mit der nachgewiesenen Deletion des gewünschten C57Bl/6J-Hintergrunds der F6 und den Erfahrungswerten von Dr. Geert Michel vom FEM, kann von einer konditionalen RetSat *knockout*-Mauslinie mit nahezu genetisch identischem Hintergrund ausgegangen werden. Damit wurde mit der Etablierung einer homozygoten RetSat-Mauslinie mit konditionalem Allel begonnen.

Neuere Verfahren ermöglichen derzeit bereits die Generierung von kongenen Mauslinien innerhalb von fünf Generationen und bieten damit eine zeitsparende Alternative zu konven-

tionellen Rückkreuzungen an. Mittels Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) werden die weiblichen Nachkommen der F1-Generation mit der höchsten genetischen Uniformität im gewünschten genetischen Hintergrund identifiziert und eine Superovulation durch Hormongabe ausgelöst. Nach Verpaarung mit einem männlichen transgenen Nachkommen der F1-Generation erfolgt der Embryotransfer in weibliche Mäuse des gewünschten genetischen Hintergrunds. Die weiblichen Nachkommen werden erneut hinsichtlich ihrer genetischen Uniformität durch SNPs selektiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis eine kongene Mauslinie (genetische Uniformität > 99,9 %) generiert wurde [176].

5.3.2 Funktioneller Test der konditionalen RetSat *knockout*-Maus

Die Effizienz der Cre-vermittelten Rekombination des geflochten Genlokus ist von einigen Faktoren, wie der Lokalisation des geflochten Genlokus [177], vom Abstand zwischen den loxP-Stellen [178] sowie von der *Spacer*-Region der loxP-Stelle [179], abhängig. Zusätzlich ist eine ausreichende Cre-Expression notwendig, um die Deletion des geflochten Genes vollziehen zu können. Um zu testen, ob die loxP-Sequenzen *in vivo* funktionell sind und welche Cre-Rekombinase-Konzentration benötigt wird, erfolgte eine AAV-vermittelte Expression der Cre-Rekombinase in homozygoten RetSat-Mäusen mit konditionalem Allel in der Leber.

In diesem Vorversuch konnte die genetische Inaktivierung der *RetSat* infolge der Cre-vermittelten Rekombination in der Leber bestätigt werden. Dabei wird eine AAV-Menge von mindestens $1,4 \times 10^{10}$ Genompartikel/ml benötigt, um eine deutliche hepatische Reduktion der RetSat-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (AAV GFP) zu erzielen. Die höhere und vergleichbare RetSat-Expression in der Kontrollgruppe zeigte, dass die Expression der RetSat nicht durch verbliebene Rekombinationsstellen (Abbildung 8) gestört wird. Diese Überprüfung ist notwendig, da die verbliebenen Rekombinationsstellen aufgrund des Integrationsortes das Spleißen eines Gens negativ beeinflussen können [180].

Das zur Analyse verwendete Lebergewebe besteht neben einem Anteil von etwa 80 % aus Hepatozyten auch aus anderen Zellen, wie u. a. Endothelzellen, Blutzellen oder Kupfferzellen. Der verwendete leberspezifische Promotor LP1 vermittelt lediglich die Expression der Cre-Rekombinase in den Hepatozyten [92], wodurch die noch detektierbare Menge an *RetSat* mRNA und RetSat-Protein begründet sein könnte. Zwar könnte eine Erhöhung der verwendeten

AAV Cre-Menge die Rekombinationseffizienz der Cre-Rekombinase möglicherweise noch erhöhen, jedoch wurden auch toxische Effekte einer exzessiven Expression der Cre-Rekombinase gezeigt. Neben DNA-Schäden, wie Verlust, Inversion oder Brüche von Chromatiden, wurde eine verminderte Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate infolge einer Cre-Rekombinase-Expression nachgewiesen [181 – 183]. Die Effizienz der verwendeten AAV Cre-Menge von $1,4 \times 10^{10}$ Genompartikel/ml genügt für anschließende Untersuchungen einer hepatischen RetSat-Deletion.

5.4 Prolinhydroxylierung als neue posttranslationale Modifikation von ChREBP

Aus Vordaten zu dieser Arbeit war bereits bekannt, dass eine verminderte EGLN3-Expression in primären Maushepatozyten und in Mauslebern zu einer Reduktion bekannter ChREBP-Zielgene führte [19, 60]. Die Herunterregulation der ChREBP-Zielgene infolge der EGLN3-Depletion konnte durch eine Reduktion der transkriptionellen Aktivität von ChREBP erklärt werden. Da die EGLN3 posttranslationale Modifikationen in Form von Prolinhydroxylierungen in ihren Zielproteinen katalysiert [61], wurde ChREBP mittels Massenspektrometrie hinsichtlich vorhandener Prolinhydroxylierungsstellen untersucht. Dabei konnten insgesamt sechs Prolinhydroxylierungen (P141, P212, P370, P392, P414 und P536) in endogenem ChREBP aus murinen Lebergewebe eindeutig identifiziert werden [60].

Jedoch stellt die EGLN3 nicht das einzige Enzym dar, welches Prolinhydroxylierungen in Proteinen vollziehen kann. Zu den Prolylhydroxylasen gehören, neben den zwei anderen Isoformen EGLN1 und EGLN2, noch zwei weitere Procollagenprolin-Dioxygenasen (Prolyl-3-Hydroxylase und Prolyl-4-Hydroxylase) [184, 185] sowie eine mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziierte Form [186].

Die Procollagenprolin-Dioxygenasen benötigen konservierte X-Prolin-Glycin- und X-Prolin-Alanin-Motive im Zielprotein, um die Prolinhydroxylierung zu katalysieren [187 – 189]. Sie sind essentiell an der Biosynthese des Kollagens beteiligt, indem die Prolinhydroxylierungen zur Stabilisierung der Tripelhelix des Kollagens beitragen [184, 185, 190]. Neben Kollagen wurden auch andere Zielproteine mit kollagenähnlichen Domänen, wie u. a. das Argonaut-Protein 2 und das Elastin, identifiziert [189, 191]. Auch das ChREBP besitzt solche kollagenähnlichen Domänen, mit insgesamt sieben X-Prolin-Glycin- und neun X-Prolin-Alanin-Motiven. Allerdings ließ die massenspektrometrische Untersuchung von endogenem ChREBP

aus murinen Lebergewebe in diesen Motiven keine eindeutigen Prolinhydroxylierungen nachweisen. Damit scheinen die identifizierten Prolinhydroxylierungen P141, P212, P370, P392, P414 und P536 im ChREBP von anderen Enzymen katalysiert zu werden.

Die EGLNs benötigen, im Gegensatz zu den Procollagenprolin-Dioxygenasen, keine strikten Motive für die Prolinhydroxylierung. Zwar findet die Prolinhydroxylierung von HIF in einem Leucin-X-X-Leucin-Alanin-Prolin(LXXLAP)-Motiv statt [62], jedoch führten Substitutionen innerhalb des LXXLAP-Motivs nur zu geringen Effekten auf die Aktivität der EGLNs. Dabei scheint lediglich das Alanin im LXXLAP-Motiv für EGLN1- und EGLN2-vermittelte Prolinhydroxylierung von Bedeutung zu sein. Im Fall der EGLN3 konnte sogar gezeigt werden, dass die Alanin-Substitutionen gegen Isoleucin, Valin und Serin keine Beeinträchtigung der Enzymaktivität aufwies. Generell scheint die EGLN3 ein anderes Profil der benötigten Aminosäuresequenzen für die Prolinhydroxylierung als EGLN1 und EGLN2 zu besitzen [192]. Die höhere Variabilität in der Aminosäuresequenz der Prolinhydroxylierungsstelle der EGLN3 könnte eine Erklärung für die Vielzahl der identifizierten Nicht-HIF-Zielproteine sein. Das Fehlen eines LXXLAP-Motivs im ChREBP schließt damit ChREBP als potenzielles neues Zielprotein der EGLN3 nicht aus. Auch andere Zielproteine der EGLN3, wie die *pyruvate kinase M2* (PKM2) und der *β 2-adrenergic receptor*, besitzen EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierungen, die sich nicht in einem LXXLAP-Motiv befinden [193, 194].

