

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und
dem Institut für Pharmakologie
der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Untersuchung neuer Funktionen des Transkriptionsfaktors BHLHE40

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Catrin Andrea Stegmann, geb. Taupp
Tierärztin aus Erlenbach am Main

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4211

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und
dem Institut für Pharmakologie
der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Untersuchung neuer Funktionen des Transkriptionsfaktors BHLHE40

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Catrin Andrea Stegmann, geb. Taupp
Tierärztin
aus Erlenbach am Main

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4211

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Schupp
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

transcription factors, transcription, gene expression, DNA, liver cells, adipocytes,
liver, metabolism, real time pcr

Tag der Promotion: 16.07.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-061-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Transkriptionsfaktoren – Aufgaben und Funktionen	1
1.2 Die basic Helix-Loop-Helix-Proteinfamilie	2
1.3 Der Transkriptionsfaktor BHLHE40	2
1.3.1 <i>Bhlhe40</i> -Gen und BHLHE40-Protein	3
1.3.2 BHLHE41	4
1.3.3 Zuordnung von BHLHE40 und BHLHE41 zu einer bHLH-Proteinuntergruppe ..	4
1.3.4 Überblick über Aufgaben und Funktionen von BHLHE40	4
1.3.4.1 Funktion von BHLHE40 während der Adipogenese.....	5
1.3.4.2 Funktion von BHLHE40 im Leberstoffwechsel.....	7
1.4 Zielsetzung.....	8
1.4.1 Voruntersuchungen.....	8
1.4.2 Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
2. Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Verbrauchsmaterial	10
2.1.2 Zelllinien & Kulturbedingungen.....	10
2.1.3 Zellkulturmedien & Zusätze	11
2.1.4 Versuchstiere & Haltungsbedingungen	11
2.1.5 (Bio-) Chemikalien & Reagenzien.....	12
2.1.6 Puffer & Lösungen	14
2.1.7 Reaktionskits.....	18
2.1.8 Laborgeräte.....	18
2.1.9 Adenoviren	19
2.1.10 Primer	19
2.1.11 siRNA.....	20
2.1.12 Antikörper.....	21
2.1.13 Software.....	22
2.2 Zellbiologische Methoden.....	22
2.2.1 Passage von 3T3-L1 Zellen.....	22

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Differenzierung von 3T3-L1-Zellen	22
2.2.3	Adenoviraler Gentransfer	22
2.2.4	Infektion von 3T3-L1-Zellen mit Adenovirus	23
2.2.5	Elektroporation von 3T3-L1 Zellen.....	23
2.2.6	Differenzierung von vorbehandelten 3T3-L1 Zellen	23
2.2.7	Anfärben von Adipozyten mittels Oil Red O.....	24
2.2.8	Isolierung primärer muriner Hepatozyten.....	24
2.2.9	Infektion von primären murinen Hepatozyten mit Adenovirus	25
2.2.10	Behandlung von primären Hepatozyten mit WY-14643	25
2.2.11	Transfektion primärer muriner Hepatozyten mit siRNA.....	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1	RNA-Isolation aus Zellen.....	26
2.3.2	Synthese von cDNA	26
2.3.3	Quantitative Real-Time PCR	26
2.3.4	Chromatin-Immunopräzipitation	27
2.4	Proteinbiochemische Methoden	29
2.4.1	Gesamtproteinextraktion und Proteinquantifizierung mittels BCA.....	29
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Zell- und Leberprotein.....	29
2.4.3	Western Blot	31
2.5	Statistische Auswertung	31
3.	Ergebnisse.....	32
3.1	Einfluss von Bhlhe40 auf die Differenzierung von Adipozyten	32
3.1.1	3T3-L1 Zellen als Modell der Adipogenese	32
3.1.2	Hochregulation der <i>Bhlhe40</i> -Expression während der Adipogenese	34
3.1.3	Einfluss einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression auf die Adipozyten-Differenzierung....	36
3.1.3.1	Ermittlung der Viruskonzentration zur <i>Bhlhe40</i> -Überexpression.....	36
3.1.3.2	<i>Bhlhe40</i> -Überexpression mindert die Expression von <i>Bhlhe41</i>	38
3.1.3.3	<i>Bhlhe40</i> -Überexpression beeinflusst <i>Pparγ</i> -Expression nicht signifikant ..	38
3.1.3.4	<i>Bhlhe40</i> -Überexpression hemmt die Adipogenese.....	39
3.1.4	Einfluss eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Adipozyten-Differenzierung.....	42
3.1.4.1	Validierung des <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns in 3T3-L1 Zellen.....	42
3.1.4.2	<i>Bhlhe40</i> -Knockdown beeinflusst <i>Bhlhe41</i> -Expression nicht signifikant.....	44
3.1.4.3	<i>Bhlhe40</i> -Knockdown beeinflusst <i>Pparγ</i> -Expression nicht signifikant.....	45
3.1.4.4	<i>Bhlhe40</i> -Knockdown fördert die Adipogenese.....	46
3.2	Die Rolle von BHLHE40 im Leberstoffwechsel.....	49

3.2.1	Expression von <i>Bhlhe40</i> in der Leber	49
3.2.2	Expression von <i>Bhlhe40</i> in primären murinen Hepatozyten	52
3.2.2.1	Validierung der <i>Bhlhe40</i> Überexpression in primären Hepatozyten	52
3.2.2.2	<i>Bhlhe40</i> -Überexpression mindert die Expression von <i>Bhlhe41</i>	54
3.2.2.3	Validierung des <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns in primären Hepatozyten	54
3.2.2.4	<i>Bhlhe40</i> -Knockdown steigert die Expression von <i>Bhlhe41</i>	56
3.2.3	Einfluss von BHLHE40 auf PPAR α -Zielgene	57
3.2.3.1	Auswirkungen eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von PPAR α -Zielgenen	57
3.2.3.2	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression auf die Aktivierung von PPAR α -Zielgenen	59
3.2.4	Einfluss von BHLHE40 auf ChREBP-Zielgene	62
3.2.4.1	Auswirkungen eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von ChREBP-Zielgenen	62
3.2.4.2	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression auf die Aktivierung von ChREBP-Zielgenen	64
3.3	Untersuchung neuer genomischer BHLHE40-Bindungsstellen in der Mäuseleber ..	66
3.3.1	Validierung der Chromatin-Immunpräzipitation als Methode	66
3.3.2	Potenzielle neue DNA-Bindungsstelle von BHLHE40 in der Nähe der Gene <i>Klf10</i> und <i>Dgat2</i>	67
4.	Diskussion	69
4.1	Einfluss von BHLHE40 auf die Differenzierung von Adipozyten	69
4.1.1	3T3-L1 Zellen als Modell der Adipogenese	69
4.1.2	Hochregulation der <i>Bhlhe40</i> -Expression während der Adipogenese	69
4.1.3	Einfluss einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression auf die Adipozyten-Differenzierung ..	70
4.1.3.1	<i>Bhlhe40</i> -Überexpression mindert die Expression von <i>Bhlhe41</i>	70
4.1.3.2	<i>Bhlhe40</i> -Überexpression beeinflusst <i>Pparγ</i> -Expression nicht signifikant ..	71
4.1.3.3	<i>Bhlhe40</i> -Überexpression hemmt die Adipogenese	71
4.1.4	Einfluss eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Adipozyten-Differenzierung	72
4.1.4.1	<i>Bhlhe40</i> -Knockdown beeinflusst <i>Bhlhe41</i> -Expression nicht signifikant	72
4.1.4.2	<i>Bhlhe40</i> -Knockdown beeinflusst <i>Pparγ</i> -Expression nicht signifikant	73
4.1.4.3	<i>Bhlhe40</i> -Knockdown fördert die Adipogenese	73
4.2	Die Rolle von BHLHE40 im Leberstoffwechsel	74

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	Einfluss von BHLHE40 auf die Expression von <i>Bhlhe41</i>	74
4.2.2	Einfluss von BHLHE40 auf PPAR α -Zielgene.....	74
4.2.2.1	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression bzw. eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von <i>Pdk4</i>	75
4.2.2.2	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression bzw. eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von <i>Fabp1</i>	75
4.2.2.3	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression bzw. eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von <i>Angptl4</i>	76
4.2.2.4	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression bzw. eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von <i>Hmgcs2</i>	77
4.2.3	Einfluss von BHLHE40 auf ChREBP-Zielgene	77
4.2.3.1	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression bzw. eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von <i>Txnip</i>	78
4.2.3.2	Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression bzw. eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf die Aktivierung von <i>Rgs16</i>	78
4.3	Untersuchung neuer genomischer BHLHE40-Bindungsstellen in der Mäuseleber..	79
4.4	Bedeutung von BHLHE40 für den Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus	80
5.	Zusammenfassung.....	82
6.	Summary.....	83
7.	Literaturverzeichnis	84
	Danksagung.....	94
	Selbstständigkeitserklärung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

36b4	<i>Mus musculus, ribosomal protein, large, P0</i>
AG	Arbeitsgruppe
Angptl4	<i>angiopoietin-like 4</i>
Adeno-BHLHE40	Adenoviren, die Bhlhe40 exprimieren
Adeno-GFP	Adenoviren, die GFP exprimieren
Adipoq	<i>adiponectin</i>
aP2	<i>adipocyte protein 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
Bhlhe40	<i>basic helix-loop-helix family member E40</i>
Bhlhe41	<i>basic helix-loop-helix family member E41</i>
Bmal1	<i>brain and muscle arnt-like 1</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Ccnd2	<i>G1/S-specific cyclin-D2</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/ebp α	<i>CCAAT/enhancer binding protein α</i>
C/ebp β	<i>CCAAT/enhancer binding protein β</i>
C/ebp δ	<i>CCAAT/enhancer binding protein δ</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-qPCR	Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender qPCR
ChoRE	<i>carbohydrate response element</i>
Chrebp	<i>carbohydrate response element-binding protein</i>
Clock	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
c-myc	<i>MYC proto-oncogene</i>
CoA	Coenzym A
Cry	<i>cryptochrome</i>
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
Dec1	<i>differentiated embryo chondrocyte 1</i>
Dgat2	<i>diacylglycerol O-acyltransferase 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

Abkürzungsverzeichnis

DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E-box-Elemente	<i>enhancer</i> -Elemente (Verstärker-Elemente)
EBSS	<i>Earl's Balanced Salt Solution</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr1	<i>early growth response 1</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
et al.	und andere (von <i>lat. et alii</i>)
Fabp1	<i>fatty acid-binding protein 1</i>
FABPs	Fettsäuren-bindende Proteine
Fas/Fasn	<i>fatty acid synthase</i>
FBS	Fetales Kälberserum
Fgf21	<i>fibroblast growth factor 21</i>
G	Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gata2	<i>GATA-binding factor 2</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazinyl-Ethansulfonsäure
HGNC	HUGO-Gen-Nomenklatur-Komitee
Hif-1 α	<i>hypoxia-inducible factor subunit 1α</i>
HLH	<i>helix-loop-helix</i>
Hmgcs2	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUGO	<i>Human Genome Organization</i>
IB	Immunoblot
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IEG	<i>immediate early gene</i>
Input	Totalchromatin aus Gesamtzelllysat
IVC	Individuell ventilierter Käfig
kDa	Kilodalton
Klf10	<i>krueppel-like factor 10</i>

LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
Lpk	<i>liver pyruvate kinase</i>
LXR α	<i>liver x receptor α</i>
LXRE	<i>liver x receptor-response element</i>
m	<i>Mus musculus</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MyoD	<i>myogenic differentiation</i>
n	Anzahl der Tiere bzw. Anzahl der Experimente unter gleicher Bedingung
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NRE	<i>nuclear receptor response element</i>
PAS	<i>per-arnt-sim</i> (Proteindomäne)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
Pdk4	<i>pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4</i>
Pklr	<i>pyruvate kinase isozyme L/R</i>
Per	<i>period</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
Ppara	<i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
Ppary	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
Pref1	<i>preadipocyte factor 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RAN	<i>ras-related nuclear protein</i>
RAR α	<i>retinoic acid receptor α</i>
RBP4	Retinol-Bindungsprotein 4
RetSat	<i>retinol saturase</i>
Rgs16	<i>regulator of G-protein signaling 16</i>
RIPA	Proteinlysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RORE	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor-response element</i>

Abkürzungsverzeichnis

rpm	<i>rounds per minute</i>
RXR α	<i>retinoid x receptor α</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sharp2	<i>enhancer of split and hairy-related protein 2</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Srebp-1c	<i>sterol regulatory element-binding protein-1c</i>
Stra13	<i>stimulated by retinoic acid 13</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
TZDs	Thiazolidindione (Insulin-Sensitizer)
Txnip	<i>thioredoxin interacting protein</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
Well	<i>well</i> (Vertiefung in einer Zellkulturplatte)
w/v	Gewicht pro Volumen
WY-14643	PPAR α -Agonist

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des murinen <i>Bhlhe40</i> -Gens und BHLHE40-Proteins. ...	3
Abbildung 2: Phänotyp 3T3-L1 Zellen an Tag 0 und Tag 7 der Adipogenese.	32
Abbildung 3: Expression der Präadipozyten-Markergene <i>Pref1</i> & <i>Gata2</i> in 3T3-L1 Zellen. ...	33
Abbildung 4: Expression der Adipozyten-Markergene <i>Pparγ2</i> , <i>C/ebpa</i> , <i>aP2</i> und <i>Adipoq</i> 3T3-L1 Zellen.	33
Abbildung 5: Adipozyten-Marker PPAR γ , C/EBP α , aP2 und ADIPOQ auf Proteinebene.	34
Abbildung 6: Zunehmende Expression von <i>Pparγ2</i> und <i>aP2</i> während der Adipogenese auf mRNA-Ebene.	34
Abbildung 7: Zunehmende Expression von <i>Bhlhe40</i> und <i>Bhlhe41</i> während der Adipogenese auf mRNA-Ebene.	35
Abbildung 8: Zunehmende Expression von BHLHE40 und PPAR γ während der Adipogenese auf Proteinebene.	35
Abbildung 9: Menge an BHLHE40-Protein nach adenoviraler Überexpression.	36
Abbildung 10: Verwendete Konzentration an Adenoviren führte zur Infektion von ca. 50 % der Zellen.	37
Abbildung 11: <i>Bhlhe40</i> ca. 60-fach überexprimiert nach Behandlung der Zellen mit Adeno-BHLHE40.	37
Abbildung 12: Verminderte Expression von <i>Bhlhe41</i> als Antwort auf <i>Bhlhe40</i> -Überexpression.	38
Abbildung 13: Keine signifikante Reduktion der <i>Pparγ2</i> - und <i>Pparγ1</i> -Expression nach <i>Bhlhe40</i> -Überexpression.	39
Abbildung 14: <i>Bhlhe40</i> -Überexpression hemmt die Adipogenese.	40
Abbildung 15: <i>Bhlhe40</i> -Überexpression hemmt die Expression der Adipozyten-Markergene <i>Pparg2</i> , <i>aP2</i> , <i>Adipoq</i> und <i>C/ebpa</i>	41
Abbildung 16: <i>Bhlhe40</i> -Überexpression hemmt die Expression der Adipozyten-Markerproteine PPAR γ , aP2, Adiponektin und C/EBP α	41
Abbildung 17: Schematische Darstellung der für den <i>Bhlhe40</i> -Knockdown verwendeten <i>Bhlhe40</i> -spezifischen siRNAs.	42
Abbildung 18: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown in 3T3-L1 Zellen mit siRNA <i>Bhlhe40_677</i>	43
Abbildung 19: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown in 3T3-L1 Zellen mit siRNA <i>Bhlhe40_419</i>	43
Abbildung 20: Einfluss eines <i>Bhlhe40</i> -Knockdowns auf den Gehalt an BHLHE40-Protein. ...	44
Abbildung 21: Keine signifikante Beeinflussung der <i>Bhlhe41</i> -Expression durch <i>Bhlhe40</i> -Knockdown.	45
Abbildung 22: Keine signifikante Veränderung der <i>Pparγ2</i> - und <i>Pparγ1</i> -Expression nach <i>Bhlhe40</i> -Knockdown.	46
Abbildung 23: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown fördert die Adipogenese.	47
Abbildung 24: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown fördert die Expression der Adipozyten-Markergene <i>Pparg2</i> , <i>aP2</i> , <i>Adipoq</i> und <i>C/ebpa</i>	48
Abbildung 25: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown fördert die Expression der Adipozyten-Markerproteine PPAR γ , aP2, Adiponektin und C/EBP α	49
Abbildung 26: <i>Bhlhe40</i> mRNA-Expression in Leber- und Fettgewebe von männlichen C57BL/6J Mäusen.	50
Abbildung 27: Menge an BHLHE40-Protein in der Leber in Abhängigkeit von dem Ernährungsstatus.	51
Abbildung 28: <i>Bhlhe40</i> mRNA-Expression in der Leber in Abhängigkeit von dem Ernährungsstatus.	51
Abbildung 29: Dosisverlauf BHLHE40-Überexpression in primären Hepatozyten.	52
Abbildung 30: Infektion primärer Hepatozyten mit Adenoviren.	53
Abbildung 31: Überexpression von <i>Bhlhe40</i> in primären murinen Hepatozyten.	53
Abbildung 32: Expression von <i>Bhlhe41</i> in primären murinen Hepatozyten nach <i>Bhlhe40</i> -Überexpression.	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 33: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown in primären murinen Hepatozyten.....	55
Abbildung 34: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown in primären murinen Hepatozyten auf Proteinebene.	56
Abbildung 35: Expression von <i>Bhlhe41</i> in primären murinen Hepatozyten nach <i>Bhlhe40</i> -Knockdown.....	57
Abbildung 36: <i>Bhlhe40</i> -Knockdown in primären murinen Hepatozyten und anschließende Behandlung der Zellen mit PPAR α -Agonist WY-14643.	58
Abbildung 37: Expression von PPAR α -Zielgenen nach <i>Bhlhe40</i> -Knockdown und Behandlung der Zellen mit 50 μ M des PPAR α -Agonisten WY-14643.....	59
Abbildung 38: <i>Bhlhe40</i> -Überexpression in primären murinen Hepatozyten und anschließende Behandlung der Zellen mit PPAR α -Agonist WY-14643.	60
Abbildung 39: Expression von PPAR α -Zielgenen nach <i>Bhlhe40</i> -Überexpression und Behandlung der Zellen mit 50 μ M PPAR α -Agonist WY-14643.....	61
Abbildung 40: Expression von ChREBP-Zielgen <i>Txnip</i> nach <i>Bhlhe40</i> -Knockdown.....	63
Abbildung 41: Expression von ChREBP-Zielgen <i>Rgs16</i> nach <i>Bhlhe40</i> -Knockdown.	64
Abbildung 42: Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression auf das ChREBP-Zielgen <i>Txnip</i>	65
Abbildung 43: Auswirkungen einer <i>Bhlhe40</i> -Überexpression auf das ChREBP-Zielgen <i>Rgs16</i>	65
Abbildung 44: Keine Anreicherung des untersuchten genomischen Fragments in der Nähe des Insulingens durch ChREBP- bzw. <i>Bhlhe40</i> -ChIP.	66
Abbildung 45: Anreicherung genomischer Fragmente in der Nähe der ChREBP-Zielgene <i>Txnip</i> und <i>Pklr</i> durch Immunpräzipitation.....	67
Abbildung 46: Anreicherung genomischer Fragmente nahe <i>Klf10</i> , <i>Dgat2</i> und <i>Ccnd2</i> durch Chromatin-Immunpräzipitation mittels ChREBP-spezifischem bzw. BHLHE40-spezifischem Antikörper.....	68
Abbildung 47: <i>Pparγ</i> -Knockdown beeinflusst die <i>Bhlhe40</i> -Expression nicht signifikant.....	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	10
Tabelle 2: Liste der verwendeten Zellkulturmedien & Zusätze	11
Tabelle 3: Liste der verwendeten (Bio-) Chemikalien & Reagenzien.....	12
Tabelle 4: Proteinlysepuffer (RIPA)	14
Tabelle 5: Trenngelpuffer für die SDS-Gelelektrophorese	14
Tabelle 6: Sammelgelpuffer für die SDS-Gelelektrophorese.....	14
Tabelle 7: 10 x Elektrophoresepuffer	14
Tabelle 8: Transferpuffer für Western Blot (Towbin Buffer).....	15
Tabelle 9: 10 x TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)	15
Tabelle 10: TBST - Waschlösung für Westen Blot Membran	15
Tabelle 11: Blockpuffer für Western Blot Membran.....	15
Tabelle 12: ChIP – Hypotonischer Lysepuffer (HLB)	15
Tabelle 13: ChIP – SDS-Lysepuffer.....	16
Tabelle 14: ChIP – Verdünnungspuffer.....	16
Tabelle 15: ChIP – Blockpuffer	16
Tabelle 16: ChIP - Waschpuffer.....	16
Tabelle 17: ChIP – TE-Puffer.....	17
Tabelle 18: ChIP – Elutionspuffer	17
Tabelle 19: Perfusionspuffer für die Isolation primärer Hepatozyten	17
Tabelle 20: Digestionspuffer für die Isolation primärer Hepatozyten	17
Tabelle 21: Lösung für Dichtegradientenzentrifugation primärer Hepatozyten	17
Tabelle 22: Liste der verwendeten Reaktionskits.....	18
Tabelle 23: Liste der verwendeten Laborgeräte.....	18
Tabelle 24: Verwendete Adenoviren.....	19
Tabelle 25: Liste der verwendeten qRT-PCR-Primer.....	19
Tabelle 26: Liste der Primer für genomische Regionen in der ChIP-qPCR	20
Tabelle 27: Liste der verwendeten siRNA.....	20
Tabelle 28: Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot	21
Tabelle 29: Liste der verwendeten Antikörper für ChIP	21
Tabelle 30: Liste der verwendeten Software	22
Tabelle 31: Formaldehydfixierlösung	24
Tabelle 32: Oil Red O-Vorratslösung	24
Tabelle 33: Oil Red O-Färbelösung	24
Tabelle 34: Mastermix für cDNA-Synthese	26
Tabelle 35: Mastermix für die qRT-PCR.....	26
Tabelle 36: Bedingungen für die qRT-PCR.....	27
Tabelle 37: Herstellung einer 33 %-igen Suspension von Sepharose <i>A-beads</i>	28
Tabelle 38: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE	30
Tabelle 39: Zusammensetzung der Sammelgele für die SDS-PAGE.....	30
Tabelle 40: Validierung der <i>Bhlhe40</i> -Überexpression in primäre Hepatozyten - Schema der verwendeten Adeno-BHLHE40- und Adeno-GFP-Konzentrationen	52
Tabelle 41: <i>Bhlhe40</i> -Überexpression und Aktivierung von ChREBP-Zielgenen - Schema der verwendeten Adeno-BHLHE40- und Adeno-GFP-Konzentrationen	64