Für die Prolinhydroxylierung ist eine Protein-Protein-Interaktion von ChREBP mit seiner modifizierenden Prolylhydroxylase Voraussetzung. Eine Protein-Protein-Interaktion konnte bereits zwischen ChREBP und EGLN3 sowie EGLN1, nicht aber für die EGLN2, nachgewiesen werden. Um die EGLN3 als ChREBP-modifizierendes Protein zu identifizieren zu können, muss ein quantitativer Nachweis der Prolinhydroxylierung im ChREBP in Abhängigkeit von der EGLN3-Expression erfolgen [60].

Anhand dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass infolge einer EGLN3-Überexpression das Ausmaß der Prolinhydroxylierungen im ChREBP zunahm. Damit ist die Prolinhydroxylierung im ChREBP in Abhängigkeit von der EGLN3-Expression dynamisch reguliert. Auch in anderen Zielproteinen der EGLN3 konnte die Prolinhydroxylierung in Abhängigkeit von der EGLN3-Expression, durch den Einsatz eines Hydroxyprolin-Antikörpers, gezeigt werden [193, 195]. Für das EGLN3-Zielprotein PKM2 konnte, wie für ChREBP, auch die EGLN1 als weiterer Interaktionspartner nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die Autoren, dass die Prolinhydroxylierungen im PKM2 spezifisch von der EGLN3 abhängig sind, da weder eine

Depletion noch Überexpression der EGLN1 das Ausmaß der Prolinhydroxylierungen im PKM2 beeinflussten [193]. Diese Untersuchung steht derzeit im Falle für ChREBP noch aus.

Da bei der Verwendung von überexprimiertem Protein auch künstliche Effekte auftreten können [196], wären Untersuchungen von endogen-exprimierten ChREBP in einem physiologischeren System sinnvoll. Dabei kann die Anreicherung von endogenem ChREBP-Protein mittels Sepharose-Beads gebundenen ChREBP-Antikörpers erfolgen. Jedoch konnte durch den verwendeten ChREBP-Antikörper endogenes ChREBP aus primären Maushepatozyten oder murinen Lebergewebe nicht eindeutig immunpräzipitiert werden, wodurch die Auswirkung einer EGLN3-Depletion auf die Prolinhydroxylierungen von endogenem ChREBP nicht untersucht werden konnte.

5.4.1 Substitution der Proline an Position 141 und 536 im ChREBP

Eine verminderte EGLN3-Expression führte *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Reduktion der ChREBP-Proteinmenge. Als Ursache wurde eine verminderte ChREBP-Proteinstabilität infolge fehlender Prolinhydroxylierungen im ChREBP vermutet [60]. Auch im Myogenin führten die EGLN3-vermittelten Prolinhydroxylierungen zu einer Erhöhung der Proteinstabilität [70]. Durch diese Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Substitution der Proline an Position 141 und 536 im ChREBP die Proteinstabilität nicht beeinflusst. Damit kann eine erhöhte Degradation von nicht-hydroxyliertem ChREBP in diesen Positionen ausgeschlossen werden. Trotzdem führte die Substitution der Proline an Position 141 und 536 im ChREBP zu einer eingeschränkten (ChREBP-P536A) bzw. stark dezimierten (ChREBP-P141A und die Doppelmutante ChREBP-P141,536A) ChREBP-Aktivität bei hohen Glukosekonzentrationen, im Vergleich zum ChREBP-Wildtyp(Wt).

Das Prolin 141 im ChREBP ist in der MCRIII lokalisiert. Es liegt nahe der bekannten Bindungsregion des Proteins 14-3-3 (AS 116 bis 135), welches eine Rolle bei der Regulation der subzellularen Lokalisation von ChREBP spielt [33, 34]. Die Vermutung liegt nahe, dass die Prolinhydroxylierung an Position 141 die Bindung zwischen ChREBP und Protein 14-3-3 beeinträchtigt. Damit könnte eine fehlende Prolinhydroxylierung an Position 141 die Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und Protein 14-3-3 eher begünstigen, womit ChREBP stärker im Zytosol zurückgehalten wird. Dies stellt eine Erklärung für die verminderte nukleäre Anreicherung in RetSat-depletierten primären Maushepatozyten dar. Mutationen in der MCRIII

außerhalb der Bindungsregion von Protein 14-3-3 ließen zwar bisher keinen Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und Protein 14-3-3 nachweisen, jedoch wurden bisher nur Mutationen im N-terminalen Teil der MCRIII (AS 100 bis 115) untersucht [35]. Inwieweit der C-terminale Teil der MCRIII (AS 136 bis 145), eingeschlossen des Prolins an Position 141, die Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und Protein 14-3-3 beeinflusst, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bekannt. Hierfür könnten Immunpräzipitationsstudien von ChREBP-P141A und Protein 14-3-3 im Vergleich zum ChREBP-Wt angewendet werden. Zusätzlich sollte nach Überexpression von ChREBP-P141A in primären Mausepatozyten und anschließender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation im Vergleich zum ChREBP-Wt untersucht werden. Hierfür könnten die generierten ChREBP-Mutanten sowie der ChREBP-Wt mittels adenoviralem Gentransfer zunächst überexprimiert werden. Durch den Einsatz eines Anti-Flag-Antikörpers bietet der enthaltene Flag-tag der überexprimierten Proteine anschließend die Möglichkeit die Lokalisation, unabhängig vom endogen-exprimierten ChREBP, zu betrachten.

Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, dass das Ausmaß der stark dezimierten ChREBP-Aktivität infolge der fehlenden Prolinhydroxylierung an Position 141 lediglich von einer Beeinflussung der zellulären Lokalisation von ChREBP abhängt. Mehrfach konnte bereits gezeigt werden, dass eine nukleäre Akkumulation von ChREBP nicht allein für dessen transkriptionelle Aktivität ausreicht [34, 89, 197]. Speziell für die MCRII und -III werden neben der Regulierung der Lokalisation von ChREBP noch weitere Funktionen vermutet, die essenziell für die ChREBP-Aktivierung sind [34]. Ein potenzieller Faktor könnte hier die EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierung an Position 141 im ChREBP sein. Die EGLN3 ist im Zytosol als auch im Nukleus lokalisiert [198]. Die Prolinhydroxylierung in Position 141 im ChREBP könnte damit auch erst nach der nukleären Akkumulation von ChREBP erfolgen und damit die DNA-Bindungsfähigkeit in den Promotorregionen der Zielgene von ChREBP verstärken. Eine verminderte DNA-Bindungsfähigkeit der generierten ChREBP-Mutanten (ChREBP-P141A, ChREBP-P536A und die Doppelmutante ChREBP-P141,536A) könnte mittels Chromatin-Immunpräzipitation untersucht werden.

Der Einfluss der Substitution des Prolins an Position 141 im ChREBP auf dessen Aktivität ist sehr stark. Zu beachten ist dabei, dass Mutationen zu Störungen in der Proteinstruktur führen können, wodurch es zu einem Funktionsverlust des Proteins kommen kann. Die N-terminalen AS 1 bis 250 vom ChREBP lassen drei α -Helixes vermuten (α 1: AS 85 bis 95; α 2: AS 125

bis 135 und $\alpha 3$: AS 170 bis 190) [199], wobei $\alpha 2$ in der Bindungsregion des Protein 14-3-3 und damit innerhalb der MCRIII lokalisiert ist. Diese Sekundärstrukturen werden für die spezifische Funktion von ChREBP benötigt [33]. Um auszuschließen, dass die stark dezimierte ChREBP-Aktivität infolge der Substitution des Prolins an Position 141 im ChREBP lediglich auf eine Fehlfaltung des ChREBPs beruht, sollten die ChREBP-Mutanten (ChREBP-P141A, ChREBP-P536A und die Doppelmutante ChREBP-P141,536A) hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur untersucht werden. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wie u. a. die Röntgenstrukturanalyse und Infrarotspektroskopie, wobei die Größe und Komplexität von ChREBP die Analyse erschwert. Die unveränderte Proteinstabilität der ChREBP-Mutanten (ChREBP-P141A, ChREBP-P536A und die Doppelmutante ChREBP-P141,536A) in der Western Blot Analyse weist jedoch nicht auf eine Fehlfaltung hin, da normalerweise fehlgefaltete Proteine im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle im Proteasom abgebaut werden.