1. Einleitung

1.1 Transkriptionsfaktoren – Aufgaben und Funktionen

Nach dem zentralen Dogma der Molekularbiologie (Crick 1958, Crick 1970) wird die, in der DNA verschlüsselte, genetische Information zuerst in Boten-RNA (mRNA) übersetzt (Transkription), bevor an den Ribosomen die Umwandlung in Protein stattfindet (Translation). Damit nimmt die Transkription eine essentielle Rolle im Prozess der Genexpression ein.

In Eukaryoten wird die Transkription Protein-kodierender Gene durch das Enzym RNA-Polymerase II katalysiert. Im Gegensatz zu DNA-Polymerasen benötigen RNA-Polymerasen keinen Primer. Sie binden direkt an eine bestimmte DNA-Sequenz, die als Promotor bezeichnet wird. Die enzymatische Aktivität der RNA-Polymerase alleine ist allerdings nicht ausreichend für die Initiation der Transkription. Vielmehr sind dazu weitere Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, nötig, die mit der RNA-Polymerase interagieren und den Prozess der Transkription starten (Latchman 2004, Graw 2015).

Man unterscheidet dabei generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren. Generelle Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor IID-Komplex (TFIID-Komplex), bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den Präinitiationskomplex (Hampsey 1998, Thomas und Chiang 2006). Dieser wiederum ist Voraussetzung für die Bildung des Initiationskomplexes, der aus weiteren generellen Transkriptionsfaktoren besteht und die Bindung der RNA-Polymerase II an die DNA ermöglicht. Generelle oder allgemeine Transkriptionsfaktoren kommen in allen Zellen vor und sind nötig für die basale Transkriptionsaktivität aller Protein-kodierenden Gene (Campbell, Reece et al. 2009).

Im Gegensatz dazu sorgen spezifische oder regulatorische Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung mit allgemeinen Transkriptionsfaktoren dafür, dass bestimmte Gene verstärkt exprimiert werden oder die Expression bestimmter Gene gehemmt wird. Dies geschieht meist als Antwort auf extrazelluläre Signale. Da in eukaryotischen Organismen jeweils alle Zellen das vollständige Genom enthalten, ist dieser Mechanismus essentiell, um genau die Gene anzuschalten, die für die Funktion der jeweiligen Zelle nötig sind. Spezifische Transkriptionsfaktoren binden dabei an sogenannte Verstärker- oder *Enhancer*-Elemente (E-box-Elemente), die jedoch in weiter Entfernung zum Promotor liegen können. Der nötige Kontakt zwischen den, am Verstärker gebundenen, spezifischen Transkriptionsfaktoren und den, am Promotor gebundenen, allgemeinen Transkriptionsfaktoren, wird durch die Nukleosomenstruktur der DNA, sowie deren Vermögen zur Schleifenbildung ermöglicht (Wrba, Dolznig et al. 2011).

Neben ihrer Wirkung als Aktivatoren der Genexpression, können regulatorische Transkriptionsfaktoren ebenso die Expression bestimmter Gene hemmen. Dies geschieht entweder direkt durch DNA-Bindung, z.B. an E-box-Elemente, und Blockierung einer Aktivator-Bindungsstelle oder indirekt durch Protein-Protein-Interaktion mit Aktivatoren.

Einige regulatorische Transkriptionsfaktoren sind zudem in der Lage die Transkription indirekt, durch Einflussnahme auf die Chromatinstruktur, zu steuern. Wechselwirkungen mit Histonacetylasen (Förderung der Transkription) oder Histondeacetylasen (Repression der Transkription, „Silencing“) führen zu einer Modifikation der Chromatinstruktur und beeinflussen so die Transkriptionsrate (Campbell, Reece et al. 2009). Die Acetylierung findet an spezifischen Lysinresten der Histone statt und führt zu einer Minderung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Lysinresten und der DNA (Strahl und Allis 2000). Dies resultiert in einer Öffnung der Chromatinstruktur, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht und die Transkription gefördert wird.

Nach dem Aufbau ihrer DNA-bindenden Domäne können Transkriptionsfaktoren verschiedenen Proteingruppen zugeordnet werden. Dazu zählen unter anderem die Zinkfinger-Proteine, die Leucin-Zipper-Proteine und die Helix-Loop-Helix-Proteine (Graw 2015).

1.2 Die basic Helix-Loop-Helix-Proteinfamilie

Transkriptionsfaktoren der basic Helix-Loop-Helix-Proteinfamilie (bHLH-Proteine) stellen wichtige Regulatoren des Stoffwechsels (Brown und Goldstein 1997, Kato, Kawamoto et al. 2014, Ow, Tan et al. 2014), der Entwicklung und der Zelldifferenzierung in einer Vielzahl verschiedener Organismen, von Hefen über *Drosophila melanogaster* bis hin zu Säugetieren, dar (Massari und Murre 2000).

Gemeinsam ist diesen Proteinen ein Sequenzmotiv, das bHLH-Sequenzmotiv, welches zuerst in c-myc, MyoD (Davis, Weintraub et al. 1987) und dem *achaete-scute* Komplex von *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde (Villares und Cabrera 1987). Später wurde dieses Sequenzmotiv in einer Vielzahl weiterer Proteine nachgewiesen, wie zum Beispiel in den *Drosophila*-Proteinen *Hairy* (Rushlow, Hogan et al. 1989) und *Enhancer of split* (Klammt, Knust et al. 1989).

Dieses oben genannte Sequenzmotiv stellt eine evolutionär hochkonservierte Proteinsequenz dar und ermöglicht einerseits die Bindung an DNA, andererseits die Interaktion von Proteinen untereinander (Murre, McCaw et al. 1989). Zwei Motive sind dafür entscheidend. Zum Ersten die basische Region, die vorrangig aus basischen Aminosäureresten besteht und die Bindung von bHLH-Proteinen an die DNA vermittelt (Murre, Bain et al. 1994). Zum Zweiten die HLH-Domäne, welche aus zwei amphipathischen α -Helices und einer dazwischen liegenden Schleife besteht. Die HLH-Domäne ist essentiell für die Protein-Protein-Interaktion, sowie die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren (Murre, McCaw et al. 1989, Murre, Bain et al. 1994). Einige bHLH-Proteine enthalten zusätzlich ein Leucin-Zipper-Dimerisierungsmotiv, welches direkt C-terminal an die bHLH-Domäne angrenzt (Atchley und Fitch 1997).

BHLH-Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Transkription ihrer Zielgene über die Bindung an sogenannte E-Box-Elemente in deren Promotor oder Enhancer-Regionen. Die Spezifität der Bindung wird dabei nicht über die E-box-Elemente selbst, sondern vermutlich über benachbarte Sequenzen, die direkt an die E-Box-Elemente angrenzen, vermittelt (Murre, Bain et al. 1994).

Aufgrund der Vielzahl der beschriebenen bHLH-Proteine wurde diese Proteinfamilie weiter unterteilt. Zuerst wurden dabei zwei Klassen unterschieden: die ubiquitär vorhandenen bHLH-Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel E12/E47 (Murre, Bain et al. 1994) und die zellspezifischen bHLH-Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel MyoD (Davis, Weintraub et al. 1987) oder Proteine des *achaete-scute* Komplexes (Villares und Cabrera 1987).

Später wurde dann eine Unterteilung der bHLH-Transkriptionsfaktoren in sechs Klassen vorgenommen, basierend auf der Gewebeverteilung, der Fähigkeit zur Dimerisierung und der spezifischen DNA-Bindung (Massari und Murre 2000).

Neben dieser eher strukturell-funktionellen Einteilung existiert parallel eine evolutionäre Klassifikation der bHLH-Proteine auf Basis einer phylogenetischen Analyse der Aminosäuresequenzen des bHLH-Motivs (Atchley und Fitch 1997). In einer weiteren Studie wurde die gesamte codierende Sequenz von sieben verschiedenen Spezies mit über 600 bHLH-Genen phylogenetisch analysiert. Basierend auf dieser Analyse wurden die bHLH-Proteine in sechs Kladen (Klade A-F) unterteilt (Stevens, Roalson et al. 2008, Skinner, Rawls et al. 2010).

1.3 Der Transkriptionsfaktor BHLHE40

BHLHE40 steht für basic Helix-Loop-Helix Proteinfamilienmitglied e40 und bezieht sich auf die Einteilung des Transkriptionsfaktors in die bHLH-Proteinsuperfamilie. *Bhlhe40* stellt die offizielle, durch das HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) festgelegte Bezeichnung des Gens dar. Allerdings wurde BHLHE40 von mehreren Gruppen unabhängig und fast zeitgleich in verschiedenen Organismen beschrieben. Daher ist das Protein unter einer Vielzahl weiterer Namen bekannt, wie zum Beispiel DEC1 (*Differentiated embryo chondrocyte 1*) (Shen, Kawamoto et al. 1997), STRA13 (*Stimulated with retinoic acid 13*) (Boudjelal, Taneja et al. 1997) oder SHARP2 (*enhancer of split and hairy-related protein 2*) (Rossner, Dorr et al. 1997).

1.3.1 *Bhlhe40*-Gen und BHLHE40-Protein

Das *Bhlhe40*-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 3 lokalisiert (Antonevich und Taneja 1999) und aus 3152 Basenpaaren aufgebaut. Das humane BHLHE40-Protein umfasst 412 Aminosäuren, die Proteinmasse beträgt ca. 45 kDa (Shen, Kawamoto et al. 1997). Bei der Maus liegt das *Bhlhe40*-Gen auf Chromosom 6 (Sun, Mattei et al. 1999) und besteht aus 3113 Basenpaaren. Das murine BHLHE40-Protein umfasst 411 Aminosäuren. BHLHE40 gehört zu einer evolutionär hochkonservierten Proteinfamilie (Murre, Bain et al. 1994). Die Proteinsequenzen des humanen und murinen BHLHE40-Proteins unterscheiden sich lediglich in 38 Aminosäuren (Yamada und Miyamoto 2005). Die *Bhlhe40*-Gene von Säugetieren beinhalten 5 Exons und 4 Introns (Teramoto, Nakamasu et al. 2001).

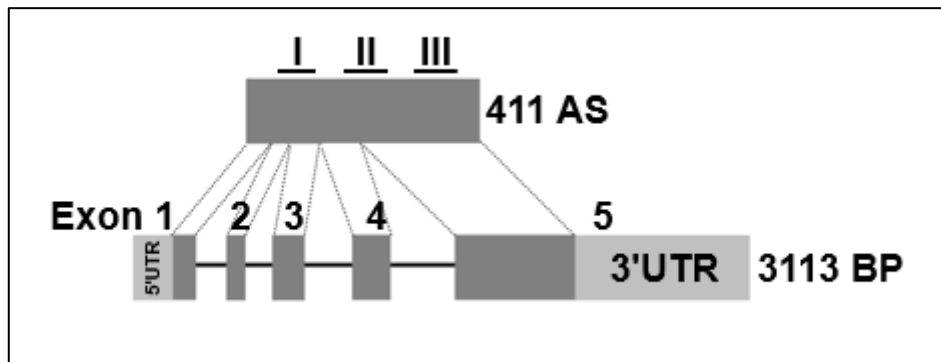


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des murinen *Bhlhe40*-Gens und BHLHE40-Proteins.

Dargestellt ist der schematische Aufbau des murinen BHLHE40-Proteins (oben), bestehend aus 411 Aminosäuren, und des murinen *Bhlhe40*-Gens (unten), bestehend aus 3113 Basenpaaren, verteilt auf den untranslatierten Bereich, 5 Exons und 4 Introns (UTR: untranslatierte Region, AS: Aminosäuren, BP: Basenpaare, I: bHLH-Domäne mit LXXLL-Motiv, II: Orange-Domäne, III: Prolin-reiche Region)

Ebenso wie die restlichen Mitglieder der bHLH-Proteinfamilie besitzt auch das BHLHE40-Protein eine hochkonservierte bHLH-Domäne in der N-terminalen Proteinregion. Die basische Region ist dabei verantwortlich für die DNA-Bindung an E-box-Elemente (5'-CACGTG-3') in der Promotorregion von Zielgenen und die Vermittlung der suppressiven Aktivität von BHLHE40 (Honma, Kawamoto et al. 2002, Kawamoto, Noshiro et al. 2004, Sato, Kawamoto et al. 2004). Hierbei scheint die Spezifität der DNA-Bindung durch die Aminosäure Prolin beeinflusst zu werden (Teramoto, Nakamasu et al. 2001). Die HLH-Region vermittelt die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen, sowie zur Bildung von Homo- und Heterodimeren (Murre, Bain et al. 1994). Innerhalb der HLH-Region findet man zudem ein LXXLL-Motiv, welches essentiell ist für die Interaktion zwischen BHLHE40 und RXR α (Cho, Noshiro et al. 2009).

Zusätzlich zur bHLH-Domäne besitzt BHLHE40, wie auch BHLHE41 und die *Drosophila*-Proteine *Hairy* und *Enhancer of split*, eine Orange-Domäne (Dawson, Turner et al. 1995). Diese befindet sich zwischen der bHLH-Domäne und der Prolin-reichen Region. Während über ihre Funktion bei Wirbeltieren relativ wenig bekannt ist, scheint sie mit der Protein-Protein-Interaktion zwischen den *Drosophila*-Proteinen *Hairy* und *Scute* assoziiert zu sein (Parkhurst, Bopp et al. 1990, Dawson, Turner et al. 1995).

C-terminal befindet sich außerdem eine Prolin-reiche Region, gekennzeichnet durch das besonders häufige Vorkommen der Aminosäure Prolin (Yamada und Miyamoto 2005). In der Literatur wird bisher keine spezielle Funktion der Prolin-reichen Region für BHLHE40 beschrieben, jedoch wird diese Region funktionell häufig mit Protein-Protein-Interaktionen in Verbindung gebracht (Williamson 1994, Kanelis, Donaldson et al. 2000, Morgan und Rubenstein 2013).

In der Promotorregion des humanen *Bhlhe40*-Gens befinden sich drei E-box-Elemente, innerhalb des murinen *Bhlhe40*-Promotors mindestens zwei E-box-Elemente, welche sowohl

für die Aktivierung der *Bhlhe40*-Expression, als auch für deren Hemmung verantwortlich sind (Teramoto, Nakamasu et al. 2001, Kawamoto, Noshiro et al. 2004, Sato, Kawamoto et al. 2004). Die murine Promotorregion enthält außerdem mehrere AGGTCA-Sequenzen, welche *nuclear receptor response elements* (NREs) darstellen und die Interaktion mit einer weiteren Gruppe an Transkriptionsfaktoren, den nukleären Rezeptoren, ermöglichen (Noshiro, Usui et al. 2009). Unter diesen NREs wurden auch ein *liver x receptor-response element* (LXRE) und ein *retinoic acid receptor-related orphan receptor-response element* (RORE) identifiziert (Noshiro, Usui et al. 2009, Ozaki, Noshiro et al. 2012).

1.3.2 BHLHE41

In Zusammenhang mit BHLHE40 muss ebenso BHLHE41 erwähnt werden. BHLHE41 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor aus der bHLH-Proteinsuperfamilie und sehr nahe verwandt mit BHLHE40. Beide Proteine weisen eine Homologie von über 50 % in ihrer Orange-Domäne auf, ihre bHLH-Domänen stimmen sogar zu über 90 % überein (Yamada und Miyamoto 2005). Es ist zudem bekannt, dass die Bildung von Heterodimeren zwischen BHLHE40 und BHLHE41 möglich ist (Sato, Kawamoto et al. 2004). Weiterhin beeinflussen BHLHE40 und BHLHE41 gegenseitig das Ausmaß ihrer Expression. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass BHLHE40 die Expression von BHLHE41 in Karzinomen negativ reguliert (Li, Xie et al. 2003).

1.3.3 Zuordnung von BHLHE40 und BHLHE41 zu einer bHLH-Proteinuntergruppe

Aufgrund der signifikanten Ähnlichkeit ihrer bHLH- und Orange-Domänen wurden BHLHE40 und BHLHE41 zuerst der gleichen bHLH-Proteinuntergruppe zugeordnet wie die *Drosophila*-Proteine *Hairy* und *Enhancer of split* (Shen, Kawamoto et al. 1997, Teramoto, Nakamasu et al. 2001). Jedoch fehlt sowohl BHLHE40, als auch BHLHE41 das WRPW-Motiv für die Rekrutierung des Co-Repressors Groucho, welches für andere bHLH-Proteine dieser Untergruppe typisch ist (Paroush, Finley et al. 1994, Fisher, Ohsako et al. 1996, Yamada und Miyamoto 2005). Basierend auf der phylogenetischen Analyse der gesamten codierenden Sequenz mit Einteilung der bHLH-Proteine in sechs Kladen von A bis F, werden BHLHE40 und BHLHE41 nun Klade E zugeordnet, welcher auch die bHLH-PAS Proteine *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK) und *brain and muscle arnt-like 1* (BMAL1) angehören (Stevens, Roalson et al. 2008, Skinner, Rawls et al. 2010).

1.3.4 Überblick über Aufgaben und Funktionen von BHLHE40

Der Transkriptionsfaktor BHLHE40 fungiert hauptsächlich als ein transkriptioneller Repressor, der auch die eigene Expression negativ regulieren kann (Sun und Taneja 2000, Davis und Turner 2001). Seine hemmende Wirkung wird dabei durch die direkte Bindung an DNA, genauer die Bindung an E-box-Elemente in der Promotorregion von Zielgenen ausgeübt (Li, Xie et al. 2003). Weiterhin kann die Hemmung über Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie dem basalen Transkriptionsfaktor TFIIIB (Sun und Taneja 2000), dem Hypoxie-induzierten Faktor-1 α (HIF-1 α) (Choi, Cho et al. 2008) oder dem Retinoid-X-Rezeptor- α (RXR α) erfolgen. Die Interaktion von BHLHE40 mit RXR α kann sich zudem hemmend auf die Transaktivierung von nukleären Rezeptoren auswirken, die Heterodimere mit RXR α bilden, wie zum Beispiel den Retinsäure-Rezeptor- α (RAR α) oder die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) (Kliwer, Umesono et al. 1992, Cho, Noshiro et al. 2009). Die negative Autoregulation der eigenen Expression, gezeigt in NIH-3T3-Zellen, geschieht durch Histondeacetylase (HDAC)-vermittelte Modifizierung der Chromatinstruktur (Sun und Taneja 2000).

In der Funktion als Transkriptionsfaktor spielt BHLHE40 eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Zelldifferenzierung verschiedener Organismen, bei der Anpassung von

Lebewesen an Umweltreize, insbesondere den Tag-Nacht-Rhythmus, bei Reaktionen des Immunsystems und bei der Regulation des Zellstoffwechsels.

BHLHE40 ist beteiligt an der Steuerung der Differenzierung von Chondrozyten (Shen, Kawamoto et al. 1997, Shen, Yoshida et al. 2002) und an der Stimulation der Neurogenese von Säugetierembryozellen durch Repression des mesodermalen Differenzierungsweges (Boudjelal, Taneja et al. 1997, Rossner, Dorr et al. 1997). Dabei scheint BHLHE40 seinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung zumindest teilweise über eine Kopplung an den cAMP-Signaltransduktionsweg auszuüben (Shen, Kawamoto et al. 2001).

Des Weiteren ist BHLHE40, wie auch BHLHE41, als Teil der molekularen Uhr an der Aufrechterhaltung und Regulation des zirkadianen Rhythmus beteiligt. Die biologische Uhr besteht aus mehreren autoregulatorischen Rückkopplungsschleifen, wobei die Proteine CLOCK und BMAL1 die positive und die Proteine *period* (PER) und *cryptochrome* (CRY) die negative Komponente dieses komplexen Regulationssystems darstellen (Darlington, Wager-Smith et al. 1998, Gekakis, Staknis et al. 1998, Kume, Zylka et al. 1999). Eine weitere negative Rückkopplungsschleife ist die sogenannte DEC-Schleife, welche aus BHLHE40 (DEC1) und BHLHE41 (DEC2) aufgebaut ist. CLOCK:BMAL1 steigert die Promotoraktivität von *Bhlhe40*. BHLHE40 wiederum interagiert mit BMAL1 und hemmt die CLOCK:BMAL1-induzierte Transaktivierung des *clock genes Per1*. Außerdem wirkt BHLHE40 autoregulatorisch negativ auf die eigene Expression (Honma, Kawamoto et al. 2002, Kawamoto, Noshiro et al. 2004, Sato, Kawamoto et al. 2004, Noshiro, Furukawa et al. 2005). Wird der zirkadiane Rhythmus gestört und damit die Synchronisation von Stoffwechselprozessen beeinträchtigt, begünstigt dies die Entstehung von metabolischen Erkrankungen, wie Fettleibigkeit oder Diabetes (Panda 2016, McHill und Wright 2017). Zudem kann sich das Risiko einer Tumorerkrankung erhöhen (Parent, El-Zein et al. 2012, Sato, Bhawal et al. 2016).

Eine weitere wichtige Rolle spielt BHLHE40 bei der Neutralisierung von Antigenen durch das Immunsystem. BHLHE40 ist essentiell für die Aktivierung von T-Zellen, die Homöostase von regulatorischen T-Zellen und für die Repression von autoimmunen Reaktionen gegen körpereigene Zellen (Sun, Lu et al. 2001, Miyazaki, Miyazaki et al. 2010). Insbesondere scheint BHLHE40 die Reaktion von T-Helferzellen auf eine Infektion mit Helminthen zu steuern (Jarjour, Bradstreet et al. 2020). Weiterhin ist BHLHE40 an der Regulation von Gewebe-residenten Gedächtnis-T-Zellen (TRM-Zellen), sowie Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) beteiligt (Li, Zhu et al. 2019) und übernimmt zusammen mit BHLHE41 eine regulatorische Funktion während der Selbsterneuerung von Alveolarmakrophagen (Rauschmeier, Gustafsson et al. 2019).

Ebenso beeinflusst BHLHE40 eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen, wie zum Beispiel die Steuerung der Adipogenese in Fettzellen und die Regulation des Fettstoffwechsels in der Leber (Yun, Maecker et al. 2002, Iizuka und Horikawa 2008, Park und Park 2012).

1.3.4.1 Funktion von BHLHE40 während der Adipogenese

Die Adipogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der durch das Zusammenwirken mehrerer Transkriptionsfaktoren initiiert und unterhalten wird. Eine zentrale Rolle kommt hierbei dem Transkriptionsfaktor PPAR γ zu, einem nukleären Rezeptor, der auch als Masterregulator der Adipogenese bezeichnet wird (Chawla, Schwarz et al. 1994, Rosen, Hsu et al. 2002, Farmer 2006, Park und Park 2012). Nukleäre Rezeptoren sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Zielgenen regulieren (Aranda und Pascual 2001). Endogene Liganden für PPAR γ stellen vor allem Fettsäuren und deren Derivate dar (Rangwala und Lazar 2000). Zu den potentesten synthetischen PPAR γ -Liganden zählen Thiazolidindione (TZDs), darunter auch Pioglitazon, die als Insulin-Sensitizer in der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden (Spiegelman 1998). Es existieren zwei Isoformen von PPAR γ , PPAR γ 1 und PPAR γ 2 (Zhu, Qi et al. 1995). Von diesen beiden Isoformen wird PPAR γ 1, neben der Expression in einer Vielzahl weiterer Gewebe, vor allem in Präadipozyten exprimiert (Saladin, Fajas et al. 1999, Rangwala und Lazar 2000). Die Expression von PPAR γ 2 ist in Präadipozyten minimal und wird erst mit Beginn der Adipozytdifferenzierung induziert (Tontonoz, Hu et al. 1994, Tontonoz, Hu et al. 1994). Neben PPAR γ sind allerdings noch etliche weitere Transkriptionsfaktoren in die Kaskade der

Adipogenese involviert. Die Aktivierung der PPAR γ 2-Expression wird durch die aufeinanderfolgende Expression von weiter *upstream* gelegenen Transkriptionsfaktoren, den CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs), kontrolliert (Park und Park 2012). Darüber hinaus ist der Transkriptionsfaktor *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP1), über eine postulierte Produktion von endogenen PPAR γ -Liganden, an der PPAR γ 2-Aktivierung beteiligt (Kim, Wright et al. 1998). Kurz nach Stimulation von Präadipozyten mittels Adipogenese-fördernder Substanzen (Insulin, Dexamethason und Isobutylmethylxanthin (IBMX)), werden *C/ebp β* und *C/ebp δ* exprimiert (Darlington, Ross et al. 1998), wodurch wiederum die Genexpression von *C/ebpa* und *Ppar γ 2* aktiviert wird (Rangwala und Lazar 2000, Park und Park 2010). C/EBP α und PPAR γ 2 induzieren gemeinsam die Expression weiterer Gene, welche charakteristisch sind für ausgereifte Adipozyten, wie zum Beispiel das *aP2*-Gen, welches für das Fettzell-spezifische Protein Adipozyten Protein 2 (aP2) codiert (Cook, Hunt et al. 1985, Hunt, Ro et al. 1986, Farmer 2006, Park und Park 2012).

BHLHE40 ist ein wichtiger Bestandteil des Steuerungsprozesses von Stoffwechselreaktionen, so auch der Adipogenese. Hierbei fungiert BHLHE40 als negativer Regulator der Adipozytendifferenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass *Bhlhe40*, ebenso wie zum Beispiel *early growth response 1* (*Egr1*), eines der unmittelbar exprimierten, frühen Gene (*immediate early gene*) darstellt, deren Expression in Präadipozyten direkt nach Stimulation mittels Differenzierungsinduktoren beginnt (Inuzuka, Nanbu-Wakao et al. 1999). In Reaktion auf die Behandlung mit Differenzierungsinduktoren treten ruhende 3T3-L1 Zellen wieder in den Zellzyklus ein. Es kommt zur klonalen Expansion mit darauf folgendem Stillstand der Proliferation. Anschließend findet eine morphologische Veränderung der Zellen statt und schließlich werden Adipozyten-spezifische Markergene exprimiert. Zu dem genauen Signalweg, über den die *Bhlhe40*-Expression aktiviert wird, ist allerdings noch wenig bekannt. BHLHE40 kann direkt oder indirekt mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, die Bestandteil der Kaskade der Adipozytendifferenzierung im Fettgewebe sind, wie zum Beispiel PPAR γ 2 oder C/EBP β (Yun, Maecker et al. 2002, Ozaki, Noshiro et al. 2012, Park und Park 2012). *Bhlhe40* ist ein bekanntes Zielgen des Transkriptionsfaktors HIF-1 und in die Hypoxievermittelten Regulation der Adipogenese im Fettgewebe involviert. Sauerstoffmangel induziert die *Bhlhe40*-Expression in 3T3-L1 Zellen. Die Aktivierung der Genexpression ist hierbei HIF-1-abhängig. Es wird postuliert, dass diese verstärkte Expression von *Bhlhe40* die Aktivität des *Ppar γ 2*-Promotors vermindert und dadurch die Adipozytendifferenzierung gehemmt wird (Yun, Maecker et al. 2002). Park und Park (2012) vermuten eine Funktion von BHLHE40 als Co-Repressor, der eine Interaktion zwischen C/EBP β und HDAC1 am *Ppar γ 2*-Promotor vermittelt und dadurch zu einer Suppression der *Ppar γ 2*-Promotoraktivität führt.

Der exakte Mechanismus durch den BHLHE40 die Adipozytendifferenzierung inhibiert ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Ebenso ist bisher wenig zur Rolle von BHLHE40 bei der Adipogenese *in vivo* bekannt. Noshiro et al. (2018) fanden allerdings in ihrer Studie an *Bhlhe40*-Knockout Mäusen (*Bhlhe40*^{-/-}) Hinweise dafür, dass eine BHLHE40-Defizienz die Entwicklung einer Hochfett-Diät-induzierten Fettleibigkeit verhindern kann. *Bhlhe40*^{-/-}-Mäuse, denen eine Hochfett-Diät gefüttert wurde, zeigten eine geringere Körpergewichtszunahme als die Kontrollen vom Wildtyp. Die Tiere entwickelten unter der Hochfett-Diät zwar eine Hypertrophie der Adipozyten im weißen Fettgewebe, allerdings waren die Adipozyten bei den *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen kleiner als bei den Wildtyp-Mäusen. Auch der Fettgehalt im Abdomen war bei *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen in Relation zum Wildtyp signifikant reduziert, sowohl unter der Hochfett-, als auch unter der Kontrolldiät. Aufgrund von parallel durchgeführten *in vitro* Experimenten wurde eine direkte Bindung von BHLHE40 an RXR α postuliert, wodurch die PPAR γ :RXR α -induzierte Expression von lipolytischen Genen gehemmt wird (Noshiro, Kawamoto et al. 2018). In einer aktuellen Studie wurde zudem bei *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen eine gestörte zirkadiane Expression von PPAR γ -Zielgenen beobachtet, die in Zusammenhang mit der Lipogenese in weißem Fettgewebe stehen (Noshiro, Kawamoto et al. 2020). Des Weiteren konnte bei den *Bhlhe40*-Knockout Mäusen eine Störung in der zirkadianen Rhythmik der Serumkonzentration an freien Fettsäuren festgestellt werden.

1.3.4.2 Funktion von BHLHE40 im Leberstoffwechsel

Als ein zentrales Stoffwechselorgan, erfüllt die Leber zahlreiche Funktionen im Protein-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel.

Bei hoher Blutglukosekonzentration im gefütterten Zustand, spielt der Glukose-sensitive Transkriptionsfaktor *carbohydrate-response element-binding protein* (ChREBP) eine essentielle Rolle in der Steuerung des hepatischen Kohlenhydrat- und Fettmetabolismus (Yamashita, Takenoshita et al. 2001, Jeong, Kim et al. 2011). ChREBP-Zielgene sind beteiligt an Prozessen, wie der Glykolyse, der Glukoneogenese und der Lipogenese (Iizuka und Horikawa 2008).

Zu den bekannten ChREBP-Zielgenen zählt auch der Transkriptionsfaktor BHLHE40, dessen Expression durch die Bindung von ChREBP an das *carbohydrate-response element* (ChoRE) im *Bhlhe40*-Promotor hochreguliert wird (Iizuka und Horikawa 2008). Es wird vermutet, dass ChREBP und BHLHE40 gemeinsam eine negative Rückkopplungsschleife bilden, wodurch die *de novo* Lipogenese im Fall einer hohen Glukosekonzentration gehemmt wird. BHLHE40 soll dabei mit ChREBP um die Bindung an ChoREs in der Promotorregion von Genen konkurrieren, welche die Lipogenese fördern, wie *liver pyruvate kinase* (Lpk) und *fatty acid synthase* (Fasn) (Iizuka und Horikawa 2008).

Neben ChREBP ist an der Regulation der *de novo* Lipogenese in der Leber auch der Transkriptionsfaktor *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c) beteiligt, dessen Expression durch Insulin reguliert wird (Foufelle und Ferre 2002, Ferre und Foufelle 2010). Für die Stimulation der *Srebp-1c* mRNA-Expression durch Insulin sind allerdings weitere Transkriptionsfaktoren nötig: *liver x receptor α* (LXR α) und C/EBP β (Chen, Liang et al. 2004, Tian, Goldstein et al. 2016). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass zusätzlich zu LXR α und C/EBP β BHLHE40 für die Transaktivierung von *Srebp-1c* via Insulin benötigt wird (Tian, Wu et al. 2018). Mittels Chromatin-Immunpräzipitation wurde ein Bereich der *Srebp-1c* Enhancer-/Promotorregion (- 303 bp bis - 130 bp in Relation zum Transkriptionsstartpunkt (TSS)) identifiziert, in welchem BHLHE40 bindet.

In Zusammenhang mit der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) wird allerdings eine gegenteilige, negativ regulatorische Funktion von BHLHE40 auf die Expression von *Srebp-1c* postuliert (Shen, Cui et al. 2014). Die NAFLD ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte *de novo* Lipogenese in der Leber, einhergehend mit einer verstärkten Expression von *Srebp-1c*. Die abnorme Akkumulation von Triglyzeriden führt schließlich zu einer Entzündung der Leber und im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zur Leberfibrose und -zirrhose. Shen et al. (2014) zeigten eine deutliche Reduktion der hepatischen *Bhlhe40*-Expression in NAFLD-Mausmodellen. Die Wiederherstellung der hepatischen *Bhlhe40*-Genexpression in NAFLD-Mäusen führte zu einer verminderten Expression von *Srebp-1c*. Eine *Bhlhe40*-Überexpression im NAFLD-Mausmodell resultierte in einer Abschwächung des NAFLD-Phänotyps. Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation wurde ein E-box-Element in der *Srebp-1c* Promotorregion (ca. - 119 bp in Relation zum TSS) identifiziert, an welches BHLHE40 bindet und dadurch seine vermutete, negativ regulatorische Funktion vermittelt.

BHLHE40 ist damit nicht nur an der Regulation der Adipogenese im Fettgewebe beteiligt, sondern spielt über die Interaktion mit ChREBP und SREBP-1c auch eine wichtige Rolle bei der Steuerung der *de novo* Lipogenese in der Leber.

Untersuchungen an *Bhlhe40*-Knockout Mäusen bestätigen ebenfalls eine Beteiligung von BHLHE40 an der Regulation des Fettmetabolismus in der Leber. So konnte gezeigt werden, dass *Bhlhe40*^{-/-}-Mäuse unter Fütterung einer Hochfett-Diät weniger Fett in der Leber akkumulierten als die Kontrolltiere vom Wildtyp (Noshiro, Kawamoto et al. 2018). Im Rahmen einer weiteren Studie an *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen wurde zudem festgestellt, dass der Alterungsprozess in *Bhlhe40*-Knockout Mäusen verlangsamt ist und diese Tiere eine längere mittlere Überlebensrate aufweisen als ihre Wurfgeschwister vom Wildtyp (Fujita, Makishima et al. 2016). Als Indikatoren für den verlangsamteten Alterungsprozess wurden dabei ein verminderter Fettgehalt in der Leber, sowie eine geringere Belastung durch oxidativen Stress angesehen.

1.4 Zielsetzung

1.4.1 Voruntersuchungen

Die bisher unveröffentlichten Daten eines Pilotexperiments, welches der vorliegenden Arbeit vorausging, deuten einen Effekt der Depletion von *Bhlhe40* auf die Expression von PPAR α - und ChREBP-Zielgenen in primären Hepatozyten an (Daten nicht gezeigt).

Dieses Pilotexperiment wurde von Linda van den Berg, Post-Doktorandin an der Universität von Helsinki (AG "nutrient sensing" unter der Leitung von Prof. Ville Hietakangas), während eines Forschungsaufenthalts in der AG Schupp am Institut für Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die sich anschließende RNA-Sequenzierung erfolgte in Helsinki, die Verarbeitung der RNA-Sequenzierungsdaten wurde von Krista Kokki, PhD-Studentin und ebenfalls Mitglied der AG "nutrient sensing", übernommen.

Im Anschluss an einen *Bhlhe40*-Knockdown, wurden primäre Hepatozyten für 26 Stunden mit einer niedrigen Glukosekonzentration inkubiert, bevor sie für weitere 24 Stunden entweder weiterhin der niedrigen Glukosekonzentration, einer hohen Glukosekonzentration oder Fruktose ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die vorhandene RNA sequenziert. Basierend auf den Daten der RNA-Sequenzierung wurden die durch den *Bhlhe40*-Knockdown beeinflussten Gene gruppiert und spezifischen Stoffwechselwegen, wie zum Beispiel dem PPAR α - oder ChREBP-Stoffwechselweg, zugeordnet. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit (s. Kapitel 3.2.3 & Kapitel 3.2.4) wurde ein möglicher Einfluss von BHLHE40 auf die Expression von PPAR α - und ChREBP-Zielgenen untersucht. Ziel der Untersuchung war es aus den Ergebnissen potenzielle Funktionen von BHLHE40 im Lebermetabolismus abzuleiten.

1.4.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Adipositas und Adipositas-assoziierte Erkrankungen, wie zum Beispiel Insulinresistenz, Diabetes mellitus und Bluthochdruck, gewinnen in den Industriestaaten stetig an Bedeutung (Field, Coakley et al. 2001, Pi-Sunyer 2009). Aus diesem Grund wird ein umfassendes Verständnis des Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus immer wichtiger, um geeignete Präventions- und Therapiemaßnahmen zu identifizieren und weiterzuentwickeln.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor BHLHE40 in der Lage ist die Differenzierung von Adipozyten zu hemmen (Yun, Maecker et al. 2002, Park und Park 2012). Weiterhin ist BHLHE40 via Interaktion mit ChREBP und SREBP-1c an der Regulation des Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus in der Leber beteiligt (Iizuka und Horikawa 2008, Tian, Wu et al. 2018). Dieser Arbeit vorausgehende Experimente haben außerdem gezeigt, dass ein *Bhlhe40*-Knockdown in primären Hepatozyten die Expression von ChREBP- und PPAR α -Zielgenen beeinflusst (Daten nicht gezeigt), wobei PPAR α einen wichtigen Regulator der Fettsäureoxidation darstellt (Desvergne und Wahli 1999, Leone, Weinheimer et al. 1999). BHLHE40 scheint also, zumindest indirekt, über die Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren, in die Steuerung des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels in der Leber involviert zu sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Funktion von BHLHE40 in Adipozyten und primären Hepatozyten genauer zu analysieren, sowie neue genomische BHLHE40-Bindungsstellen in der Mausleber zu detektieren, um dadurch ein besseres Verständnis für die Rolle von BHLHE40 im Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel zu erlangen.