Das Prolin 536 im ChREBP ist in der *prolin-rich region*, organisiert in *random coil*-Struktur, des ChREBPs lokalisiert. In *random coil*-Strukturen tritt häufig die Aminosäure Prolin auf, da diese Aminosäure aufgrund eines fehlenden Wasserstoffatoms in der Peptidbindung keine Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Damit weist diese Domäne keine definierte Sekundärstruktur auf, wird aber häufig mit Protein-Protein-Interaktionen in Verbindung gebracht [24]. Die Substitution des Prolins an Position 536 im ChREBP führte zu einer eingeschränkten ChREBP-Aktivität, allerdings in einem geringeren Ausmaß als bei der Substitution von Prolin an Position 141. Dies bestätigt sich auch in der Analyse der Doppelmutante (ChREBP-P141,536A), wodurch die zusätzliche Substitution des Prolins an Position 141 im ChREBP zu einer vergleichbaren stark dezimierten ChREBP-Aktivität, wie bei alleiniger Substitution des Prolins an Position 141 führte. Möglicherweise erschwert die fehlende Prolinhydroxylierung in Position 536 im ChREBP die Interaktion mit anderen Proteinen. Im ChREBP konnte eine potenzielle nukleäre Rezeptor-Box mit dem Leucin-X-X-Leucin-Leucin(LXXLL)-Motiv innerhalb der *prolin-rich region* identifiziert werden [199]. Interessanterweise befindet sich dieses LXXLL-Motiv (AS 538 bis 542) direkt neben der identifizierten Prolinhydroxylierung an Position 536 im murinen ChREBP. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass ChREBP mit dem nukleären Rezeptor *hepatocyte nuclear factor 4 alpha* (HNF α) interagiert und dadurch die Expression der *L-PK* bei hohen Glukosekonzentrationen verstärkt wird [193]. Der Einfluss des HNF α ist jedoch auf die Expression anderer ChREBP-Zielgene, wie *ACCI*, *FASN* und *SCD1*, nur moderat [200]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Promotorregion von *ACCI* für

das Luziferase Assay zur Bestimmung der ChREBP-Aktivität verwendet. Vermutlich kann damit als Ursache für die eingeschränkte ChREBP-Aktivität infolge der fehlenden Prolinhydroxylierung an Position 536 im ChREBP, eine Beeinträchtigung der ChREBP-HNF α -Interaktion ausgeschlossen werden. Generell könnte aber die fehlende Prolinhydroxylierung an Position 536 im ChREBP die Bindung von anderen nukleären Rezeptoren, über das LXXLL-Motiv, beeinträchtigen.

Bei Betrachtung der ChREBP-Aktivität bei niedrigen Glukosekonzentrationen ist es nicht überraschend, dass die Prolin-Substitutionen im ChREBP nicht zu einer glukoseunabhängigen Aktivierung von ChREBP führten. Für die Inhibierung der ChREBP-Aktivität bei niedrigen Glukosekonzentrationen ist der N-Terminus, welcher die Prolinhydroxylierung an Position 141 im ChREBP enthält, mit den MCRs essenziell. Eine Deletion der ersten 298 AS führt zu einem konstitutiv aktivem ChREBP. Interessanterweise führten Deletionen, die nur einzelne Regionen des N-Terminus betrafen, wie die MCRI, -II, -III oder -IV, nicht zu einer glukoseunabhängigen Aktivierung von ChREBP [34, 201]. Damit konnte bisher keine MCR eindeutig identifiziert werden, die allein für die Inhibierung der ChREBP-Aktivität bei niedrigen Glukosekonzentrationen verantwortlich ist. Vielmehr scheinen multiple Regionen am N-Terminus die Repression von ChREBP zu steuern [36, 201]. Die Autoren von Davies *et al.* äußern sogar die Möglichkeit, dass die MCRV durch eine intramolekulare Interaktion mit MCRI bis -IV die Repression von ChREBP bewirkt [201]. Außerdem konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass Intermediate des Glukosestoffwechsel, wie u. a. Glukose-6-Phosphat (G6P), zusätzlich für die Aktivierung von ChREBP notwendig sind [53, 202]. Die MCRVI besitzt ein G6P-Bindungsmotiv, sodass eine allosterische Bindung von G6P im ChREBP vermutet wird [199].

Die mittels Luziferase-Assays nachgewiesene verminderte ChREBP-Aktivität der ChREBP-Mutanten zeichnete sich ebenfalls in der Fähigkeit zur Induktion des ChREBP-Zielgens *Txnip* infolge hoher Glukosekonzentration ab. Die ChREBP-Mutanten konnten die Expression von *Txnip* signifikant weniger als der ChREBP-Wt induzieren. *Txnip* stellt das mit am stärksten regulierte ChREBP-Zielgen dar und dessen Expression wird im Gegensatz zu Genen der Glykolyse und Fettsäuresynthese nicht gleichzeitig durch andere relevante hepatische Transkriptionsfaktoren reguliert [20, 21]. Zusätzlich wurde ein ChREBP-defizientes System verwendet, wodurch der Einfluss von vorhandenen endogenem ChREBP auf die Induktion der *Txnip*-Expression ausgeschlossen werden kann. Als ChREBP-defizientes System wurde die murine Hepatozytenzelllinie AML12 verwendet, in der mittels CRISPR/Cas9-Technik eine

Inaktivierung des *ChREBP*-Gens erreicht werden konnte (ChREBP-defiziente AML12-Zellen). Zusätzlich zum Verlust von ChREBP in den ChREBP-defizienten AML12-Zellen konnte eine stark reduzierte Induktion der *Txnip*-Expression im Vergleich zu in AML12-Zellen mit intaktem ChREBP gezeigt werden. Da der Einsatz der CRISPR/Cas9-Technik zu sogenannten *off-target* Mutationen führen kann, sollte diese Untersuchung in einem weiteren ChREBP-defizienten AML12-Klon wiederholt werden.

In der Negativkontrolle pMSCV ließ sich eine geringe Zunahme der ChREBP-Aktivität sowie eine geringe Induktion des ChREBP-Zielgens *Txnip* infolge der ansteigenden Glukosekonzentration nachweisen. In beiden Untersuchungen beruht dies vermutlich auf einer Aktivierung von MondoA, einem weiteren glukoseabhängigen Transkriptionsfaktor der Mondo Familie. Im Gegensatz zu ChREBP wird MondoA vorwiegend im Skelettmuskel exprimiert und induziert dort ebenfalls glukoseabhängig die Expression seiner Zielgene, wie u. a. *Txnip* [203, 204]. Da jedoch auch MondoA in anderen Organen, wie der Leber und Niere, in geringen Mengen exprimiert wird, könnte dies die nachgewiesene Hintergrundaktivität von dem Leervektor pMSCV erklären.

Die Substitution der Proline an Position 141 und 536 im ChREBP beeinflusst nicht die in Vorarbeiten nachgewiesene ChREBP-EGLN3-Proteininteraktion. Für das Prolin an Position 141 war dieser Effekt nicht unerwartet, da bereits in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass die N-terminalen 238 AS des ChREBPs für die Interaktion von ChREBP und EGLN3 nicht notwendig sind [60]. Eine Erklärung hierfür könnte in weiteren Prolinhydroxylierungsstellen im ChREBP liegen. Auch andere Zielproteine der EGLN3 weisen multiple EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierungsstellen auf [193 – 195, 205].