Dafür wurde zunächst untersucht ob eine adenovirale *Bhlhe40*-Überexpression, ebenso wie die früher gezeigte retrovirale Überexpression (Yun, Maecker et al. 2002), zu einer reduzierten Adipozytendifferenzierung führt. Nachdem dieses Ergebnis bestätigt werden konnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass ein *Bhlhe40*-Knockdown die Adipogenese ebenfalls beeinflusst.

Basierend auf vorherigen Untersuchungen (s. Kapitel 1.4.1) sollte weiterhin untersucht werden, welchen Effekt BHLHE40 auf bestimmte Stoffwechselwege in der Leber hat. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich nicht nur ein *Bhlhe40*-Knockdown, sondern auch eine *Bhlhe40*-Überexpression auf die Expression von ChREBP- und PPAR α -Zielgenen in primären Hepatozyten auswirkt.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit sollten neue genomische BHLHE40-Bindungsstellen in der murinen Leber detektiert werden. Um etwaige Protein-DNA-Bindungsstellen zu ermitteln, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender qPCR (ChIP-qPCR) durchgeführt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich mögliche genomische Bindungsstellen von BHLHE40 in der Nähe BHLHE40-regulierter Gene befinden. Aus diesem Grund wurde die Anreicherung von genomischen Fragmente in der Nähe der Gene mittels ChIP-qPCR untersucht, welche in den Voruntersuchungen deutlich durch eine BHLHE40-Depletion beeinflusst wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller & Firmensitz
96 Fast PCR-Platte Vollrand	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
BioCoat™ Collagen I Cellware Kollagen-Beschichtete 12-Well Platten	Corning Inc., Corning, NY, USA
Falcon® 12-Well Zellkulturplatten	Corning Inc., Corning, NY, USA
Falcon® Röhrchen 15 ml	Corning Inc., Corning, NY, USA
Falcon® Röhrchen 50 ml	Corning Inc., Corning, NY, USA
Falcon® Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Feather® Disposable Scalpel	GF Health Products Inc., Atlanta, GA, USA
Filtropur S 0.2 0,2 µm Sterilfilter	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Handschuhe Vasco® Nitril white S	B Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Immun-Blot® PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Luer-Lok™ Syringe 20 ml	Becton Dickinson S.A., Madrid, E
Microplate 96 Well, PS, F - Bottom, Clear	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, A
Microseal® 'B' seal qPCR-Abdeckfolien	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Nylon-Siebgewebe 250 µm Maschenweite	Klein & Wieler oHG, Königswinter, D
Omnican® 50 Insulinspritzen	B Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Parafilm® PM-996	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Phase Lock Gel Tubes	5 Prime GmbH, Hilden, D
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Röntgenfilm Super RX-N	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, D
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Sterican® Einmalkanülen 23 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Vasofix® Safety Venenverweilkatheter 22 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
VWR 100-1250 µl Pipettenspitzen	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Whatman™ 3 MM Chromatographie-Papier	GE Healthcare Life Sciences, Amersham UK
Zellkulturplatten TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Zellschaber 16 cm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D

2.1.2 Zelllinien & Kulturbedingungen

Jegliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Experimente mit murinen weißen (Vorläufer-) Fettzellen wurden Zellen der Linie 3T3-L1 Präadipozyten (murine Fibroblasten) ATCC®-CL-173™ der Firma LGC Standards GmbH (Wesel, D) verwendet.

Die Kultivierung der 3T3-L1-Präadipozyten erfolgte, soweit nicht anders angegeben, in 10 cm Zellkulturschalen in Dulbecco's Modified Eagle Medium, dem 10 % Fetales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden (DMEM +10 % FBS + 1 % P/S). Die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze sind in Tabelle 2 aufgeführt. Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Umgebung.

Für die Kultivierung primärer muriner Hepatozyten galten die gleichen Bedingungen. Die Isolierung primärer Hepatozyten aus der Mausleber wird in Kapitel 2.2.8 beschrieben.

2.1.3 Zellkulturmedien & Zusätze

Tabelle 2: Liste der verwendeten Zellkulturmedien & Zusätze

Produkt	Hersteller & Firmensitz
0,5 % Trypsin – EDTA (10 x)	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Dulbecco´s Modified Eagle Medium [+] 4,5 g/l D-Glukose, L-Glutamin [-] Pyruvat	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Human Insulin Solution 10 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
OPTI-MEM® I – Reduced Serum Medium	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Penicillin / Streptomycin 10 000 U/ml / 10 000 µg/ml	Biochrom GmbH, Berlin, D
Pioglitazon hydrochlorid	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Trypsin / EDTA Solution 0,05 % / 0,02 % (w/v) In PBS w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	Biochrom GmbH, Berlin, D
WY-14643	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

2.1.4 Versuchstiere & Haltungsbedingungen

Für die Isolierung von primären Hepatozyten wurden männliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Zur Verfügung gestellt wurden die Tiere von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Die Isolierung der Primärzellen aus der Mausleber wurde unter dem Tierversuchsantrag O 0400/17 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigt. Die Umsetzung des Tierversuchs erfolgte gemäß den gesetzlichen europäischen und nationalen Bestimmungen.

Die Mäuse waren unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen in der Tierhaltung des „Center for Cardiovascular Research“ (CCR) der Charité-Universitätsmedizin Berlin untergebracht. Dort wurden jeweils 2-6 Tiere in einem individuell belüfteten Käfig (IVC) Typ II gehalten. Im IVC-System bildet jeder Käfig eine geschlossene Einheit. Die Versorgung mit Sauerstoff erfolgt individuell über HEPA-gefilterte, konditionierte Raumluft. Vorteile dieses Systems sind die verminderte Staub- und Allergenbelastung des Personals, sowie eine exzellente hygienische Isolation. Die Käfige waren mit speziellem Einstreu für Labormäuse (FS14/Fichte hergestellt von der Firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG Lage, D) eingestreut und enthielten ein rotes Häuschen als Versteckmöglichkeit, sowie Zellstoff als Nistmaterial. Futter (V 1534-0 Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse hergestellt von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, D) und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Einmal pro Woche wurden die Mäuse in einen neuen Käfig mit frischer Einstreu umgesetzt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 °C ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchte von 45-50 % und einem künstlichen Lichtregime mit 12-Stunden-Hell/12-Stunden-Dunkel-Rhythmus.

2.1.5 (Bio-) Chemikalien & Reagenzien

Tabelle 3: Liste der verwendeten (Bio-) Chemikalien & Reagenzien

Substanz	Hersteller & Firmensitz
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
2-Mercaptoethanol min.98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Acrylamid-Lösung A3626 (30 %) 37,5:1	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Agfa Röntgen-Entwickler G 153	Agfa-Gevaert Group, Mortsel, BEL
Agfa Röntgen-Fixierer G 354	Agfa-Gevaert Group, Mortsel, BEL
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Bioline dNTP Mix 10 mM	Meridian Bioscience Inc., Cincinnati (OH), USA
Bioline Random Hexamer Primer Mix (50 ng/µl)	Meridian Bioscience Inc., Cincinnati (OH), USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Chloroform molecular biology grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Collagenase from Clostridium histolyticum	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Collagenase Type I 52.552 U/ml	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
cOmplete Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
cOmplete, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Earle´s Balanced Salt Solution (EBSS)	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Emsure® Ethanol	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Emsure® Methanol	MERCK KGaA, Darmstadt, D
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 70 % vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraacetat(EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Formaldehyde solution 36,5-38 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Glycin ≥ 99 % Blotting-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Hank´s salt solution (- Phenolrot)	Biochrom GmbH, Berlin, D
Invitrogen Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Invitrogen UltraPure™ Distilled Water (DNase/RNase frei)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Isopropanol molecular biology grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ketavet® 100 mg/ml Injektionslösung	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, D
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Magermilchpulver Blotting grade, fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega Corporation, Madison (WI), USA
M-MLV RT 5x Buffer	Promega Corporation, Madison (WI), USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Substanz	Hersteller & Firmensitz
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Nonidet™ P-40 Substitute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer 5x	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Oil Red O Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Percoll™	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, S
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Phosphate Buffered Saline (PBS pH 7,2)	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Phosphate buffered saline tablet	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Protein A Sepharose™ CL-4B	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, S
Proteinase K, recombinant	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Rompun 2 % Injektionslösung	Bayer AG Pharmaceuticals, Berlin, D
Saccharosepulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
SDS-Solution 20 % for molecular biology	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Sodium chloride cryst research grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
SuperSignal™ West Dura Trial Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Takyon No ROX SYBR 2x MasterMix blue dTTP	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
TRIS Pufferan® ≥ 99,3 % Buffer Grade (Tris-base)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
TRIS-hydrochlorid Pufferan® ≥ 99 % (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Triton X® 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D

2.1.6 Puffer & Lösungen

Tabelle 4: Proteinlysepuffer (RIPA)

Reagenz	Volumen für 50 ml	Endkonzentration
0,5 M EDTA (pH 8,0)	0,2 ml	2 mM
0,5 M NaF	5 ml	50 mM
1 M Tris-HCl (pH 7,2)	2,5 ml	50 mM
10 % SDS	0,5 ml	0,1 %
5 M NaCl	1,5 ml	150 mM
Natrium-Desoxycholat	250 mg	0,5 %
10 % Nonidet™ P-40	5 ml	1 %
ddH ₂ O	Auffüllen auf 50 ml	

+ 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-free

Tabelle 5: Trenngelpuffer für die SDS-Gelelektrophorese

Reagenz	Menge für 200 ml	Endkonzentration
Tris-Base	36,3 g	1,5 M
ddH ₂ O	Tris-base in ddH ₂ O lösen & auf 200 ml auffüllen	

pH-Einstellung auf pH 8,8

Tabelle 6: Sammelgelpuffer für die SDS-Gelelektrophorese

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
Tris-Base	3,0 g	0,5 M
ddH ₂ O	Lösen von Tris-base in ddH ₂ O & auf 50 ml auffüllen	

pH-Einstellung auf pH 6,8

Tabelle 7: 10 x Elektrophoresepuffer

Reagenz	Menge für 1000 ml	Endkonzentration
Tris-Base	30,3 g	0,25 M
Glycin	144 g	1,92 M
10 % SDS	100 ml	1 %
ddH ₂ O	Auffüllen auf 1000 ml	

Der pH-Wert sollte zwischen 8,3 und 8,8 liegen. Der 10 x Elektrophoresepuffer wurde 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

Tabelle 8: Transferpuffer für Western Blot (Towbin Buffer)

Reagenz	Menge für 2000 ml	Endkonzentration
Tris-Base	6,06 g	25 mM
Glycin	28,8 g	192 mM
10 % SDS	10 ml	0,05 %
Methanol	400 ml	20 %
ddH ₂ O	Auffüllen auf 2000 ml	

Der pH-Wert sollte zwischen 8,1 und 8,5 liegen.

Tabelle 9: 10 x TBS (*Tris-buffered saline*)

Reagenz	Menge für 1000 ml
Tris-Base	24,2 g
NaCl	80 g
ddH ₂ O	Lösen von Tris-Base und NaCl in ddH ₂ O & Auffüllen auf 1000 ml

pH-Einstellung auf pH 7,6

Tabelle 10: TBST - Waschlösung für Western Blot Membran

Reagenz	Menge für 1000 ml
10 x TBS	100 ml
Tween® 20	1 ml
ddH ₂ O	900 ml

Tabelle 11: Blockpuffer für Western Blot Membran

Reagenz
1 x TBS und TBST im Verhältnis 1:1
4 % Milchpulver (w/v)

Tabelle 12: ChIP – Hypotonischer Lysepuffer (HLB)

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
1 M Hepes	1 ml	20 mM
Saccharosepulver	4,3 g	0,25 M
1 M MgCl ₂	150 µl	3 mM
10 % Nonidet™ P-40	1 ml	0,2 %
14,2 M β-Mercaptoethanol	10,5 µl	3 mM
ddH ₂ O	48 ml	

+ 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-free

Tabelle 13: ChIP – SDS-Lysepuffer

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
1 M Hepes	2,5 ml	50 mM
10 % SDS	5 ml	1 %
0,5 M EDTA	1 ml	10 mM
ddH ₂ O	41,5 ml	

+ 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-free

Tabelle 14: ChIP – Verdünnungspuffer

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
1 M Hepes/NaOH pH 7,5	2,5 ml	50 mM
5 M NaCl	1,55 ml	155 mM
10 % Triton X-100	5,5 ml	1,1 %
10 % Na-Desoxycholat	0,55 ml	0,11 %
0,5 M EDTA	100 µl	1 mM
ddH ₂ O	39,8 ml	

+ 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-free

Tabelle 15: ChIP – Blockpuffer

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
10 x PBS	5 ml	1 x
BSA	250 mg	0,5 % (w/v)
ddH ₂ O	45 ml	

Tabelle 16: ChIP - Waschpuffer

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 8,0	0,5 ml	10 mM
5 M LiCl	2,5 ml	250 mM
10 % Nonidet™ P-40	2,5 ml	0,5 %
10 % Na-Desoxycholat	2,5 ml	0,5 %
0,5 M EDTA	100 µl	1 mM
ddH ₂ O	41,9 ml	

Tabelle 17: ChIP – TE-Puffer

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 7,5	0,5 ml	10 mM
0,5 M EDTA	100 µl	1 mM
ddH ₂ O	49,4 ml	

Tabelle 18: ChIP – Elutionspuffer

Reagenz	Menge für 50 ml	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 8,0	2,5 ml	50 mM
0,5 M EDTA	1 ml	10 mM
10 % SDS	5 ml	1 %
ddH ₂ O	41,5 ml	

Tabelle 19: Perfusionspuffer für die Isolation primärer Hepatozyten

Reagenz	Menge
1 x EBSS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	500 ml
EGTA 50 mM	5 ml

Tabelle 20: Digestionspuffer für die Isolation primärer Hepatozyten

Reagenz	Menge
Hank's Balanced Salt Solution (-Phenolrot)	50 ml
Collagenase I	100 µl (hinzuzugeben direkt vor Verwendung)

Tabelle 21: Lösung für Dichtegradientenzentrifugation primärer Hepatozyten

Reagenz	Menge
Percoll™	22,5 ml
10 x PBS	2,5 ml

2.1.7 Reaktionskits

Tabelle 22: Liste der verwendeten Reaktionskits

Produkt	Verwendung	Hersteller & Firmensitz
Amaxa Cell line V Kit	Elektroporation	Lonza Group AG, Basel, CH
peqGold Total RNA Kit (S-Line)	RNA-Isolation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Scientific, Rockford (IL), USA

2.1.8 Laborgeräte

Tabelle 23: Liste der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Hersteller & Firmensitz
Agfa Curix 60 Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert Group, Mortsel, BEL
Amaxa® Nucleofector® II Device	Lonza Group Ltd, Basel, CH
Bandelin Sonoplus Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D
Bandelin Sonorex RK 52 H Ultraschallreiniger	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D
Biorad PowerPac 200 Electrophoresis power supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Color Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Coulter Roller Mixer II	Coulter Electronics Ltd., Luton, UK
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Zentrifuge MiniSpin® plus	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
GFL® Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D
Gilson® Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson Inc., Middleton (WI), USA
Heraeus® Mikrobiologischer Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Heraeus® Work Bench	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Heraeus® Zentrifuge Biofuge 13 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Hettich® Universal Zentrifuge 30F	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
Hettich® Universal Zentrifuge 32R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
Hypercassette™ Röntgenkassette	GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK
IKA® Magnetührer RET basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
INFORS HT Inkubationsschüttler	Infors AG, Bottmingen, CH
Labortimer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Laborwage	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, D
Leica® DM IL LED Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Memmert Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Mettler Toledo FiveEasy plus pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D

Gerät	Hersteller & Firmensitz
Mini-PROTEAN® Comb, 15 Well	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
MJ Research PTC-200 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Nano-Drop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
RF 3000™ battery aided pipetting aid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Satorius Analysewaage Practum	Satorius AG, Göttingen, D
STA – Vielfach – Schlauchpumpe	DESAGA GmbH, Wiesloch, D
System Autoklav	System GmbH, Linden, D
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
VARIOKLAV® Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, D
VISSMANN Kühlzelle	Viessmann Werke GmbH & Co. KG, Allendorf, D
Vortex-Genie-2	Scientific Industries Inc., New York (NY), USA
Wheaton® 7 ml Dounce Tissue Grinder	DWK Life Sciences, Millville (NJ), USA
xMark™ Microplate Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH München, D

2.1.9 Adenoviren

Die für die Experimente in der vorliegenden Arbeit verwendeten Adenoviren sind in nachfolgender Tabelle 24 aufgelistet.

Tabelle 24: Verwendete Adenoviren

Virus	Titer [pfu/ml]	Hersteller & Firmensitz
Adeno-BHLHE40	$3,4 \times 10^{10}$	Vector Biosystems, Malvern (PA), USA
Adeno-GFP	$1,2 \times 10^{11}$	Vector Biosystems, Malvern (PA), USA

2.1.10 Primer

Tabelle 25: Liste der verwendeten qRT-PCR-Primer

Gen	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
cGFP	ATACCCTGGTGAATCGCATC	CATTGTGGGCGTTGTAGTTG
m36b4	TCATCCAGCAGGTGTTTGACA	GGCACCAGGCAACAGTT
mAdipoq	GATGGCACTCCTGGAGAGAA	CAGCTCCTGTCATTCCAACA
mAngptl4	AAGATGACCCAGCTCATTGG	GGCTGGATCTGGAAAAGTCC
maP2	TGGAAGACAGCTCCTCCTCG	AATCCCCATTTACGCTGATGATC
mBhlhe40 ex 3-4	CAGCTGAAGGATCTCCTACCC	TCAATGCTTTCACGTGCTTC
mBhlhe40 ex 4-5	TCTAATTGATCAGCAGCAGCA	CGAGATTTCTTCCCGACAAA
mBhlhe41	ACTGCCCGAACATCTGAAAT	GGCTGTTAGCGCTTTCAAGT
mC/EBPα	ACATCAGCGCCTACATCGAC	CTTGGCCTTCTCCTGCTGT
mDgat2	GCTGGCATTGACTGGAACA	GCCACACGGCCAGTTT
mPref1	GCTGGGACGGAAATTCTG	TCCAGGTCCACGCAAGTTC
mFabp1	GCGAACTGGAGACCATGACT	CACGGACTTTATGCCTTTGAA

Gen	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
mGata2	GCTTCACCCCTAAGCAGAGA	CAGAGAGGGGTGGCTGTG
mHmgcs2	AACTTCGCTCACACCTGCT	AAGGATGCCACATCTTTG
mPdk4	CTGCCTGACCGCTTAGTGA	CTTCTGGGCTCTTCTCATGG
mPparg1	AGAAGCGGTGAACCACTGATATTC	AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC
mPparg2	TGGGTGAAACTCTGGGAGATTC	GAGAGGTCCACAGAGCTGATTCC
mRBP4	GCAGGAGGAGCTGTGCCTAGA	GGAGGGCCTGCTTTGACAGT
mRetSat	CCCATCAAGCAAGGATCCAA	ATGGGTACCAGCGCAGTCA
mRgs16	TGGGCCAGTAAGCATAACAA	TTCAGCAGCAAATCGAAAGA
mTxnip	GGTCTCAGCAGTGCAAACAG	GGCCTCATGATCACCATCTC

Tabelle 26: Liste der Primer für genomische Regionen in der ChIP-qPCR

Gen	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
mCcmd2 -1,1 kb	CAGATAGCATGGCGTGGGTT	CTCCGCTAGCCTTAAGCGTC
mDgat2 -0,1 kb	GCAGCATGGCCTGAACTGTA	GCTGCTGGACCGTACTAACG
mInsulin -0,3 kb	CTTCAGCCCAGTTGACCAAT	AGGGAGGAGGAAAGCAGAAC
mKlf10 +1,3 kb	GCATGTGAACAAAGCGTGAT	TGCTCAGGAAGTAGG GGAAA
mPklr +0,23 kb	CTCTGCAGACAGGCCAAAG	TGCCAATGGAAGCCTTGTA
mTxnip -0,1 kb	CCGAACAACAACCATTTTCC	CGTGCACAGTTCTCCCATT

2.1.11 siRNA

Tabelle 27: Liste der verwendeten siRNA

Name	Sequenz
Kontroll siRNA	5'-UAGCGACUAAACACAUCAUUU-3'
Bhlhe40_419 siRNA	5'-GAGCGAAGACAGCAAGGAUUU-3'
Bhlhe40_677 siRNA	5'-GGGAAGAAAUCUCGAGGCAUUU-3'
Bhlhe40_1002 siRNA	5'-GGACACAGACAGUGGCUAUUUU-3'

Die Kontroll-siRNA wurde so designed, dass sie keine Transkripte bindet und depletiert.