5.4.2 RetSat als potentieller Regulator der EGLN3-Aktivität

Die EGLN3 katalysiert die Hydroxylierung von Prolinresten in Zielproteinen, wobei 2-Oxoglutarat und Sauerstoff zu Succinat und Kohlenstoffdioxid umgesetzt werden [61]. Neben einer ausreichenden Sauerstoffkonzentration benötigt die EGLN3 als weiteren Co-Faktor Eisen [206]. Neuere Studien lassen eine Rolle der RetSat im Eisenmetabolismus vermuten. Zum einen führt ein Eisenmangel im Muskel zu einer signifikanten Hochregulation der *RetSat*-Expression [207], zum anderen wird die RetSat mit der Entstehung von oxidativen Stress assoziiert [208, 209], welcher durch hohe Eisenkonzentrationen verstärkt wird [210]. Es

wäre denkbar, dass eine hepatische RetSat-Depletion zu Einschränkungen in der Eisenverfügbarkeit in der Zelle führt, wodurch die EGLN3-Aktivität gehemmt wird. Eine quantitative Bestimmung vom Eisengehalt in RetSat-depletierten Mauslebern oder primären Maushepatozyten würde einen Zusammenhang belegen.

Andererseits sollte eine Reduzierung der Eisenkonzentration in der Zelle auch die beiden anderen Isoformen EGLN1 und EGLN2 in ihrer enzymatischen Funktion beeinträchtigen. Eine Beeinträchtigung der Aktivität der drei EGLNs führt infolge fehlender Prolinhydroxylierungen im HIF, zu dessen Stabilisierung und Akkumulation. Damit verbunden ist dessen erhöhte nukleäre Lokalisation und die Induktion der Zielgene [67, 211]. Insbesondere die EGLN1 wird bei ausreichender Sauerstoffkonzentration als Hauptregulator von HIF betrachtet [212]. Eine erhöhte HIF-Aktivität konnte jedoch in RetSat-depletierten primären Maushepatozyten nicht bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass die EGLN1 und EGLN2 noch ausreichend Prolinhydroxylierungen im HIF vollziehen [19]. Obwohl die EGLNs sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Funktionen ähneln, lassen Unterschiede im Expressionsmuster, der Proteinstabilität und subzellularen Lokalisation auf eine funktionelle Diversität der EGLNs schließen. Im Falle der EGLN3 konnte gezeigt werden, dass dessen mRNA Expression und Proteinlevel bei ausreichender Sauerstoffkonzentration signifikant unter dem von EGLN1 und EGLN2 liegen [212, 213], was einer wichtigen Rolle in der Prolinhydroxylierung von HIF bei ausreichender Sauerstoffkonzentration widerspricht. Die zusätzlich identifizierten Zielproteine der EGLN3 zeigen eine Beteiligung der EGLN3 an Prozessen außerhalb des HIF-Signalweges. Eine Erklärung für die alleinige verminderte EGLN3-Aktivität infolge der RetSat-Depletion könnte in einer unterschiedlichen Eisensensitivität der EGLNs sowie in der geringeren vorherrschenden Proteinmenge der EGLN3 begründet sein. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung eines Langzeiteffekts einer hepatischen RetSat-Deletion in homozygoten RetSat-Mäusen, da ein längerer bestehender Eisenmangel auch die EGLN1- und EGLN2-Aktivität betreffen könnte.

In mehreren vorausgegangenen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen dem Eisen- und Glukosemetabolismus gezeigt werden, und exzessive Eisenwerte werden mit metabolischen Erkrankungen, wie der NAFLD/NASH, assoziiert [214, 215]. Obwohl Eisen als Kofaktor vieler Proteine essentiell ist, führen hohe Eisenkonzentrationen vermehrt zur Bildung von Hydroxyradikalen aus Wasserstoffperoxid. Insbesondere Lipide sind empfindlich gegenüber Hydroxyradikalen, die durch Lipidoxidation dessen Degradation bewirken. Dabei

entstehen reaktive Produkte, die oxidativen Schaden anrichten und zum Fortschreiten einer NAFLD beitragen [215]. Da eine Überexpression der RetSat zu vermehrtem oxidativen Stress führte [208], könnte dies in einer Erhöhung der intrazellulären Eisenkonzentration begründet sein. Im Gegensatz dazu führte ein Eisenmangel zu einer verminderten hepatischen Lipidaufnahme aus der Peripherie [216, 217] sowie zusätzlich zu einer reduzierten hepatischen Lipogenese [218]. Eine Erklärung hierfür könnte eine verminderte ChREBP-Aktivität infolge fehlender EGLN3-vermittelter Prolinhydroxylierungen sein. Eine Involvierung der RetSat im hepatischen Eisenmetabolismus stellt damit eine potentielle Erklärung für eine Beeinflussung der enzymatischen Aktivität der EGLN3 dar.

6 Zusammenfassung

Die Retinol Saturase (RetSat) stellt einen neuen Regulator des hepatischen Glukose- und Lipidstoffwechsels dar. Durch Beeinflussung der Aktivität des glukoseaktivierten Transkriptionsfaktors *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) in der Leber, ist die RetSat mit an der Aufnahme von Kohlenhydraten und dessen Umwandlung zu Lipiden beteiligt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht bekannt. Jedoch scheint die *egg laying defective nine homolog 3* (EGLN3), ein durch RetSat-reguliertes proteinmodifizierendes Enzym, die ChREBP-Aktivität durch potentielle Prolinhydroxylierungen maßgeblich zu beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit soll zu einem erweiterten Verständnis der physiologischen Funktion der RetSat in der Leber beitragen und den zugrundeliegenden Mechanismus der RetSat-ChREBP-Interaktion aufdecken. Insbesondere die identifizierten Prolinhydroxylierungen im ChREBP sollen hinsichtlich einer regulatorischen Funktion untersucht werden. Im Rahmen dessen soll eine hepatische RetSat-Depletion in adipösen Mäusen untersucht und primäre Maushepatozyten für Translokationsstudien von endogenem ChREBP verwendet werden. Um eine Aussage über eine Relevanz der RetSat im Glukose- und Lipidstoffwechsel im Menschen zu treffen sollen humane Leberproben analysiert werden. Mittels zielgerichteter Mutagenese sollen die Prolinhydroxylierungen an Position 141 und 536 im ChREBP in verschiedenen Zelllinien (HEK293, AML12) untersucht werden. Zusätzlich soll eine neue konditionale RetSat *knockout*-Mauslinie generiert werden.

Die RetSat ist an der Entstehung einer hepatischen Steatose beteiligt. So führte eine RetSat-Depletion in adipösen Mäusen zur Reduktion des Leberlipidgehaltes und damit zur Verbesserung der durch Hochfettdiät-induzierten hepatischen Steatose. Außerdem zeigten Mäuse mit hepatischer RetSat-Depletion eine verbesserte Glukosetoleranz. In humanen Leberproben konnte zusätzlich eine positive Korrelation zwischen *RETSAT*-Expression und dem Schweregrad einer bestehenden Steatose sowie dem *Body-Mass-Index* gezeigt werden. Als Ursache für die verminderte ChREBP-Aktivität infolge einer RetSat-Depletion konnte, durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie von endogenem ChREBP, eine verminderte nukleäre Anreicherung in primären Maushepatozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die Prolinhydroxylierung an Position 141 und 536 im ChREBP als eine neue regulatorische posttranslationale Modifikation identifiziert werden. Die Substitution der Proline an Position

141 und 536 im ChREBP ließen eine eingeschränkte (P536) bzw. stark dezimierte (P141) ChREBP-Aktivität nachweisen. Die neue konditionale RetSat *knockout*-Mauslinie konnte erfolgreich generiert und die Funktionalität durch eine induzierte RetSat-Deletion in der Leber bereits bestätigt werden. Damit steht diese Mauslinie in Zukunft für Kurz- und Langzeitstudien einer RetSat-Deletion in beliebigen Organen zur Verfügung.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verminderte ChREBP-Aktivität infolge einer RetSat-Depletion von EGLN3 abhängig ist. Durch eine RetSat-Depletion könnte die prolinhydroxylierende Eigenschaft der EGLN3 abgeschwächt sein, wodurch die ChREBP-Aktivität infolge fehlender Prolinhydroxylierungen an Position 141 und 536 vermindert ist. Da metabolische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2 und NAFLD, häufig mit einer verstärkten ChREBP-Aktivität in der Leber assoziiert sind, könnte eine Inhibition der hepatischen RetSat therapeutischen Nutzen zur Behandlung einer hepatischen Steatose, Dyslipidämien sowie einer Hyperglykämie haben.