2.1.12 Antikörper

Tabelle 28: Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
ADIPONEKTIN	rabbit	1:4000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (TX), USA, sc-26497
aP2	rabbit	1:5000	Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt a.M., D, #2120
C/EBP α	rabbit	1:250 bzw. 1:2500, da Antikörper 10-fach konzentriert	Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA, sc-61x
DEC1	rabbit	1:333	Novus Biologicals, Centennial (CO), USA, NB100-180
GAPDH	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt a.M., D, #2118
PPAR γ -E8	mouse	1:167	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (TX), USA, sc-7273
RAN	mouse	1:5000	Becton Dickinson S.A., Madrid, E, BD 610340
RBP4	rabbit	1:1000	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D, #A0040
RETSAT	rabbit	1:5000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D, HPA046513
β -AKTIN	mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (TX), USA, Sc-47778
Anti-rabbit, HRP-Konjugat	goat	1:1000 – 1:5000	Pierce, Thermo Scientific, Rockford (IL), USA, #31460
Anti-mouse, HRP-Konjugat	goat	1:1000 – 1:5000	Pierce, Thermo Scientific, Rockford (IL), USA, #31430

Tabelle 29: Liste der verwendeten Antikörper für ChIP

Antikörper	Spezies	Menge	Hersteller
ChREBP	rabbit	2,5-5,0 μ l	Novus Biologicals, Centennial (CO), USA, NB400-135, Lot Q4
DEC1	rabbit	5-15 μ l	Novus Biologicals, Centennial (CO), USA, NB100-180, Lot C1

2.1.13 Software

Tabelle 30: Liste der verwendeten Software

Software	Verwendung	Hersteller & Firmensitz
CFX™ Manager Software	CFX Connect™ Real-Time System, Durchführung & Auswertung qRT-PCR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
GraphPad PRISM® 4	Graphische Darstellung der Daten & statistische Auswertung	GraphPad Software Inc., La Jolla (CA), USA
Image Lab™	ChemiDoc™ XRS+, Proteindetektion Western Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Microplate Manager™ 6	xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Ermitteln der Proteinkonzentration	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
MS Office 2016 (Excel, Word, Power Point)	Datenauswertung & -darstellung	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
ND-1000	Nanodrop® ND-1000, Ermitteln der RNA-Konzentration	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Passage von 3T3-L1 Zellen

Nach Erreichen einer Konfluenz von 75-80 %, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen zuerst mit 5 ml 1x Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, bevor 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben wurde. Nach circa 10-minütiger Inkubation mit Trypsin/EDTA im Brutschrank, waren die Zellen abgelöst und das Trypsin konnte mit mindestens 3 ml DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S inaktiviert werden. Die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze sind in Tabelle 2 aufgeführt. Abhängig davon, wie viele Platten weitergeführt werden sollten, wurde die Zellsuspension mit frischem DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S weiter verdünnt und auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt.

2.2.2 Differenzierung von 3T3-L1-Zellen

Für die Differenzierung in 10 cm Zellkulturschalen mit jeweils 10 ml Zellmedium wurden die Präadipozyten, zwei Tage nach Konfluenz, mit 1 µM Dexamethason, 2 µM Insulinlösung und 500 µM IBMX behandelt. Zur weiteren Stimulation der Adipozyten-Differenzierung wurden zusätzlich 5 µM des PPARγ-Agonisten Pioglitazon hinzugegeben. Die verwendeten Stimulanzen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Nach drei Tagen fand ein Medienwechsel statt und die Zellen wurden zwei weitere Tage in DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S mit 2 µM Insulin inkubiert. Nach 7-8 Tagen waren die Zellen zu Lipidtröpfchen-enthaltenden Adipozyten ausgereift und wurden für RNA-Isolation oder Proteinextraktion geerntet.

Die Differenzierung in 12-Well Platten mit jeweils 1 ml Zellmedium pro Well erfolgte nach dem gleichen Schema mit identischen Konzentrationen der Differenzierungsinduktoren.

2.2.3 Adenoviraler Gentransfer

Adenoviren sind unbehüllte Viren mit linearer, doppelsträngiger DNA und stellen effektive Vektoren zum Einschleusen von Zielgenen in Zellen dar. Die Endozytose der Viruspartikel erfolgt rezeptorvermittelt via Interaktion mit dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor. Anschließend wird die virale DNA in den Zellkern eingeschleust, wo wenig später die Expression erster Virusgene erfolgt. Durch die Ausschaltung der E₁-Funktionen, sind die verwendeten Adenoviren zwar fähig Wirtszellen zu infizieren, können sich aber in diesen nicht

vermehren. Ihre Immunogenität und Toxizität stellen limitierende Faktoren für den Einsatz von Adenoviren als Vektoren dar (Kochanek 2001).

2.2.4 Infektion von 3T3-L1-Zellen mit Adenovirus

Für die Infektion mit Adenoviren wurden 3T3-L1-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und mit 1 ml DMEM+ 10 % FBS + 1 % P/S pro Well bis zu einer Konfluenz von circa 80 % kultiviert. Bevor die Zellen mit Adenovirus infiziert wurden, wurde das alte Medium durch 1 ml frisches Zellmedium ersetzt. Anschließend wurde die entsprechende Menge Adeno-BHLHE40 ($1,02 \times 10^9$ pfu/ml) direkt in das jeweilige Well hinzugegeben. Die mit Adeno-GFP infizierten Zellen dienten als Kontrollgruppe, wobei die Dosierung von Adeno-GFP stets an die Dosis Adeno-BHLHE40 angepasst wurde. Nach einer Inkubation von 4-5 Stunden, erfolgte ein erneuter Medienwechsel zu virusfreiem Zellmedium. Die verwendeten Adenoviren sind in Tabelle 24 dargestellt.

2.2.5 Elektroporation von 3T3-L1 Zellen

Die Elektroporation von 3T3-L1 Präadipozyten wurde, abgesehen von einigen vorgenommenen Anpassungen, gemäß dem Protokoll für die Elektroporation von differenzierten 3T3-L1 Adipozyten von Dr. Michael Schupp – modifiziert von Ana G. Cristancho aus dem Labor von Dr. Mitch Lazar – durchgeführt.

In drei bis sechs 10 cm Zellkulturschalen wurden 3T3-L1 Präadipozyten gezüchtet. Sobald diese eine Dichte von 70-80 % erreicht hatten, wurde das Medium abgenommen und die Zellen 1 x mit je 5 ml PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurden sie mit je 1 ml Trypsin/EDTA für 5-10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Während dessen wurde eine 12-Well Platte mit je 1 ml DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S pro Well vorbereitet. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA mit mindestens 2 ml DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S inaktiviert und alle Zellen in einer Zellkulturschale kombiniert. Die Zellen wurden nun in PBS suspendiert und in 15 ml Falcons aliquotiert. Nach einem 3-minütigen Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur mit 770 rpm (Laborzentrifuge Universal 32R), wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. Der restliche Überstand wurde erst direkt vor einmaliger Resuspension des Zellpellet in 85-90 µl Elektroporationspuffer von Lonza abgenommen. Zellen und Elektroporationspuffer wurden nun in 3-4 nmol siRNA circa 10 x resuspendiert. Die verwendete siRNA ist in Tabelle 27 aufgelistet.

Anschließend wurde das gesamte Volumen in eine Elektroporationsküvette überführt und die Zellen mit dem Amaxa Nucleofector ® Device von Lonza mit dem G-16 Programm elektroporiert. Danach wurden 500 µl DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S zu den elektroporierten Zellen gegeben und das gesamte Volumen mit einer Plastik-Einmalpipette tropfenweise auf insgesamt 3 Wells einer 12-Well Platte verteilt. Die Elektroporation von differenzierten 3T3-L1 Zellen erfolgte auf die gleiche Art und Weise mit dem Unterschied, dass für das Ablösen der Zellen 4x Trypsin/EDTA versetzt mit 0,5 mg/ml Kollagenase von *Clostridium histolyticum* verwendet wurde.

2.2.6 Differenzierung von vorbehandelten 3T3-L1 Zellen

Nach Bhlhe40-Knockdown durch Elektroporation beziehungsweise Bhlhe40-Überexpression durch Infektion der 3T3-L1-Zellen mit Adenoviren, wurde die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten in 12-Well-Platen zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz begonnen. Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch Zugabe von einem Milliliter eines Mastermixes, welcher pro Well 1 ml DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S, 0,033 µM Dexamethason, 0,066 µM Insulin und 16,66 µM IBMX enthält. Dieser wurde für 3 Tage auf den Zellen belassen. Anschließend folgte eine 2-tägige Inkubation mit 1 ml DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S und 0,066 µM Insulin pro Well, ebenfalls hergestellt als Mastermix. An Tag 5 wurde das Medium zu DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S gewechselt. Die Zellen wurden an Tag 7 oder 8 zur RNA-Isolation mit 400 µl RNA-Lysepuffer geerntet oder mit Oil Red O angefärbt.

2.2.7 Anfärben von Adipozyten mittels Oil Red O

Oil Red O ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, der Triglyzeride in Zellen rot anfärbt. Er wurde verwendet, um die Fettvakuolen in ausdifferenzierten Adipozyten darzustellen und so die Anzahl an differenzierten Zellen visuell hervorzuheben.

Dazu wurde zuerst das Medium abgenommen und jedes der 12 Wells mit jeweils 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 300 µl verdünnter Formaldehydlösung (s. Tabelle 30) pro Well für 10-15 min inkubiert, um sie zu fixieren.

Tabelle 31: Formaldehydfixierlösung

Substanz	Menge für 10 ml
Formaldehyd 37 %	2,75 ml
ddH ₂ O	7,25 ml

Nach Fixation wurden die Zellen 5-6 Mal mit jeweils 500 µl ddH₂O pro Well gewaschen, nach dem letzten Waschschrift wurde das verbleibende Wasser vollständig aspiriert.

Zum Anfärben der Zellen wurden nun pro Well 500 µl, der zuvor hergestellten, Oil Red O-Färbelösung hinzugegeben (s. Tabelle 33). Es folgte eine 1-stündige Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur.

Tabelle 32: Oil Red O-Vorratslösung

Substanz	Menge für 100 ml
Oil Red O Pulver	0,5 g
Isopropanol	100 ml

Über Nacht gelöst, Lagerung lichtgeschützt

Tabelle 33: Oil Red O-Färbelösung

Substanz	Menge für 10 ml
Oil Red O-Vorratslösung (s. Tabelle 32)	6 ml
ddH ₂ O	4 ml

Vor Gebrauch mittels Whatman Paper filtriert.

Nach Aspiration der Färbelösung, wurden die Zellen circa 3-4 Mal mit 500 µl ddH₂O pro Well gewaschen, um Farbreste zu entfernen.

2.2.8 Isolierung primärer muriner Hepatozyten

Die Isolierung primärer muriner Hepatozyten aus männlichen C57BL/6J Mäusen wurde durch die zuständige Behörde im TierVersuchsvorhaben O 0400/17 genehmigt.

Die Tiere wurden mit 4 µl/g (i.p.) einer Mischung aus 8 %-igem Ketamin und 1,2 %-igem Xylazin im Verhältnis 1:1 anästhesiert. Nach Feststellung der nötigen Narkosetiefe, wurden die Mäuse in Rückenlage fixiert und die Bauchhöhle in der Medianen ab dem Sternum nach kaudal eröffnet. Das Magen-Darm-Konvolut wurde vorsichtig nach lateral aus der Bauchhöhle heraus verlagert, um Sicht auf die Vena cava und die Leber zu erhalten. Anschließend wurde mittels 22 G Venenkatheter ein Zugang in die Vena cava gelegt. Über diesen Zugang wurde die Leber nun mit körperwarmem Perfusionspuffer (s. Tabelle 19) mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/min durchgespült, bis sie ihre Farbe von physiologisch dunkelrot-braun zu hellbraun-beige änderte. Direkt nach Start der Perfusion und mit Beginn der Entfärbung, wurde die Vena portae durchtrennt, um einen Abfluss von Blut und Perfusionspuffer zu gewährleisten. Nach maximal 20 Minuten wurde der Perfusionspuffer durch vorgewärmten Digestionspuffer (s. Tabelle 20) ersetzt. Zeichen einer erfolgreichen Digestion, ist das Anschwellen der Leber.

Nachdem die Leber mit 50 ml des Digestionspuffers perfundiert wurde, wurde sie aus der Bauchhöhle entnommen und nach Entfernung der Gallenblase in eine Petrischale gegeben. In dieser Petrischale wurde die Leber nach Zugabe von 50 ml Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S) mit Hilfe von zwei Zellschabern und leichtem Druck vorsichtig zerkleinert, um die Leberzellen freizusetzen. Zur Abtrennung von Geweberesten und groben Rückständen, wurde die Zellsuspension zuerst durch ein Sieb mit 250 µm Porenweite geleitet und danach mit 770 rpm für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Universalzentrifuge 32R. Das entstandene Zellpellet wurde nun in 25 ml Zellkulturmedium resuspendiert, es wurden weitere 25 ml Percollpuffer (s. Tabelle 21) hinzugegeben und eine 10-minütige Dichtegradientenzentrifugation zur Abtrennung toter Zellen durchgeführt. Anschließend wurde das Zellpellet in 25 ml Zellkulturmedium gewaschen, weitere 3 Minuten zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 10-15 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Es folgten eine Zählung der Zellen mittels Neubauer Zählkammer und das Aussäen der primären Hepatozyten in Kollagenbeschichtete 12-Well Platten zu 250 000 Zellen pro Well in jeweils 1 ml Zellkulturmedium. Die Platten wurden direkt nach Aussäen der Zellen und ein zweites Mal 10 Minuten später geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Hepatozyten über das gesamte Well zu erreichen. Die Zellen waren circa 4 Stunden nach der Isolation angewachsen. Ab diesem Zeitpunkt wurden Experimente mit den primären Hepatozyten durchgeführt.

2.2.9 Infektion von primären murinen Hepatozyten mit Adenovirus

Die primären murinen Hepatozyten wurden, wie zuvor beschrieben, isoliert und in kollagenbeschichtete 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Sobald sich die Zellen nach circa 4 Stunden an der Platte angeheftet hatten, wurde das Medium inklusive der toten, nicht angewachsenen Zellen abgenommen und durch 1 ml frisches DMEM + 10 % FBS + 1% P/S ersetzt. Anschließend wurde die Menge Adeno-BHLHE40 ($4,8 \times 10^5$ pfu/ml) direkt in die jeweiligen Wells pipettiert. Die Inkubation mit dem virushaltigen Medium erfolgte über Nacht. Nach circa 16 Stunden wurde das Medium zu virusfreiem DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S gewechselt. Adeno-GFP diente hier ebenfalls als Kontrolle und die Dosis wurde an Adeno-BHLHE40 angepasst. Die verwendeten Adenoviren sind in Tabelle 24 aufgelistet.

2.2.10 Behandlung von primären Hepatozyten mit WY-14643

24 Stunden nach Bhlhe40-Überexpression bzw. 48 Stunden nach Bhlhe40-Knockdown wurden die primären Hepatozyten mit dem PPAR α -Agonisten WY-14643 (s. Tabelle 2) behandelt. Hierfür wurden 50 µM WY-14643 benutzt und die Zellen damit 24 Stunden inkubiert, bevor sie geerntet wurden. Die Behandlung der Kontrollzellen erfolgte mit DMSO.

2.2.11 Transfektion primärer muriner Hepatozyten mit siRNA

Die Isolation primärer muriner Hepatozyten erfolgte aus männlichen C57BL/6J Mäusen. Vier Stunden nach Aussäen der Zellen auf 12-Well Platten, wurde das Zellkulturmedium aspiriert und pro Well wurden je 500 µl DMEM ohne FBS und ohne P/S hinzugefügt. Anschließend wurden die entsprechenden Mastermixe für die jeweilige Bedingung folgendermaßen vorbereitet (die Angaben beziehen sich auf die Menge für 1 Well):

Mastermix 1: 45 µl Optimem + 1 nmol siRNA

Mastermix 2: 46 µl Optimem + 4 µl Lipofectamin

Die verwendete siRNA ist in Tabelle 27 aufgeführt. Mastermix 2 wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor Mastermix 1 und 2 kombiniert wurden und eine weitere, 20-minütige Inkubationszeit folgte. Im Anschluss daran wurden je 90 µl Mastermix 1 + 2 pro Well tropfenweise zu den 500 µl Medium gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Tropfen möglichst gleichmäßig über das gesamte Well verteilt werden. Die Zellen wurden nun über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium auf 1 ml/Well DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S gewechselt. Das Ernten der Zellen erfolgte 48-72 Stunden nach Transfektion.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit dem peqGOLD Total RNA Kit (S-Line) gemäß Herstellerangaben. Die Zellen wurden mittels Puffer lysiert und das Lysat anschließend auf eine Säule mit Silikamembran gegeben, welche RNA-Moleküle ab 200 Basen bindet. Es folgten mehrere Waschschrte, bevor die RNA in 40 µl sterilem Reinstwasser eluiert wurde.

Die RNA-Quantifizierung erfolgte mittels NanoDrop® ND-1000. Der NanoDrop® ist ein Spectrophotometer, der die optische Dichte bei 260 nm misst. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Mit Hilfe dieser Kenntnis kann die RNA-Konzentration der Probe ermittelt werden. Zur Kalibrierung wurde steriles Reinstwasser verwendet. Die 260/280-Ratio dient als Maß für die Reinheit der Probe und stellt das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu dem Absorptionskoeffizienten bei 280 nm dar. Ein Wert von mindestens 2,0 gilt hierbei als „rein“ für RNA. Die Lagerung der mRNA erfolgte bei -80 °C.

2.3.2 Synthese von cDNA

Die aus den Zellen isolierte RNA wurde anschließend in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies geschah mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Zu 1 µg RNA wurden jeweils 2 µl Random Primer (0,125 µg/µl) hinzugegeben und mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von 15 µl aufgefüllt. Danach wurden die Proben für 10 Sekunden gevortext und zentrifugiert, bevor sie schließlich 5 Minuten bei 70 °C inkubiert wurden. Nach darauf folgender Kühlung auf 4 °C wurden 10 µl Mastermix je Probe hinzugegeben. Die Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese ist in Tabelle 34 dargestellt. Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C.

Tabelle 34: Mastermix für cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl
5x M-MLV Reaction Buffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
UPH ₂ O	2,75 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Die kurzfristige Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C, die dauerhafte Lagerung bei – 20 °C.

2.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Zur Messung der Genexpression mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) wurde die zuvor umgeschriebene cDNA 1:10 mit Reinstwasser verdünnt. Vorher wurden 5 µl je Probe zur Erstellung einer Standardverdünnungsreihe (1, 1:10, 1:100, 1:1000) verwendet. Anschließend wurde pro verwendetem Primerpaar ein Mastermix angefertigt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.10 (s. Tabelle 25) aufgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermix für die qRT-PCR ist in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35: Mastermix für die qRT-PCR

Reagenz	Volumen
Primer (10 µM)	0,2 µl
Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP blue	2,5 µl
Reinstwasser	0,3 µl
Gesamtvolumen	3 µl

Der Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP blue enthält neben dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welches der Detektion von doppelsträngiger DNA dient, auch die zur Vervielfältigung der DNA nötige DNA-Polymerase, sowie dTNPs und MgCl₂. Für die qRT-PCR wurden pro Well jeweils 3 µl Mastermix und 2 µl Probe in eine 96-Well Platte pipettiert, welche danach mit einer Folie verschlossen wurde. Es folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 2000 rpm (Eppendorf Laborzentrifuge 5810). Anschließend wurde die Genexpression mit Hilfe des CFX Connect™ Real-Time Systems gemessen.

Die einzelnen Schritte inklusive des Temperaturverlaufs der qRT-PCR werden in Tabelle 36 gezeigt.

Tabelle 36: Bedingungen für die qRT-PCR

Vorgang	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung der Polymerase	1 Zyklus	95 °C	10 min
Trennung der doppelsträngigen DNA Anlagerung der Primer und Elongation	40 Zyklen	95 °C 60 °C	15 s 1 min
Erstellung der Schmelzkurve	1 Zyklus	95 °C 70 °C (↓ in 0,5 °C Schritten) 90 °C	30 s 5 s

Zur Qualitätskontrolle wurde für jedes Primerpaar eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, welche aufgrund der Fragment-spezifischen Schmelztemperatur Rückschlüsse auf die Spezifität der qRT-PCR zulässt. Eine Quantifizierung der DNA-Menge ist nur während der exponentiellen Phase der Amplifikation möglich, deren Beginn durch den Ct-Wert ausgedrückt wird. Die Effizienz der Amplifikation wurde mit Hilfe der ebenfalls gemessenen Standardverdünnungsreihe und dem Ct-Wert, der mittels CFX™ Manager Software bestimmt wurde, berechnet. Anhand dieses Wertes wurde anschließend die Menge der in den Ausgangsproben enthaltenen mRNA ermittelt. Die Auswertung erfolgte als relative Quantifizierung im Vergleich mit Mus musculus, ribosomal protein, large, P0 (m36b4) als gemessenem Referenzgen (housekeeping gene).

2.3.4 Chromatin-Immunoprecipitation

Die Chromatin-Immunoprecipitation wurde entsprechend einem, von Dr. Michael Schupp und anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Mitch Lazar, etablierten Protokoll durchgeführt. Es wurden einige geringfügige Anpassungen vorgenommen.

Circa 100 g gefrorene Leber von männlichen, ad-libitum gefütterten C57BL/6J Mäusen wurden mit Hilfe eines Mörsers in flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend in je ein 15 ml Falcon mit 1 %igem Formaldehyd in 10 ml PBS überführt, um eine Vernetzung von DNA und Proteinen zu erreichen. Nach 10-minütiger Inkubation der Proben bei Raumtemperatur auf einem Rotationsmischer, wurden je 0,5 ml 5 M Glycin zur Inaktivierung des Formaldehyds hinzugefügt und die Proben nochmals 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert. Es folgte ein 5-minütiger Zentrifugierungsschritt (1350 x G) bei 4 °C, nach welchem der Überstand verworfen wurde. Die nachfolgenden Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Das entstandene Zellpellet wurde in 2 ml hypotonischem Lyse-Puffer (HLB) (s. Tabelle 12) resuspendiert, in einen Douncer-Homogenisator überführt und nach Zugabe weiterer 5 ml HLB mit circa 20 Hüben langsam homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden anschließend in ein 50 ml Falcon pipettiert und die Zellen mittels Ultraschall mit 2 x 5 Sekunden Impulsen und 33 %-iger Intensität lysiert. Die Proben wurden anschließend in ein neues 15 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei 4 °C und 3000 x G zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes, wurden die lysierten Zellen 2 Mal mit 5-10 ml eiskaltem HLB gewaschen und ebenfalls für 5 Minuten bei 4 °C und 3000 x G zentrifugiert. Die Lyse des Zellkerns geschah durch Resuspendieren des Zellpellet in dem 5-

Material und Methoden

fachen Volumen an 1 %igem SDS Lyse-Puffer (s. Tabelle 13). Es folgten eine 20-minütige Inkubation auf Eis und ein 2-maliger Zyklus von Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad. Bis zur Ultraschallbehandlung mittels Bioruptor wurden die Proben auf Eis gelagert. Um Chromatinfragmentlängen von 200-600 Basenpaaren zu erhalten, wurde der Bioruptor auf 20 Zyklen von jeweils 30 Sekunden an / 30 Sekunden aus bei hoher Intensität, eingestellt. Die Chromatinkonzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometers bestimmt.

Pro Immunopräzipitation wurden 50-100 µg (ChREBP-ChIP) bzw. 100 µg (BHLHE40-ChIP) Chromatin verwendet und die Probe mit ChIP-Verdünnungspuffer (s. Tabelle 14) auf ein Endvolumen von 1 ml aufgefüllt, so dass mindestens eine Verdünnung von 1:10 entstand. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 4 °C und 13.000 x G zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf safe lock Tube überführt. Vor Zugabe von 2,5-5,0 µl (ChREBP-ChIP) bzw. 5-15 µl (BHLHE40-ChIP) Antikörper, wurden 30-40 µl je ChIP-Probe als Input entnommen und bei -20 °C tiefgefroren. Die verwendeten ChIP-Antikörper sind in Tabelle 29 dargestellt.

Nach Zugabe des jeweiligen Antikörpers, wurden die ChIP-Proben über Nacht bei 4 °C auf einem Rotationsmischer inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zu jeder Probe 150 µl einer 33 %-igen Suspension von Sepharose A-beads (Herstellung s. Tabelle 37) hinzugegeben.

Tabelle 37: Herstellung einer 33 %-igen Suspension von Sepharose A-beads

Substanz (Menge)	Tätigkeit
ddH ₂ O (1 ml)	Resuspension der Sepharose A-beads
Zentrifugation (1 Minute bei Raumtemperatur mit 1.000 x G) & Verwerfen des Überstandes	
ddH ₂ O (1 ml)	Waschen der Beads (2 x)
Zentrifugation (1 Minute bei Raumtemperatur mit 1.000 x G) & Verwerfen des Überstandes	
Blockpuffer (1 ml) (Herstellung s. Tabelle 15)	Waschen der Beads (2 x)
Zentrifugation (1 Minute bei Raumtemperatur mit 1.000 x G) & Verwerfen des Überstandes	
Blockpuffer (doppeltes Volumen wie geschätztes Volumen der Beads)	Resuspension der Sepharose A-beads

Anschließend wurden die Proben nochmals für 2 Stunden bei 4 °C auf einem Rotationsmischer inkubiert.

Die ausgefällten Extrakte wurden daraufhin nach folgendem Protokoll gewaschen: 2 x 5 Minuten mit jeweils 1 ml ChIP-Verdünnungspuffer (s. Tabelle 14), 1 x 5 Minuten mit jeweils 1 ml ChIP-Verdünnungspuffer und 0,5 M NaCl, 1 x 5 Minuten mit jeweils 1 ml ChIP-Waschpuffer (s. Tabelle 16) und 1 x 5 Minuten mit jeweils 1 ml TE-Puffer (s. Tabelle 17). Dazwischen wurden die Proben jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rotationsmischer inkubiert, 1 Minute bei Raumtemperatur und 1.000 x G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daran schloss sich eine Inkubation aller ChIP-Proben inklusive Inputs in 250 µl ChIP-Elutionspuffer (s. Tabelle 18) zur Aufhebung der Vernetzung von DNA und Protein an. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Eppendorf Thermomixer Compact unter leichtem Schütteln (750-800 rpm) bei 65 °C.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei Raumtemperatur für 15 Sekunden und 1.000 x G zentrifugiert und anschließend das Eluat ohne die Beads in ein neues 1,5 ml Eppendorf safe lock Tube pipettiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Verdünnung aller Proben inklusive Inputs in 250 µl TE-Puffer mit 80 µg Proteinase K und 20 µg Glykogen zur Verdauung des zellulären Proteins. Die auf diese Weise verdünnten Proben wurden vorsichtig gemischt und für 2 Stunden im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, bevor jeweils 44 µl 5 M LiCl zu jeder Probe hinzugegeben wurden. Danach wurden jeweils 500 µl Probe und 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol in ein Phase Lock Gel Tube gegeben, das Tube wurde heftig geschüttelt, um Probe und Lösung zu vermischen und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 x G zentrifugiert. Zur oberen wässrigen Phase wurden nun 500 µl Chloroform hinzugegeben, bevor ein weiterer 5-minütiger Zentrifugierungsschritt bei

Raumtemperatur und 13.000 x G erfolgte. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorf *safe lock Tube*, das bereits 1 ml Ethanol 100 % enthielt, pipettiert und einmalig resuspendiert. Es folgte eine 30-minütige Präzipitation bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Proben für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 13.000 x G zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und das entstandene Zellpellet mit 750 µl Ethanol 75 % gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugierungsschritt für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 x G, wurde das Zellpellet für circa 5-10 Minuten luftgetrocknet und schließlich in jeweils 30 µl Reinstwasser mit 0,12 µl RNase A resuspendiert. Zur RNA-Verdauung wurden die Proben anschließend für 1 Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Ein kleiner Teil der Proben wurde nun sofort zur Quantifizierung mittels qPCR genutzt, während der restliche Teil zur Aufbewahrung bei -80 °C tiefgefroren wurde. Die Normalisierung der qPCR erfolgte mit Insulin oder 36b4 als Referenzgenen. Die für die qPCR verwendeten Primer sind in Tabelle 26 aufgeführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Gesamtproteinextraktion und Proteinquantifizierung mittels BCA

Für die Gewinnung von Gesamtprotein aus Zellen wurden die in 12-Well Platten kultivierten Zellen zuerst in 500 µl PBS pro Well gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers in ebenfalls 500 µl PBS abgelöst. Es wurden jeweils 3 Wells gleicher Bedingung in einem 1,5 ml *Safe Seal* Gefäß kombiniert. Darauf folgte eine 2-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 4000 x G. Nach Verwerfen des Überstandes, wurde das entstandene Zellpellet in einem angemessenen Volumen Proteinlysepuffer (RIPA) (s. Tabelle 4) resuspendiert und bei -20 °C tiefgefroren.

Als nächster Schritt erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Proben zur weiteren Zellyse mit dem SONOPLUS Ultraschall-Homogenisator. Jede Probe wurde 5 Ultraschallimpulsen der niedrigsten, am Gerät einstellbaren Intensität ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 4 °C mit 13 000 x G zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues 1,5 ml *Safe Seal* Gefäß überführt.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Die Proben wurden hierfür 1:20 mit BCA Working Reagent verdünnt und im Anschluss 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei macht man sich zunutze, dass Cu^{2+} - Ionen in alkalischem Milieu durch Protein zu Cu^+ - Ionen reduziert werden. In einem zweiten Schritt reagieren die Cu^+ - Ionen mit Bicinchoninsäure unter Bildung eines violetten Komplexes. Die Absorption dieses Komplexes, gemessen mit einem UV-Spektrometer bei 562 nm, steigt mit zunehmender Proteinkonzentration linear an. Dadurch wird es möglich, die unbekannte Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe einer BSA-Standardverdünnungsreihe, deren Absorption ebenfalls gemessen wird, zu berechnen.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Zell- und Leberprotein

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird dazu genutzt Proteine ihrer Größe nach in einem Gel aufzutrennen. Für die Darstellung von BHLHE40 und RETSAT wurden 12 %-ige Gele, für die Darstellung von RBP4 15 %-ige Gele verwendet. Die hergestellten Trenngele hatten eine Dicke von 1,5 mm. Tabelle 38 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Trenngele.

Tabelle 38: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE

Substanz	12 % Gel	15 % Gel
ddH ₂ O	3,35 ml	2,4 ml
1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 (Herstellung s. Tabelle 5)	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
30 % Acrylamid	4 ml	5 ml
10 % APS	75 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl

Die Trenngele wurden während des mindestens 30-minütigen Auspolymerisierens mit einer geringen Menge Isopropanol überschichtet, um eine glatte Gelgrenze zu erhalten und den Kontakt mit Sauerstoff, der die korrekte Polymerisation verhindern würde, zu vermeiden. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen, die Gelgrenze kurz mit ddH₂O gewaschen und schließlich die Trenngele mit den, ebenfalls 1,5 mm dicken, Sammelgelen überschichtet. Vor dem 30-minütigen Auspolymerisieren wurden in die Sammelgele jeweils 1,5 mm Kämme eingesetzt, wodurch je nach Kamm 10-15 Taschen zum Laden der Proteinproben entstanden. Die Zusammensetzung der Sammelgele ist in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39: Zusammensetzung der Sammelgele für die SDS-PAGE

Substanz	Volumen pro 1,5 mm Gel
ddH ₂ O	3,05 ml
0,5 M TRIS-HCl pH 6,8 (Herstellung s. Tabelle 6)	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
30 % Acrylamid	650 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	6 µl

Die Herstellung der Gele erfolgte mit Hilfe eines Gelgießstandes inklusive Glasplatten und Kämme.

Abhängig von der jeweiligen Fragestellung wurden pro Probe 10-40 µg Protein geladen. Das Probenvolumen wurde mit der entsprechenden Menge Proteinlysepuffer auf 20 µl aufgefüllt, bevor 5 µl Proteinladepuffer hinzugegeben wurden. Der Proteinladepuffer setzte sich zusammen aus 7 Teilen Pierce™ Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer 5x und 1 Teil 2-Mercaptoethanol.

Um die Proteine ausschließlich ihrer Größe nach aufzutrennen, müssen deren andere Eigenschaften, wie Form und Ladung, vereinheitlicht werden (Reinard 2018). Zur Denaturierung, wurden die Proben einer 5-minütigen Hitzebehandlung bei 95°C unterzogen. Anschließend erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation mit 13 000 x G, um Zellrückstände abzutrennen. Durch Umhüllung mit Natriumdodecylsulfat (SDS), welches im Proteinladepuffer enthalten ist, erhalten die Proteine eine einheitliche negative Ladung.

Von den, auf diese Weise behandelten, Proteinproben wurden jeweils 18 µl geladen. Zusätzlich wurde eine Geltasche mit 4 µl des Proteingrößenmarkers „Precision Plus Protein™ Standards Dual Color“ beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 1 x Elektrophoresepuffer, hergestellt aus 10 x Elektrophoresepuffer (s. Tabelle 7), in einer Elektrophoresekammer vom Typ „Mini-PROTEAN Tetra Cell“. Das Einwandern der Proteine in das Sammelgel geschah in ca. 20 Minuten bei 80 V, es folgte die Proteintrennung bei 120 V über ca. 90 Minuten.

2.4.3 Western Blot

Der Western Blot dient dem Transfer der, zuvor in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten, Proteine auf eine Trägermembran. Die Proteinexpression kann anschließend mittels Immundetektion und Chemilumineszenz nachgewiesen werden.

Die Übertragung der Proteine auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran erfolgte als Nassblot in einer Tank-Blotting-Kammer mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst für 1 Minute in 100 % Methanol aktiviert. Sammel- und Trenngel wurden nach der SDS-PAGE voneinander abgetrennt. Die einzelnen Komponenten wurden nun in kaltem Transferpuffer (s. Tabelle 8) nach dem Sandwichprinzip ohne Luftblasen zusammengefügt. Es wurde folgende Reihenfolge eingehalten: Anode – 2 Schwämme – 2 x Whatmanpaper – aktivierte PVDF Membran – Trenngel – 2 x Whatmanpaper – 2 Schwämme – Kathode. Der Transfer wurde entweder 2 Stunden auf Eis bei 80 V oder über Nacht bei 4 °C und 29 V durchgeführt.

Um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurde die PVDF-Membran je nach Antikörper anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 2,5 bis 4 %-igem Milchpulver geblockt. Die Zusammensetzung des Blockpuffers ist in Tabelle 11 dargestellt.

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder alternativ über 1-3 Nächte bei 4 °C. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 28 aufgelistet. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min in TBST (s. Tabelle 10) gewaschen. Es folgte die Inkubation in einem zweiten, mit dem Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelten Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur beziehungsweise über Nacht bei 4 °C, woran sich ein weiterer Waschschrift in TBST für 2 x 15 min anschloss.

Für die Antikörperdetektion wurden Pierce™ ECL Western Blotting Substrat 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und die PVDF-Membran wurde für 1 Minute mit dieser Lösung inkubiert. ECL ist ein Substrat basierend auf Luminol, welches durch HRP oxidiert wird. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ beziehungsweise mittels Röntgenfilm detektiert.

Zur Kontrolle, ob in allen Proben gleich viel Protein geladen wurde, wurde jeweils zusätzlich mindestens eines der folgenden Referenzproteine untersucht: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und/oder beta-Actin (β -ACTIN) und/oder RAS-related Nuclear Protein (RAN).

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Zellkultur- und ChIP-Experimente erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad Prism® 5.0. Für die ChIP-Experimente wurden Leberproben von drei verschiedenen, ad libitum gefütterten Mäusen verwendet. Die Zellexperimente wurden jeweils mindestens drei Mal unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Aus diesen drei Werten wurde anschließend der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet. Es wurde eine Normalverteilung der Daten angenommen. In den Abbildungen ist jeweils der Mittelwert plus die Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels zweiseitigem T-Test auf Signifikanz untersucht. Werte von $*p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Bhlhe40 auf die Differenzierung von Adipozyten

Ergebnisse einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2002 zeigen, dass die retrovirale Überexpression von Bhlhe40 die Differenzierung von Adipozyten hemmt. Als zugrunde liegender Mechanismus wird die Repression der *Pparγ2*-Promotoraktivität vorgeschlagen (Yun, Maecker et al. 2002). Es sollte nun untersucht werden, ob diese Ergebnisse mittels adenoviraler *Bhlhe40*-Überexpression bestätigt werden können.

Im Hinblick auf eine Beeinflussung der Adipogenese durch die Überexpression von *Bhlhe40*, sollte weiterhin untersucht werden, ob und wie sich ein *Bhlhe40*-Knockdown auf die Differenzierung von Adipozyten auswirkt.

3.1.1 3T3-L1 Zellen als Modell der Adipogenese

Um den Einfluss von BHLHE40 auf die Differenzierung von Adipozyten untersuchen zu können, wurden zunächst 3T3-L1 Zellen als Adipogenese-Modell validiert. Hierfür wurden 3T3-L1 Präadipozyten zwei Tage nach Konfluenz, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, mit Dexamethason, Insulin und IBMX stimuliert und anschließend verschiedene Merkmale an Tag 0, vor Stimulation, und 7 Tage nach Stimulation verglichen.

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Phänotyp zwischen undifferenzierten 3T3-L1 Zellen an Tag 0 und voll ausdifferenzierten Adipozyten an Tag 7 bezüglich der Akkumulation von Lipiden (s. Abbildung 2). Im Gegensatz zu den undifferenzierten 3T3-L1 Zellen, zeigten die ausdifferenzierten Zellen zahlreiche Vakuolen mit akkumulierten Lipidtropfen. Dies galt sowohl für die Betrachtung mittels Phasenkontrast-Mikroskop, als auch für den Vergleich nach Anfärben der Zellen mit Oil-Red-O, einem Farbstoff der Triglyzeride in Zellen rot anfärbt.