7 Summary

Retinol Saturase (RetSat) is a new regulator of hepatic glucose and lipid metabolism. RetSat influences the activity of the glucose-activated transcription factor carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) in the liver. Thus, RetSat is involved in the uptake of carbohydrates and their conversion into lipids. The underlying mechanism is not yet known. However, the egg laying defective nine homolog 3 (EGLN3), a protein-modifying enzyme regulated by RetSat, appears to significantly influence ChREBP activity through potential proline hydroxylations.

The present work aims to contribute to a better understanding of the physiological functioning of RetSat in the liver and to uncover the underlying mechanism of RetSat-ChREBP interaction. In particular, the identified proline hydroxylations in the ChREBP will be investigated with respect to their regulatory function. In this context, a hepatic RetSat depletion in obese mice will be investigated and primary mouse hepatocytes will be used for translocation studies of endogenous ChREBP. Human liver samples will be analyzed to determine the relevance of RetSat in human glucose and lipid metabolism. Using targeted mutagenesis, proline hydroxylations of proline 141 and 536 in the ChREBP in different cell lines (HEK293, AML12) will be investigated. In addition, a new conditional RetSat knockout mouse line will be generated.

RetSat contributes to the development of hepatic steatosis. RetSat depletion in obese mice led to a reduction in liver lipid content, and thus, to an improvement in hepatic steatosis caused by a high-fat diet. In addition, mice with hepatic RetSat depletion showed improved glucose tolerance. In human liver samples *RETSAT* expression is positively correlated to the degree of steatosis as well as the body mass index. Confocal fluorescence microscopy of endogenous ChREBP showed that the reduced ChREBP activity due to RetSat depletion was caused by the reduced nuclear translocation in primary mouse hepatocytes. In addition, proline hydroxylation on positions 141 and 536 in the ChREBP were identified as a new regulatory posttranslational modification. The substitution of Proline 141 and 536 in the ChREBP showed a limited (P536) or strongly decimated (P141) ChREBP activity. The new conditional RetSat knockout mouse line was successfully created as demonstrated by an induced RetSat deletion in the liver. Thus, this mouse line will be available for short- and long-term studies of a RetSat deletion in any organ.

The results indicate that the decreased ChREBP activity due to RetSat depletion is dependent on EGLN3. RetSat depletion may attenuate the proline hydroxylating property of EGLN3, resulting in lower ChREBP activity due to lack of proline hydroxylation at positions 141 and 536. Since metabolic diseases such as diabetes mellitus type 2 and NAFLD are often associated with increased ChREBP activity in the liver, inhibition of hepatic RetSat may have therapeutic benefits in the treatment of hepatic steatosis, dyslipidemia and hyperglycemia.

8 Literaturverzeichnis

1. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2011;9:524-530.e1; quiz e60.
2. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol.* 2013;58:593–608.
3. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2009;29:113–9.
4. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1929–34.
5. Fatty Liver among Persons in a Community in Northern Italy. *Ann Intern Med.* 2000;132:112.
6. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 2007;48:1905–14.
7. Bataller R, Rombouts K, Altamirano J, Marra F. Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25:231–44.
8. Ertle J, Dechêne A, Sowa J-P, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer.* 2011;128:2436–43.
9. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology.* 2012;55:2005–23.
10. Moise AR, Kuksa V, Imanishi Y, Palczewski K. Identification of All- *trans* -Retinol:All-*trans* -13,14-dihydroretinol Saturase. *J Biol Chem.* 2004;279:50230–42.
11. Moise AR, Kuksa V, Blaner WS, Baehr W, Palczewski K. Metabolism and Transactivation Activity of 13,14-Dihydroretinoic Acid. *J Biol Chem.* 2005;280:27815–25.
12. Moise AR, Alvarez S, Domínguez M, Alvarez R, Golczak M, Lobo GP, et al. Activation of Retinoic Acid Receptors by Dihydroretinoids. *Mol Pharmacol.* 2009;76:1228–37.
13. Moise AR, Domínguez M, Alvarez S, Alvarez R, Schupp M, Cristancho AG, et al. Stereospecificity of Retinol Saturase: Absolute Configuration, Synthesis, and Biological Evaluation of Dihydroretinoids. *J Am Chem Soc.* 2008;130:1154–5.

14. Park PJ, Kong SW, Tebaldi T, Lai WR, Kasif S, Kohane IS. Integration of heterogeneous expression data sets extends the role of the retinol pathway in diabetes and insulin resistance. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25:3121–7.
15. Schupp M, Lefterova MI, Janke J, Leitner K, Cristancho AG, Mullican SE, et al. Retinol saturase promotes adipogenesis and is downregulated in obesity. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:1105–10.
16. Sun Y, Ng L, Lam W, Lo CK-C, Chan P-T, Yuen Y-L, et al. Identification and characterization of a novel mouse peroxisome proliferator-activated receptor α -regulated and starvation-induced gene, Ppsig. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:1775–91.
17. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor α in human liver. *Biochimie*. 2017;136:75–84.
18. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999;103:1489–98.
19. Witte N. Rolle der Retinol Saturase im hepatischen Glucose- und Lipidstoffwechsel [Dissertation; Monographie]. Freie Universität Berlin, Germany; 2015.
20. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:7281–6.
21. Ma L, Robinson LN, Towle HC. ChREBP**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*. 2006;281:28721–30.
22. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab*. 2006;4:107–10.
23. de Luis O, Valero MC, Jurado LA. WBSR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2000;8:215–22.
24. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:9116–21.
25. Cairo S, Merla G, Urbinati F, Ballabio A, Reymond A. WBSR14, a gene mapping to the Williams-Beuren syndrome deleted region, is a new member of the *Mlx* transcription factor network. *Hum Mol Genet*. 2001;10:617–27.
26. Wang H, Wollheim CB. ChREBP rather than USF2 regulates glucose stimulation of endogenous L-pyruvate kinase expression in insulin-secreting cells. *J Biol Chem*. 2002;277:32746–52.

27. Herman MA, Peroni OD, Villoria J, Schön MR, Abumrad NA, Blüher M, et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*. 2012;484:333–8.
28. Witte N, Muenzner M, Rietscher J, Knauer M, Heidenreich S, Nuotio-Antar AM, et al. The Glucose Sensor ChREBP Links De Novo Lipogenesis to PPAR γ Activity and Adipocyte Differentiation. *Endocrinology*. 2015;156:4008–19.
29. Filhoulaud G, Guilmeau S, Dentin R, Girard J, Postic C. Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24:257–68.
30. Jing G, Chen J, Xu G, Shalev A. Islet ChREBP- β is increased in diabetes and controls ChREBP- α and glucose-induced gene expression via a negative feedback loop. *Mol Metab*. 2016;5:1208–15.
31. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*. 1989;58:537–44.
32. Ma L, Sham YY, Walters KJ, Towle HC. A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein Mlx in DNA binding and glucose-regulated transcription. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:35–44.
33. Sakiyama H, Wynn RM, Lee W-R, Fukasawa M, Mizuguchi H, Gardner KH, et al. Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): interaction of an alpha-helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008;283:24899–908.
34. Li MV, Chen W, Pongvarin N, Imamura M, Chan L. Glucose-Mediated Transactivation of Carbohydrate Response Element-Binding Protein Requires Cooperative Actions from Mondo Conserved Regions and Essential Trans-Acting Factor 14-3-3. *Mol Endocrinol*. 2008;22:1658–72.
35. Merla G, Howald C, Antonarakis SE, Raymond A. The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Hum Mol Genet*. 2004;13:1505–14.
36. Li MV, Chang B, Imamura M, Pongvarin N, Chan L. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes*. 2006;55:1179–89.
37. Ge Q, Nakagawa T, Wynn RM, Chook YM, Miller BC, Uyeda K. Importin- α Protein Binding to a Nuclear Localization Signal of Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP). *J Biol Chem*. 2011;286:28119–27.
38. Fukasawa M, Ge Q, Wynn RM, Ishii S, Uyeda K. Coordinate regulation/localization of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP) by two nuclear export signal sites: discovery of a new leucine-rich nuclear export signal site. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:1166–9.