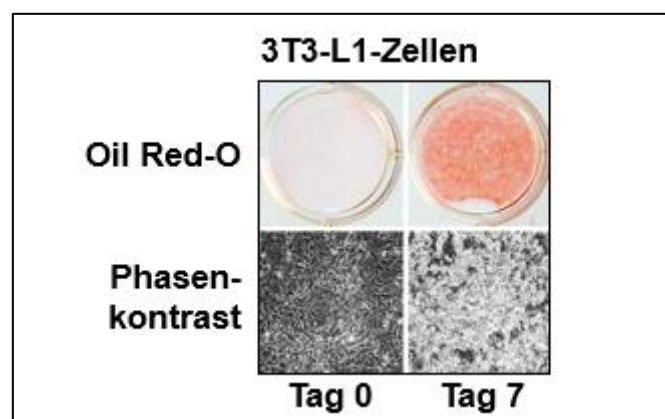


Abbildung 2: Phänotyp 3T3-L1 Zellen an Tag 0 und Tag 7 der Adipogenese.

Dargestellt ist der Phänotyp von 3T3-L1 Zellen mittels Oil-Red-O-Färbung bzw. Phasenkontrastmikroskopie an Tag 0 (Präadipozyten) und Tag 7 (Adipozyten) nach adipogener Stimulation.

Die Validierung der 3T3-L1 Zellen als Adipogenese-Modell auf mRNA-Ebene erfolgte durch die vergleichende Messung der Genexpression verschiedener bekannter Präadipozyten- und Adipozyten-Markergene an Tag 0 und Tag 7.

Während dieser Zeitspanne zeigte sich eine signifikante Reduktion in der mRNA-Expression der Präadipozyten-Marker *Pref1* und *Gata2* (s. Abbildung 3). Noch deutlicher jedoch war der signifikante Anstieg in der mRNA-Expression der Adipozyten-Marker *Pparγ2*, *C/ebpa*, *aP2* und *Adiponektin* zwischen Tag 0 und Tag 7 (s. Abbildung 4). Aufgrund dieser stärkeren Reaktion der Adipozyten-Marker, wurden im weiteren Verlauf der Experimente ausschließlich die Adipozyten-Markergene zur Bestimmung des Maßes der Zelldifferenzierung gemessen.

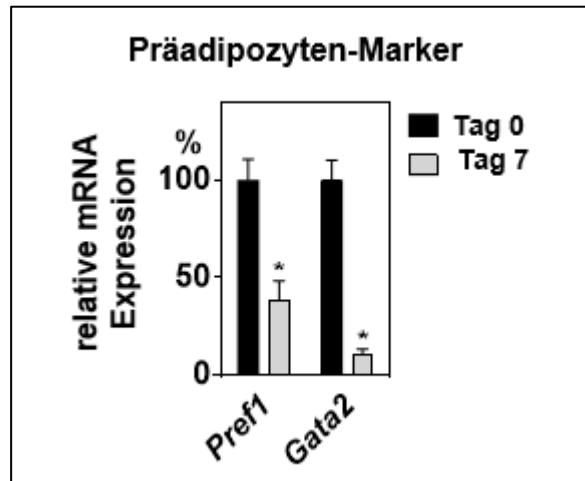


Abbildung 3: Expression der Prädipozyten-Markergene *Pref1* & *Gata2* in 3T3-L1 Zellen.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Prädipozyten-Marker *Pref1* und *Gata2* an Tag 0 und Tag 7 der Adipogenese. (* $p < 0,05$ zu Tag 0, $n=3$)

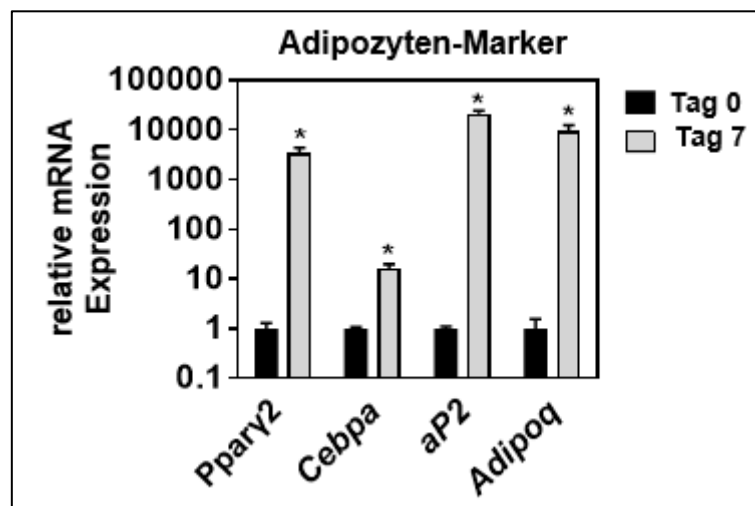


Abbildung 4: Expression der Adipozyten-Markergene *Pparγ2*, *Cebpa*, *aP2* und *Adipoq* 3T3-L1 Zellen.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Adipozyten-Marker *Pparγ2*, *Cebpa*, *aP2* und Adiponektin (*Adipoq*) an Tag 0 und Tag 7 der Adipogenese. (* $p < 0,05$ zu Tag 0, $n=3$)

Dieser Anstieg der Adipozyten-Marker war auch auf Proteinebene festzustellen, wie Untersuchungen mittels Western Blot darlegten. Ebenso wie zuvor auf mRNA-Ebene, zeigte sich auch auf Proteinebene ein deutlicher Anstieg in der Menge der Adipozyten-Marker von Tag 0 auf Tag 7 (s. Abbildung 5). Dies galt sowohl für die Zellproteine PPAR γ , C/EBP α und aP2, als auch für Adiponektin (ADIPOQ), ein Peptidhormon, das von ausdifferenzierten Adipozyten sezerniert wird. RAN bzw. RBP4 dienten hierbei als Ladekontrolle. Voraussetzung für die Verwendung eines Proteins als Ladekontrolle ist eine stabile Expression oder, im Fall von RBP4, eine stabile Sekretion des Proteins im untersuchten Zelltyp. RBP4 ist das Transportprotein für Retinol im Serum und wird von Adipozyten sezerniert. Unter Verwendung von FBS als Zusatz im Zellkulturmedium, wird RBP4 stabil von Adipozyten sezerniert und eignet sich darum ausgezeichnet als Ladekontrolle für Proteine im Überstand.

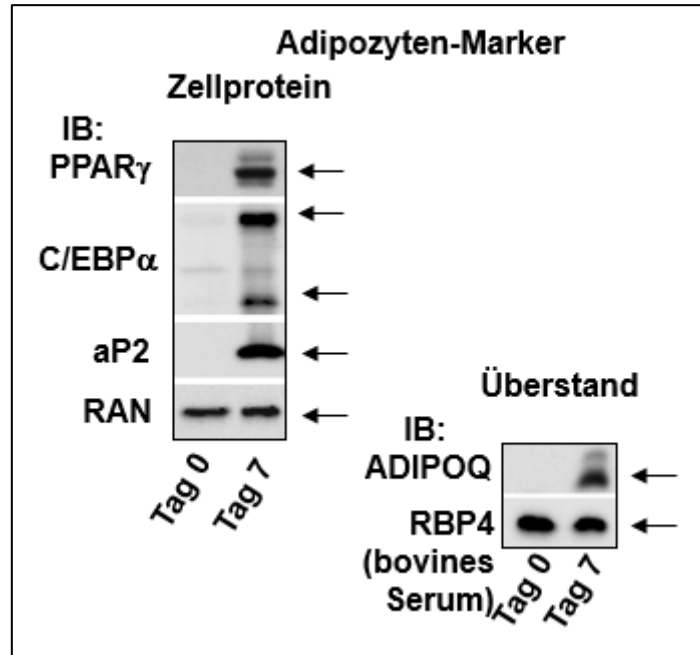


Abbildung 5: Adipozyten-Marker PPAR γ , C/EBP α , aP2 und ADIPOQ auf Proteinebene.

Dargestellt ist die Proteinmenge der Adipozyten-Marker PPAR γ , C/EBP α , aP2 und Adiponektin (ADIPOQ) an Tag 0 und Tag 7 der Adipogenese mittels Immunoblot. Als Ladekontrolle diente RAN bzw. RBP4.

3.1.2 Hochregulation der *Bhlhe40*-Expression während der Adipogenese

Als nächstes wurde die Expression ausgewählter Gene im Verlauf der Adipogenese untersucht. Dafür wurde die mRNA-Expression über einen Zeitraum von 8 Tagen zu vier verschiedenen Zeitpunkten (an Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 8) gemessen.

Hierbei lag der Fokus zunächst auf *Ppar γ 2*, dem so genannten Masterregulator der Adipogenese, und *aP2*, einem bekannten PPAR γ 2-Zielgen. Beide Gene wurden während der Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten hochreguliert, beginnend ab Tag 2 (Abb. 6).

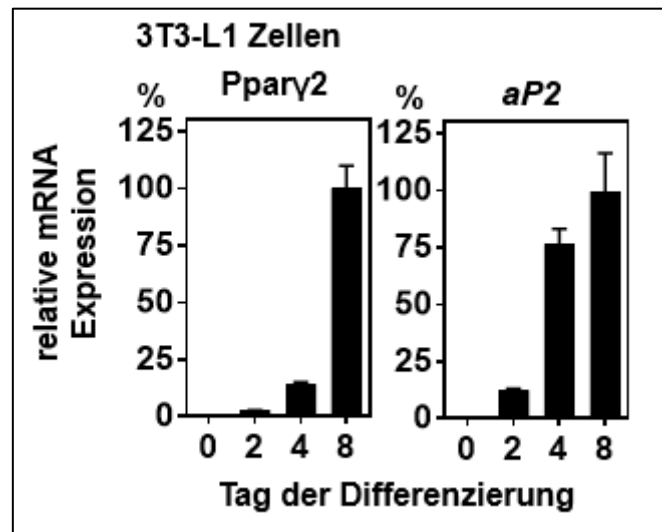


Abbildung 6: Zunehmende Expression von *Ppar γ 2* und *aP2* während der Adipogenese auf mRNA-Ebene.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Ppar γ 2* und *aP2* in 3T3-L1 Zellen an Tag 0,2,4 und 8 der Adipogenese, gemessen mittels qRT-PCR. (n=3)

Ähnlich verhielt es sich mit *Bhlhe40* und *Bhlhe41*: die Expression beider Gene wurde während der Adipogenese hochreguliert (s. Abbildung 7). Um mögliche Spleißvarianten von *Bhlhe40* zu berücksichtigen, wurde dessen Expression mit zwei verschiedenen qRT-PCR-Primern gemessen. Abbildung 8 zeigt eine Hochregulation für BHLHE40 und PPAR γ auch auf Proteinebene.

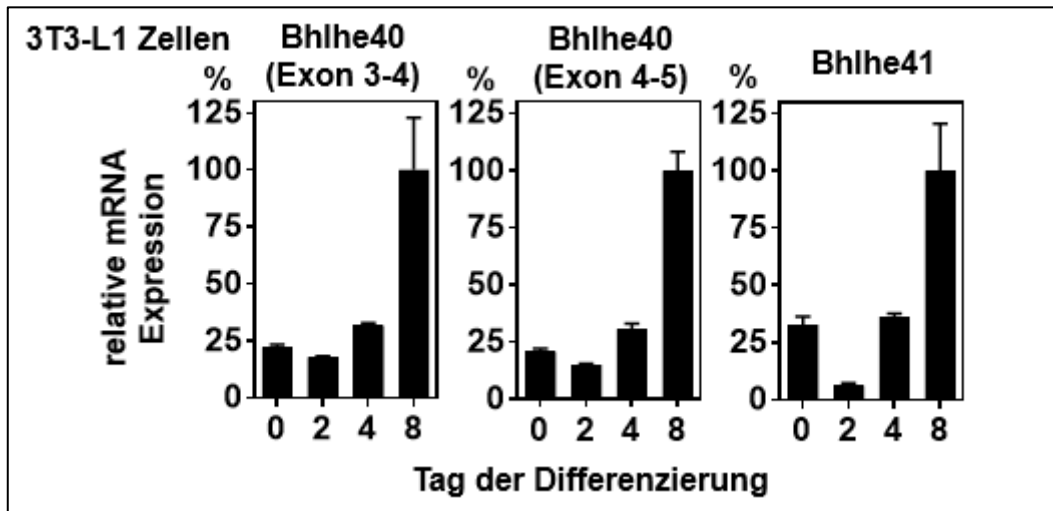


Abbildung 7: Zunehmende Expression von *Bhlhe40* und *Bhlhe41* während der Adipogenese auf mRNA-Ebene.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* (gemessen mit zwei verschiedenen qRT-PCR-Primerpaaren) und *Bhlhe41* in 3T3-L1 Zellen an Tag 0, 2, 4 und 8 der Adipogenese, gemessen mittels qRT-PCR. (n=3)

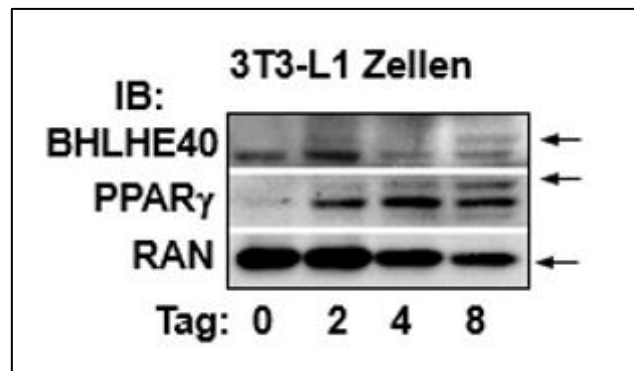


Abbildung 8: Zunehmende Expression von BHLHE40 und PPAR γ während der Adipogenese auf Proteinebene.

Dargestellt ist die, in 3T3-L1 Zellen vorhandene Menge, an BHLHE40- und PPAR γ -Protein an Tag 0, 2, 4 und 8 der Adipogenese mittels Western Blot. RAN diente als Ladekontrolle.

3.1.3 Einfluss einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Adipozyten-Differenzierung

Nachdem nun einige Grundlagen in Bezug auf 3T3-L1 Zellen und die Expression bestimmter Gene während der Adipogenese dargelegt wurden, sollte im nächsten Schritt die Rolle von BHLHE40 bei der Adipozytendifferenzierung genauer untersucht werden.

Dazu sollte zunächst getestet werden, ob eine adenovirale *Bhlhe40*-Überexpression, ebenso wie die früher gezeigte retrovirale Überexpression (Yun, Maecker et al. 2002), zu einer verminderten Adipozytendifferenzierung führt.

3.1.3.1 Ermittlung der Viruskonzentration zur *Bhlhe40*-Überexpression

Um die optimale Viruskonzentration für die *Bhlhe40*-Überexpression zu finden, wurden 3T3-L1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Adenoviren infiziert. Die verwendeten Adenoviren exprimierten entweder *Bhlhe40* oder GFP (Kontrollzellen). Abbildung 9 zeigt die Menge an endogenem BHLHE40-Protein in den Kontrollzellen und die Menge an BHLHE40-Protein nach Infektion der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen *Bhlhe40* exprimierender Adenoviren. Anhand dieser Abbildung wird ebenfalls deutlich, dass die Menge an endogenem BHLHE40-Protein kaum mit dem zur Verfügung stehenden Western Blot-Antikörper darstellbar war.

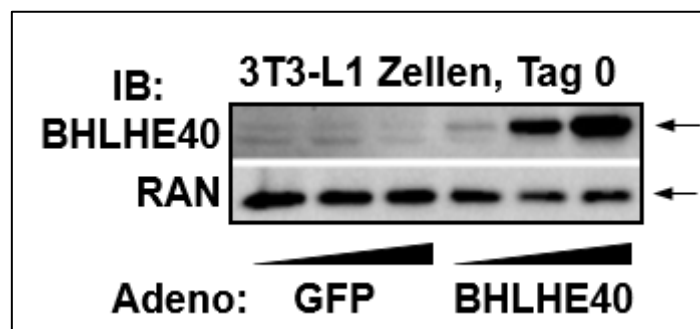


Abbildung 9: Menge an BHLHE40-Protein nach adenoviraler Überexpression.

Gezeigt wird die Menge an BHLHE40-Protein in 3T3-L1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Virusdosen. Die Darstellung erfolgte mittels Western Blot. (Viruskonzentrationen in aufsteigender Reihenfolge: $2,38 \times 10^8$ pfu/ml; $6,8 \times 10^8$ pfu/ml; $1,36 \times 10^9$ pfu/ml)

Basierend auf dem Erscheinungsbild der Zellen, der Anzahl der infizierten Zellen und der Menge an BHLHE40-Protein wurde eine mittlere Viruskonzentration von $1,02 \times 10^9$ pfu/ml (s. Kapitel 2.2.4) für die *Bhlhe40*-Überexpression gewählt. Die Konzentration an GFP exprimierendem Adenovirus (Kontrollgruppe) wurde dementsprechend angepasst. Diese mittlere Viruskonzentration von $1,02 \times 10^9$ pfu/ml führte zur Infektion von ca. 50 % der Zellen, sichtbar in der GFP-Kontrollgruppe mittels UV-Licht (s. Abbildung 10).

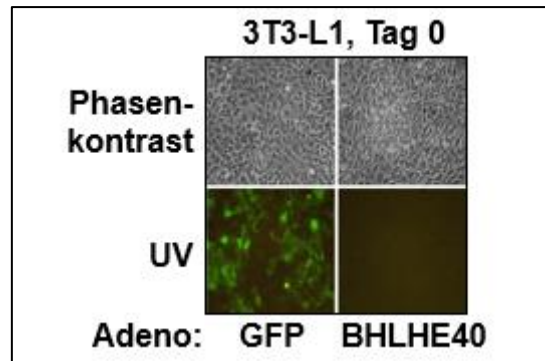


Abbildung 10: Verwendete Konzentration an Adenoviren führte zur Infektion von ca. 50 % der Zellen.

Darstellung mittels UV-Licht. Die mit Adeno-GFP infizierten Zellen fluoreszierten grün. Mittels Phasenkontrastmikroskop war kein Unterschied im Phänotyp zwischen Adeno-BHLHE40-Zellen und Kontrollzellen erkennbar. (Viruskonzentration: $1,02 \times 10^9$ pfu/ml)

Die Validierung der *Bhlhe40*-Überexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Mit einer Adenoviruskonzentration von $1,02 \times 10^9$ pfu/ml konnte eine ca. 60-fache Überexpression von *Bhlhe40* in Relation zur Kontrollgruppe erreicht werden (s. Abbildung 11). In den nachfolgend beschriebenen Experimenten zu den Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression (s. Kapitel 3.1.3.2 bis Kapitel 3.1.3.4) wurde stets diese Viruskonzentration von $1,02 \times 10^9$ pfu/ml verwendet.

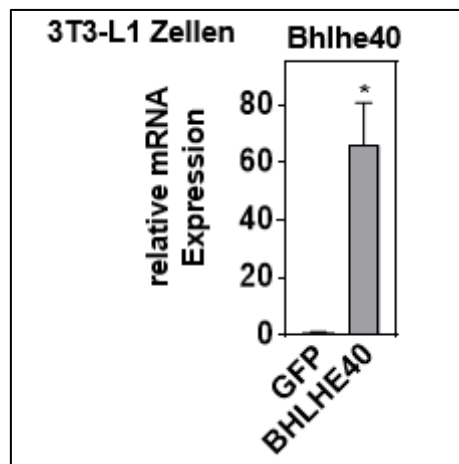


Abbildung 11: *Bhlhe40* ca. 60-fach überexprimiert nach Behandlung der Zellen mit Adeno-BHLHE40.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* in 3T3-L1 Zellen mittels qRT-PCR. Als Kontrolle dienten mit Adeno-GFP behandelte Zellen. Viruskonzentration: $1,02 \times 10^9$ pfu/ml (* $p < 0,05$ zu GFP, $n=3$)

3.1.3.2 *Bhlhe40*-Überexpression mindert die Expression von *Bhlhe41*

BHLHE40 und BHLHE41 gehören beide zur bHLH-Proteinsuperfamilie mit einer Homologie von über 95 % in ihrer bHLH-Domäne (Yamada und Miyamoto 2005). Vor diesem Hintergrund sollte nun untersucht werden, ob die Überexpression von *Bhlhe40* in 3T3-L1 Zellen die Expression von *Bhlhe41* beeinflusst. Dafür wurde die mRNA-Expression von *Bhlhe41* nach *Bhlhe40*-Überexpression mittels qRT-PCR gemessen. Abbildung 12 zeigt eine Reduktion der mRNA-Expression von *Bhlhe41* in Reaktion auf die *Bhlhe40*-Überexpression.