39. Stoltzman CA, Peterson CW, Breen KT, Muoio DM, Billin AN, Ayer DE. Glucose sensing by MondoA:Milx complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6912–7.
40. Minn AH, Hafele C, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology*. 2005;146:2397–405.
41. Yu F-X, Chai TF, He H, Hagen T, Luo Y. Thioredoxin-interacting protein (Txnip) gene expression: sensing oxidative phosphorylation status and glycolytic rate. *J Biol Chem*. 2010;285:25822–30.
42. Havula E, Hietakangas V. Glucose sensing by ChREBP/MondoA-Mlx transcription factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23:640–7.
43. Abdul-Wahed A, Guilmeau S, Postic C. Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metab*. 2017;26:324–41.
44. Denechaud P-D, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582:68–73.
45. Cheung O, Sanyal AJ. Abnormalities of Lipid Metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2008;28:351–9.
46. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63:895–902.
47. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JRB, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*. 2006;55:2159–70.
48. Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2006;291:E358–64.
49. Dentin R, Benhamed F, Pégrier J-P, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest*. 2005;115:2843–54.
50. Sirek AS, Liu L, Naples M, Adeli K, Ng DS, Jin T. Insulin stimulates the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by attenuating the repressive effect of Pit-1, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 homeodomain protein octamer transcription factor-1. *Endocrinology*. 2009;150:3483–92.
51. Gauthier K, Billon C, Bissler M, Beylot M, Lobaccaro J-M, Vanacker J-M, et al. Thyroid hormone receptor beta (TRbeta) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner. *J Biol Chem*. 2010;285:28156–63.

52. Arden C, Tudhope SJ, Petrie JL, Al-Oanzi ZH, Cullen KS, Lange AJ, et al. Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem J.* 2012;443:111–23.
53. Dentin R, Tomas-Cobos L, Foufelle F, Leopold J, Girard J, Postic C, et al. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol.* 2012;56:199–209.
54. Nakagawa T, Ge Q, Pawlosky R, Wynn RM, Veech RL, Uyeda K. Metabolite regulation of nucleo-cytosolic trafficking of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): role of ketone bodies. *J Biol Chem.* 2013;288:28358–67.
55. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:5107–12.
56. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13710–5.
57. Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest.* 2010;120:4316–31.
58. Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, et al. O-GlcNAcylation Increases ChREBP Protein Content and Transcriptional Activity in the Liver. *Diabetes.* 2011;60:1399–413.
59. Sakiyama H, Fujiwara N, Noguchi T, Eguchi H, Yoshihara D, Uyeda K, et al. The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402:784–9.
60. Knauer M. Untersuchung neuer Regulatoren der Glukose-stimulierten Genexpression [Dissertation; Monographie]. Freie Universität Berlin, Germany; 2017.
61. Domann F, Place. Prolyl-hydroxylase 3: evolving roles for an ancient signaling protein. *Hypoxia.* 2013;13.
62. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107:43–54.
63. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001;294:1337–40.
64. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001;292:464–8.

65. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292:468–72.
66. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4604–13.
67. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993;268:21513–8.
68. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*. 1995;270:29083–9.
69. Fong G-H, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ*. 2008;15:635–41.
70. Fu J, Menzies K, Freeman RS, Taubman MB. EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability. *J Biol Chem*. 2007;282:12410–8.
71. Lipscomb EA, Sarmiere PD, Crowder RJ, Freeman RS. Expression of the SM-20 gene promotes death in nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurochem*. 1999;73:429–32.
72. Högel H, Rantanen K, Jokilehto T, Grenman R, Jaakkola PM. Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells. *PloS One*. 2011;6:e27112.
73. Sambrook, J. and Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.(1,2,3). Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
74. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970;226:1209–11.
75. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970. *Biotechnol Read Mass*. 1992;24:51–6.
76. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*. 1999;26:112–22, 124–5.
77. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*. 1928;27:113–59.
78. Klebe RJ, Harriss JV, Sharp ZD, Douglas MG. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*. 1983;25:333–41.
79. Huang T-T, Naeemuddin M, Elchuri S, Yamaguchi M, Kozy HM, Carlson EJ, et al. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum Mol Genet*. 2006;15:1187–94.

80. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005;48:675–86.
81. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975;98:503–17.
82. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76–85.
83. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
84. Gültekin H, Heermann KH. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem*. 1988;172:320–9.
85. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973;52:456–67.
86. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806–11.
87. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411:494–8.
88. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997;275:1320–3.
89. Tsatsos NG, Towle HC. Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340:449–56.
90. Alemany R, Suzuki K, Curiel DT. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol*. 2000;81:2605–9.
91. Lieber A, He CY, Meuse L, Schowalter D, Kirillova I, Winther B, et al. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol*. 1997;71:8798–807.
92. Nathwani AC, Gray JT, Ng CYC, Zhou J, Spence Y, Waddington SN, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood*. 2006;107:2653–61.
93. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 1988;37:1163–7.

94. Galgani JE, Uauy RD, Aguirre CA, Díaz EO. Effect of the dietary fat quality on insulin sensitivity. *Br J Nutr.* 2008;100:471–9.
95. Ware CB, Siverts LAN, Nelson AM, Morton JF, Ladiges WC. Utility of a C57BL/6 ES line versus 129 ES lines for targeted mutations in mice. *Transgenic Res.* 2003;12:743–6.
96. Schwartz CJ, Sadowski PD. FLP recombinase of the 2 microns circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* bends its DNA target. Isolation of FLP mutants defective in DNA bending. *J Mol Biol.* 1989;205:647–58.
97. Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:6861–5.
98. Hamilton DL, Abremski K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol.* 1984;178:481–6.
99. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2005;41:1313–21.
100. Pivovarova O, von Loeffelholz C, Ilkavets I, Sticht C, Zhuk S, Murahovschi V, et al. Modulation of insulin degrading enzyme activity and liver cell proliferation. *Cell Cycle Georget Tex.* 2015;14:2293–300.
101. Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E46-51.
102. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996;15:6541–51.
103. Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:15597–602.
104. O’Callaghan BL, Koo S-H, Wu Y, Freake HC, Towle HC. Glucose Regulation of the Acetyl-CoA Carboxylase Promoter PI in Rat Hepatocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:16033–9.
105. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337:816–21.
106. Heidenreich S, Witte N, Weber P, Goehring I, Tolkachov A, Loeffelholz C, et al. Retinol saturase coordinates liver metabolism by regulating ChREBP activity. *Nat Commun.* 2017;8:384.
107. Hurtado del Pozo C, Vesperinas-García G, Rubio M-Á, Corripio-Sánchez R, Torres-García AJ, Obregon M-J, et al. ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1811:1194–200.

108. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115:1343–51.
109. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, Bingzhi Yu, Avignon A, Galloway L, et al. Activation of Protein Kinase C (α , β , and ζ) by Insulin in 3T3/L1 Cells Transfection Studies Suggest a Role For PKC- η In Glucose Trnaspport. *J Biol Chem.* 1997;272:2551–8.
110. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995;378:785–9.
111. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008;118:829–38.
112. Sanal MG. The blind men ‘see’ the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastroenterol WJG.* 2008;14:831–44.
113. Chakravarthy MV, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, et al. “New” hepatic fat activates PPARAlpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1:309–22.
114. Hoy AJ, Bruce CR, Turpin SM, Morris AJ, Febbraio MA, Watt MJ. Adipose triglyceride lipase-null mice are resistant to high-fat diet-induced insulin resistance despite reduced energy expenditure and ectopic lipid accumulation. *Endocrinology.* 2011;152:48–58.
115. Monsénégo J, Mansouri A, Akkaoui M, Lenoir V, Esnous C, Fauveau V, et al. Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *J Hepatol.* 2012;56:632–9.
116. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab.* 2007;6:69–78.
117. Brown JM, Betters JL, Lord C, Ma Y, Han X, Yang K, et al. CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance. *J Lipid Res.* 2010;51:3306–15.
118. Benhamed F, Denechaud P-D, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest.* 2012;122:2176–94.
119. Liu H-Y, Hong T, Wen G-B, Han J, Zuo D, Liu Z, et al. Increased basal level of Akt-dependent insulin signaling may be responsible for the development of insulin resistance. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2009;297:E898–906.
120. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;30:193–204.
121. Jiang B-H, Liu L-Z. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19–65.

122. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* 2005;94:29–86.
123. Chan JYK, Poon PHY, Zhang Y, Ng CWK, Piao WY, Ma M, et al. Case Report: Exome sequencing reveals recurrent RETSAT mutations and a loss-of-function POLDIP2 mutation in a rare undifferentiated tongue sarcoma. *F1000Research.* 2018;7:499.
124. Airley RE, McHugh P, Evans AR, Harris B, Winchester L, Buffa FM, et al. Role of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) in generating an aerobic metabolic phenotype and in breast cancer progression. *Br J Cancer.* 2014;110:715–23.
125. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009;324:1029–33.
126. Tong X, Zhao F, Mancuso A, Gruber JJ, Thompson CB. The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:21660–5.
127. Chen G-C, Su H-M, Lin Y-S, Tsou P-Y, Chyuan J-H, Chao P-M. A conjugated fatty acid present at high levels in bitter melon seed favorably affects lipid metabolism in hepatocytes by increasing NAD(+)/NADH ratio and activating PPAR α , AMPK and SIRT1 signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 2016;33:28–35.
128. Mason JT, O’Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 1991;39:225–9.
129. Austin S, Ziese M, Sternberg N. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell.* 1981;25:729–36.
130. Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, Barnett S, Capecchi MR. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13702–7.
131. Silver DP, Livingston DM. Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell.* 2001;8:233–43.
132. Thyagarajan B, Guimarães MJ, Groth AC, Calos MP. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene.* 2000;244:47–54.
133. Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods San Diego Calif.* 1998;14:381–92.
134. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science.* 1994;265:103–6.
135. Moise AR, Lobo GP, Erokwu B, Wilson DL, Peck D, Alvarez S, et al. Increased adiposity in the retinol saturase-knockout mouse. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2010;24:1261–70.

136. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015;524:230–3.
137. Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*. 2004;6 Suppl 1:S164-171.
138. Yang Y, Ertl HCJ, Wilson JM. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity*. 1994;1:433–42.
139. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4407–11.
140. Sung YH, Baek I-J, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol*. 2013;31:23–4.
141. Carbery ID, Ji D, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Liaw L, et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2010;186:451–9.
142. Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*. 2013;23:720–3.
143. Brown AJ, Fisher DA, Kouranova E, McCoy A, Forbes K, Wu Y, et al. Whole-rat conditional gene knockout via genome editing. *Nat Methods*. 2013;10:638–40.
144. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 2013;153:910–8.
145. Ma X, Chen C, Veevers J, Zhou X, Ross RS, Feng W, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene manipulation to create single-amino-acid-substituted and floxed mice with a cloning-free method. *Sci Rep*. 2017;7:42244.
146. Bishop KA, Harrington A, Kouranova E, Weinstein EJ, Rosen CJ, Cui X, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Insertion of loxP Sites in the Mouse Dock7 Gene Provides an Effective Alternative to Use of Targeted Embryonic Stem Cells. *G3 GenesGenomesGenetics*. 2016;6:2051–61.
147. Nakagawa Y, Oikawa F, Mizuno S, Ohno H, Yagishita Y, Satoh A, et al. Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific CREB3L3 knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016;6.
148. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244:1288–92.
149. McCarrick JW, Parnes JR, Seong RH, Solter D, Knowles BB. Positive-negative selection gene targeting with the diphtheria toxin A-chain gene in mouse embryonic stem cells. *Transgenic Res*. 1993;2:183–90.

150. Yanagawa Y, Kobayashi T, Ohnishi M, Kobayashi T, Tamura S, Tsuzuki T, et al. Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res.* 1999;8:215–21.
151. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature.* 1985;317:230–4.
152. Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature.* 1988;336:348–52.
153. Wilder PJ, Rizzino A. Mouse genetics in the 21st century: using gene targeting to create a cornucopia of mouse mutants possessing precise genetic modifications. *Cytotechnology.* 1993;11:79–99.
154. Hasty P, Rivera-Pérez J, Bradley A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 1991;11:5586–91.
155. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 1987;51:503–12.
156. Hasty P, Rivera-Pérez J, Chang C, Bradley A. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 1991;11:4509–17.
157. Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet TIG.* 2004;20:59–62.
158. Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6209–14.
159. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:8424–8.
160. Auerbach W, Dunmore JH, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Auerbach AB, Huszar D, et al. Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *BioTechniques.* 2000;29:1024–8, 1030, 1032.
161. Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet.* 1997;16:19–27.
162. Linder CC. Genetic variables that influence phenotype. *ILAR J.* 2006;47:132–40.
163. Linder CC. The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. *Lab Anim.* 2001;30:34–9.

164. Mystkowska ET, Ozdzeński W, Niemierko A. Factors regulating the degree and extent of experimental chimaerism in the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1979;51:217–25.
165. Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature.* 1986;323:445–8.
166. Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature.* 2011;474:337–42.
167. Wurst W, Rossant J, Prideaux V, Kownacka M, Joyner A, Hill DP, et al. A Large-Scale Gene-Trap Screen for Insertional Mutations in Developmentally Regulated Genes in Mice. *Genetics.* 1995;139:889–99.
168. Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* 1991;5:1513–23.
169. Bornstein P, Walsh V, Tullis J, Stainbrook E, Bateman JF, Hormuzdi SG. The globular domain of the proalpha 1(I) N-propeptide is not required for secretion, processing by procollagen N-proteinase, or fibrillogenesis of type I collagen in mice. *J Biol Chem.* 2002;277:2605–13.
170. Manley NR, Barrow JR, Zhang T, Capecchi MR. Hoxb2 and hoxb4 act together to specify ventral body wall formation. *Dev Biol.* 2001;237:130–44.
171. Coleman DL, Hummel KP. The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia.* 1973;9:287–93.
172. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia.* 1978;14:141–8.
173. Goren HJ, Kulkarni RN, Kahn CR. Glucose homeostasis and tissue transcript content of insulin signaling intermediates in four inbred strains of mice: C57BL/6, C57BLKS/6, DBA/2, and 129X1. *Endocrinology.* 2004;145:3307–23.
174. Clee SM, Attie AD. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr Rev.* 2007;28:48–83.
175. Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, et al. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet.* 1997;17:280–4.
176. Grove E, Eckardt S, McLaughlin KJ. High-Speed Mouse Backcrossing Through the Female Germ Line. *PLOS ONE.* 2016;11:e0166822.
177. Vooijs M, Jonkers J, Berns A. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep.* 2001;2:292–7.

178. Coppoolse ER, de Vroomen MJ, van Gennip F, Hersmus BJM, van Haaren MJJ. Size does matter: cre-mediated somatic deletion efficiency depends on the distance between the target lox-sites. *Plant Mol Biol.* 2005;58:687–98.
179. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:2287–300.
180. Yang SH, Bergo MO, Farber E, Qiao X, Fong LG, Young SG. Caution! Analyze transcripts from conditional knockout alleles. *Transgenic Res.* 2009;18:483–9.
181. Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:9209–14.
182. Jeannotte L, Aubin J, Bourque S, Lemieux M, Montaron S, Provencher St-Pierre A. Unsuspected effects of a lung-specific Cre deleter mouse line. *Genes N Y N* 2000. 2011;49:152–9.
183. Janbandhu VC, Moik D, Fässler R. Cre recombinase induces DNA damage and tetraploidy in the absence of LoxP sites. *Cell Cycle.* 2014;13:462–70.
184. Kukkola L, Hieta R, Kivirikko KI, Myllyharju J. Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzyme. *J Biol Chem.* 2003;278:47685–93.
185. Vranka JA, Sakai LY, Bächinger HP. Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. *J Biol Chem.* 2004;279:23615–21.
186. Koivunen P, Tiainen P, Hyvärinen J, Williams KE, Sormunen R, Klaus SJ, et al. An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. *J Biol Chem.* 2007;282:30544–52.
187. Kivirikko KI, Kishida Y, Sakakibara S, Prockop DJ. Hydroxylation of (X-Pro-Gly)_n by procollagen proline hydroxylase. Effect of chain length, helical conformation and amino acid sequence in the substrate. *Biochim Biophys Acta.* 1972;271:347–56.
188. Müller W, Hanauske-Abel H, Loos M. Biosynthesis of the first component of complement by human and guinea pig peritoneal macrophages: evidence for an independent production of the C1 subunits. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1978;121:1578–84.
189. Qi HH, Ongusaha PP, Myllyharju J, Cheng D, Pakkanen O, Shi Y, et al. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature.* 2008;455:421–4.
190. Holmgren SK, Taylor KM, Bretscher LE, Raines RT. Code for collagen's stability deciphered. *Nature.* 1998;392:666–7.
191. Rosenbloom J, Cywinski A. Inhibition of proline hydroxylation does not inhibit secretion of tropoelastin by chick aorta cells. *FEBS Lett.* 1976;65:246–50.

192. Li D, Hirsilä M, Koivunen P, Brenner MC, Xu L, Yang C, et al. Many Amino Acid Substitutions in a Hypoxia-inducible Transcription Factor (HIF)-1 α -like Peptide Cause Only Minor Changes in Its Hydroxylation by the HIF Prolyl 4-Hydroxylases. *J Biol Chem.* 2004;279:55051–9.
193. Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O’Meally R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* 2011;145:732–44.
194. Xie L, Xiao K, Whalen EJ, Forrester MT, Freeman RS, Fong G, et al. Oxygen-regulated beta(2)-adrenergic receptor hydroxylation by EGLN3 and ubiquitylation by pVHL. *Sci Signal.* 2009;2:ra33.
195. Luo W, Lin B, Wang Y, Zhong J, O’Meally R, Cole RN, et al. PHD3-mediated prolyl hydroxylation of nonmuscle actin impairs polymerization and cell motility. *Mol Biol Cell.* 2014;25:2788–96.
196. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 1995;59:94–123.
197. Davies MN, O’Callaghan BL, Towle HC. Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2008;283:24029–38.
198. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci.* 2003;116:1319–26.
199. McFerrin LG, Atchley WR. A Novel N-Terminal Domain May Dictate the Glucose Response of Mondo Proteins. *PLoS ONE.* 2012;7.
200. Meng J, Feng M, Dong W, Zhu Y, Li Y, Zhang P, et al. Identification of HNF-4 α as a key transcription factor to promote ChREBP expression in response to glucose. *Sci Rep.* 2016;6:23944.
201. Davies MN, O’Callaghan BL, Towle HC. Activation and repression of glucose-stimulated ChREBP requires the concerted action of multiple domains within the MondoA conserved region. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2010;299:E665–74.
202. Li MV, Chen W, Harmancey RN, Nuotio-Antar AM, Imamura M, Saha P, et al. Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395:395–400.
203. Sans CL, Satterwhite DJ, Stoltzman CA, Breen KT, Ayer DE. MondoA-Mlx heterodimers are candidate sensors of cellular energy status: mitochondrial localization and direct regulation of glycolysis. *Mol Cell Biol.* 2006;26:4863–71.
204. Billin AN, Eilers AL, Coulter KL, Logan JS, Ayer DE. MondoA, a novel basic helix-loop-helix-leucine zipper transcriptional activator that constitutes a positive branch of a max-like network. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8845–54.

205. Xie L, Pi X, Mishra A, Fong G, Peng J, Patterson C. PHD3-dependent hydroxylation of HCLK2 promotes the DNA damage response. *J Clin Invest.* 2012;122:2827–36.
206. McDonough MA, Li V, Flashman E, Chowdhury R, Mohr C, Liénard BMR, et al. Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:9814–9.
207. Barrientos T, Laothamatas I, Koves TR, Soderblom EJ, Bryan M, Moseley MA, et al. Metabolic Catastrophe in Mice Lacking Transferrin Receptor in Muscle. *EBioMedicine.* 2015;2:1705–17.
208. Pang X-Y, Wang S, Jurczak MJ, Shulman GI, Moise AR. Retinol saturase modulates lipid metabolism and the production of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 2017;633:93–102.
209. Nagaoka-Yasuda R, Matsuo N, Perkins B, Limbaeck-Stokin K, Mayford M. An RNAi-based genetic screen for oxidative stress resistance reveals retinol saturase as a mediator of stress resistance. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:781–8.
210. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2001;55:333–9.
211. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* 1998;17:6573–86.
212. Appelhoff RJ, Tian Y-M, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004;279:38458–65.
213. Nakayama K, Gazdoui S, Abraham R, Pan Z-Q, Ronai Z. Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes: implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2. *Biochem J.* 2007;401:217–26.
214. Fernández-Real JM, McClain D, Manco M. Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38:2169–76.
215. Ahmed U, Latham PS, Oates PS. Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis. *World J Gastroenterol WJG.* 2012;18:4651–8.
216. Lau BW, Klevay LM. Postheparin plasma lipoprotein lipase in copper-deficient rats. *J Nutr.* 1982;112:928–33.
217. Muratsubaki H, Enomoto K, Ichijoh Y, Yamamoto Y. Hypertriglyceridemia associated with decreased post-heparin plasma hepatic triglyceride lipase activity in hypoxic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2003;111:449–54.
218. Amine EK, Desilets EJ, Hegsted DM. Effect of Dietary Fats on Lipogenesis in Iron Deficiency Anemic Chicks and Rats. *J Nutr.* 1976;106:405–11.

9 Publikationen

Witte N., Muenzner M., Rietscher J., Knauer M., **Heidenreich S.**, Nuotio-Antar A.M., Graef F.A., Fedders R., Tolkachov A., Goehring I. and Schupp M. (2015). The Glucose Sensor ChREBP Links De Novo Lipogenesis to PPAR γ Activity and Adipocyte Differentiation. *Endocrinology*; 156: 4008 – 19.

Klemz R., Reischl S., Wallach T., Witte N., Jürchott K., Klemz S., Lang V., Lorenzen S., Knauer M., **Heidenreich S.**, Xu M., Ripperger J.A., Schupp M., Stanewsky R. and Kramer A. (2017). Reciprocal regulation of carbon monoxide metabolism and the circadian clock. *Nature Structural & Molecular Biology*; 24: 15 – 22.

Prokesch A., Graef F., Madl T., Kahlhofer J., **Heidenreich S.**, Schumann A., Moyschewitz E., Pristoynik P., Blaschitz A., Knauer M., Muenzner M., Bogner-Straussd J. G., Dohr G., Schulz T.J. and Schupp M. (2017). Liver p53 is stabilized upon starvation and required for amino acid catabolism and gluconeogenesis. *FASEB*; 31: 732 – 742.

Heidenreich S., Witte N., Weber P., Goehring I., Tolkachow A., von Loeffelholz C., Döcke S., Bauer M., Stockmann M., Pfeiffer A.F., Birkenfeld A.L., Pietzke M., Kempa S., Muenzner M and Schupp M. (2017). Retinol Saturase Coordinates Liver Metabolism by Upstream Regulation of ChREBP. *Nature Communications*; 8: 384.

Fedders R., Muenzner M., Weber P., Sommerfeld M., Knauer M., Kedziora S., Kast N., **Heidenreich S.**, Raila J., Weger S., Henze A. and Schupp M. (2018). Liver-secreted RBP4 does not impair glucose homeostasis in mice. *JBC*; 293: 15269 – 76.

Berlin, Dezember 2018

10 Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