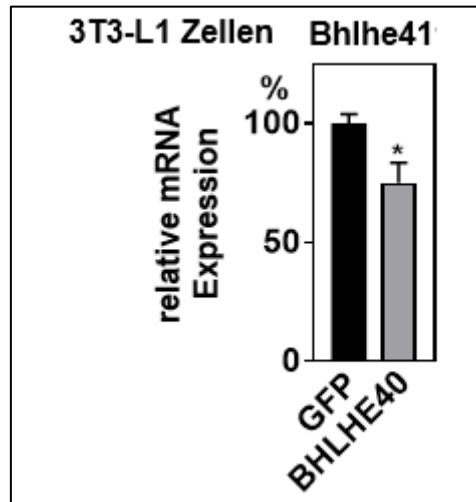


Abbildung 12: Verminderte Expression von *Bhlhe41* als Antwort auf *Bhlhe40*-Überexpression.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe41* nach *Bhlhe40*-Überexpression, gemessen mittels qRT-PCR. Viruskonzentration: $1,02 \times 10^9$ pfu/ml (* $p < 0,05$ zu GFP, $n=3$)

3.1.3.3 *Bhlhe40*-Überexpression beeinflusst *Ppar γ* -Expression nicht signifikant

Von Yun *et al.* (2002) wurde in einer vorausgehenden Publikation die Hypothese aufgestellt, dass die Inhibition der Adipozytendifferenzierung durch die direkte Repression der *Ppar γ 2*-Promotoraktivität gesteuert wird, welche ihrerseits durch BHLHE40 vermittelt wird. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Überexpression von *Bhlhe40* bereits die basale Konzentration an PPAR γ 2 vor Stimulation mittels Differenzierungsinduktoren beeinflusst. Dafür wurde die mRNA-Expression von *Ppar γ 2* nach *Bhlhe40*-Überexpression mittels qRT-PCR gemessen (s. Abbildung 13A).

Da *Ppar γ 2* in nur sehr geringer Menge in nicht differenzierten Adipozyten exprimiert wird (Tontonoz, Hu *et al.* 1994), wurde zusätzlich dessen enger Verwandter *Ppar γ 1* gemessen (s. Abbildung 13B). Die vergleichende Betrachtung der C_T -Werte (engl. *threshold cycle*) von *Ppar γ 1* und *Ppar γ 2* zeigte, dass *Ppar γ 1* ca. 64-fach (2^6) stärker in Präadipozyten exprimiert wurde als *Ppar γ 2*. Die Messungen zeigten jedoch weder für *Ppar γ 2*, noch für *Ppar γ 1* eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression nach *Bhlhe40*-Überexpression (s. Abbildung 13).

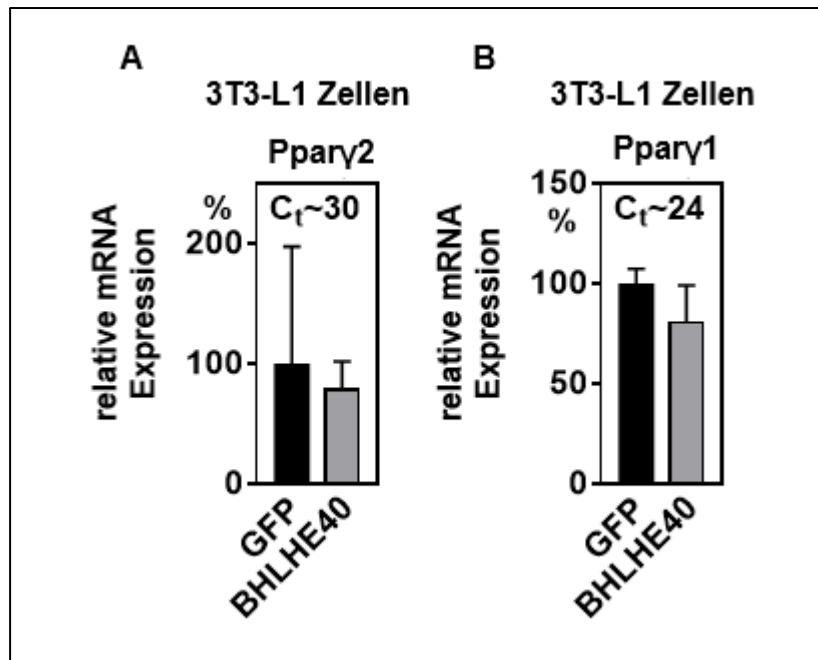


Abbildung 13: Keine signifikante Reduktion der *Ppar2*- und *Ppar1*-Expression nach *Bhlhe40*-Überexpression.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Ppar2* (A) und *Ppar1* (B) nach *Bhlhe40*-Überexpression, gemessen mittels qRT-PCR. Viruskonzentration: $1,02 \times 10^9$ pfu/ml (n=3) (C: *threshold cycle*)

3.1.3.4 *Bhlhe40*-Überexpression hemmt die Adipogenese

Als nächstes wurde der Einfluss einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten untersucht (s. Abbildung 14).

Dafür wurde *Bhlhe40* mit Hilfe von Adenoviren überexprimiert und die Zellen anschließend zur Differenzierung stimuliert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die vor Stimulation zur Differenzierung mit GFP-exprimierenden Adenoviren behandelt wurden. Die verwendete Virusdosis führte zur Infektion von ca. 50 % der Zellen, erkennbar an der Fluoreszenz der GFP-exprimierenden Zellen unter UV-Licht nach 7 Tagen Differenzierung (s. Abbildung 14C). Die vergleichende Betrachtung der Zellen 7 Tage nach Stimulation zeigte, dass die Zellen nach *Bhlhe40*-Überexpression schlechter differenzierten als die GFP-Kontrollzellen. Dies war durch die geringere Anfärbbarkeit der Zellen mittels Oil-Red-O gut zu erkennen (s. Abbildung 14A). Oil-Red-O ist ein Farbstoff, der Triglyzeride rot färbt. Bei Betrachtung mittels Phasenkontrastmikroskop wurde dieser Unterschied in der Differenzierung allerdings noch deutlicher (s. Abbildung 14B). Es waren eindeutig mehr durchsichtig-weiße Fettvakuolen in den GFP-Kontrollzellen als in den BHLHE40-Zellen darstellbar.

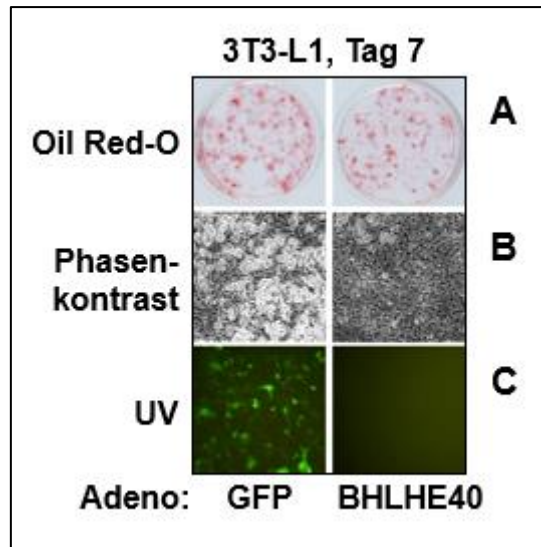


Abbildung 14: *Bhlhe40*-Überexpression hemmt die Adipogenese.

Dargestellt sind 3T3-L1 Zellen nach *Bhlhe40*-Überexpression an Tag 7 der Differenzierung. Der Farbstoff Oil-Red-O färbt die Triglyzeride in den differenzierten Zellen rot an (A). Unter dem Phasenkontrastmikroskop stellten sich die Fetttropfen in den ausdifferenzierten Zellen durchsichtig bis weiß dar (B). Die mit Adeno-GFP infizierten Zellen fluoreszierten unter UV-Licht grün (C). Viruskonzentration: $1,02 \times 10^9$ pfu/ml

Dieser Unterschied in der Differenzierung war nicht nur makro- (Oil-Red-O Färbung) und mikroskopisch (Phasenkontrastmikroskop) zu sehen, sondern auch auf mRNA-Ebene anhand der zuvor validierten Adipozyten-Marker (s. Kapitel 3.1.1) festzustellen. Abbildung 15 zeigt, eine 60-75 %-ige Reduktion der mRNA-Expression bei allen Adipozyten-Markern ausgenommen *C/ebpa* als Konsequenz der *Bhlhe40*-Überexpression.

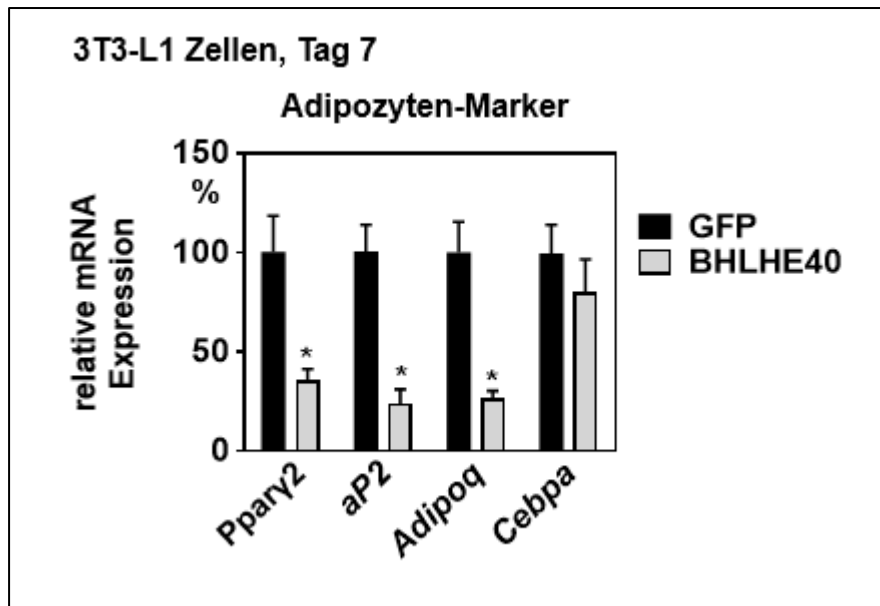


Abbildung 15: *Bhlhe40*-Überexpression hemmt die Expression der Adipozyten-Markergene *Pparg2*, *aP2*, *Adipoq* und *C/ebpa*.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Adipozyten-Marker *Pparg2*, *aP2*, Adiponektin (*Adipoq*) und *C/ebpa*. Die Auswertung der qRT-PCR zeigte, mit Ausnahme von *C/ebpa*, eine signifikante Reduktion in der Expression der Adipozyten-Marker als Antwort auf die *Bhlhe40*-Überexpression. Viruskonzentration: $1,02 \times 10^9$ pfu/ml (* $p < 0,05$ zu GFP, $n=3$)

Untersuchungen mittels Western Blot zeigten, dass auch die Menge an PPAR γ -, aP2-, Adiponektin (ADIPOQ)- und C/EBP α -Protein durch die *Bhlhe40*-Überexpression reduziert wurde (s. Abbildung 16). Die Reduktion von C/EBP α schien auf Proteinebene deutlicher als auf mRNA-Ebene zu sein.

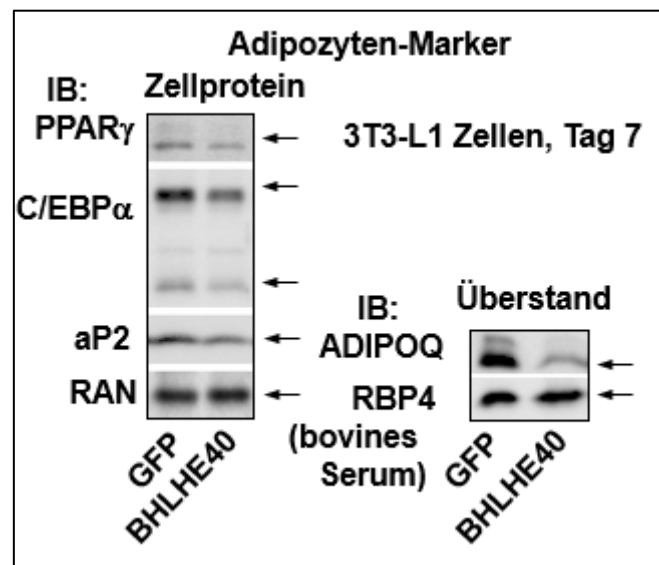


Abbildung 16: *Bhlhe40*-Überexpression hemmt die Expression der Adipozyten-Markerproteine PPAR γ , aP2, Adiponektin und C/EBP α .

Die Darstellung der Markerproteine mittels Western Blot zeigt eine Reduktion der Proteinmenge in den Adeno-BHLHE40 Zellen 7 Tage nach Beginn der Differenzierung. Als Ladekontrolle dienen RAN bzw. RBP4. Viruskonzentration: $1,02 \times 10^9$ pfu/ml

3.1.4 Einfluss eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Adipozyten-Differenzierung

Nachdem zunächst bestätigt werden konnten, dass sich auch eine adenovirale *Bhlhe40*-Überexpression negativ auf die Differenzierung von Adipozyten auswirkt, sollte nun in einem nächsten Schritt der Einfluss eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Adipozyten-Differenzierung untersucht werden.

3.1.4.1 Validierung des *Bhlhe40*-Knockdowns in 3T3-L1 Zellen

Der *Bhlhe40*-Knockdown erfolgte mittels Elektroporation mit zwei verschiedenen, *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs. Die Kontrollzellen wurden mit Kontroll-siRNA elektroporiert.

Die verwendeten *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs sind schematisch in Abbildung 17 dargestellt. Initial wurden die Knockdown-Experimente mit einer siRNA durchgeführt, welche im Bereich von Exon 5 bindet, beginnend bei Nukleotid 677 (siRNA *Bhlhe40_677*) (s. Abbildung 17A).

Um weitgehend auszuschließen, dass die Ergebnisse der Knockdown-Experimente durch mögliche *Bhlhe40*-Spleißvarianten beeinflusst werden, wurden einige der Experimente mit einer zweiten *Bhlhe40*-spezifischen siRNA wiederholt. Die zweite verwendete siRNA bindet im Bereich von Exon 2 und 3, beginnend bei Nukleotid 419 (siRNA *Bhlhe40_419*) (s. Abbildung 17B).

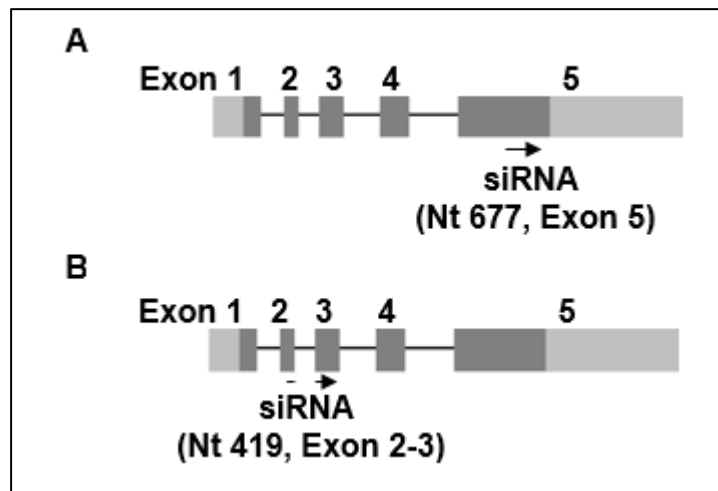


Abbildung 17: Schematische Darstellung der für den *Bhlhe40*-Knockdown verwendeten *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs.

Für den *Bhlhe40*-Knockdown wurden zwei verschiedene *Bhlhe40*-spezifische siRNAs verwendet. Eine der beiden siRNAs bindet innerhalb von Exon 5, beginnend bei Nukleotid 677 (A), die zweite siRNA bindet innerhalb von Exon 2 und 3, beginnend bei Nukleotid 419. (Nt: Nukleotid)

Für die Validierung des *Bhlhe40*-Knockdowns wurden die Zellen 72 Stunden nach Elektroporation geerntet. Mittels qRT-PCR wurde anschließend die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* bestimmt. Um auch hier mögliche Spleißvarianten zu berücksichtigen, wurden zwei verschiedene *Bhlhe40* qRT-PCR-Primerpaare verwendet, deren Bindung im Bereich von Exon 3-4 bzw. im Bereich von Exon 4-5 erfolgte.

Die Elektroporation der Zellen mit der siRNA *Bhlhe40_677* führte zu einer signifikanten Reduktion der *Bhlhe40* mRNA-Expression um ca. 40 % (s. Abbildung 18). Diese Reduktion war mit beiden verwendeten qRT-PCR-Primerpaaren annähernd gleich detektierbar.

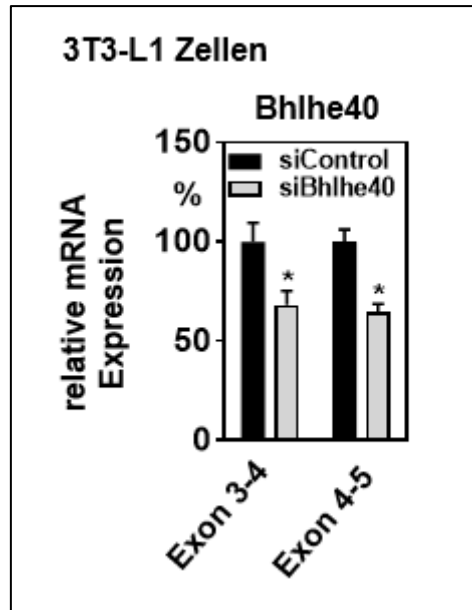


Abbildung 18: *Bhlhe40*-Knockdown in 3T3-L1 Zellen mit siRNA *Bhlhe40_677*.
 Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* 72 Stunden nach Knockdown mittels siRNA *Bhlhe40_677* gemessen mit zwei verschiedenen qRT-PCR-Primerpaaren. (* $p < 0,05$ zu siControl, $n=3$)

Die Elektroporation der Zellen mit der zweiten *Bhlhe40*-spezifischen siRNA (siRNA *Bhlhe40_419*) resultierte - unter Verwendung des qRT-PCR-Primerpaares m*Bhlhe40* exon 3-4 - ebenso in einer signifikanten, ca. 50 %-igen Reduktion der *Bhlhe40* mRNA-Expression. Auch hier war kaum ein Unterschied im Ausmaß der mRNA-Expression zwischen den verschiedenen, verwendeten qRT-PCR-Primerpaaren festzustellen (s. Abbildung 19).



Abbildung 19: *Bhlhe40*-Knockdown in 3T3-L1 Zellen mit siRNA *Bhlhe40_419*.
 Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* 72 Stunden nach Knockdown mittels siRNA *Bhlhe40_677* gemessen mit zwei verschiedenen qRT-PCR-Primerpaaren. (* $p < 0,05$ zu siControl, $n=3$)

Abbildung 20 zeigt den *Bhlhe40*-Knockdown auf Proteinebene. Da die endogene BHLHE40-Proteinexpression mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper nur sehr schwer detektierbar war (s. Abbildung 9, Kapitel 3.1.3.1), wurde *Bhlhe40* zuerst in den Zellen überexprimiert, bevor anschließend der Knockdown mittels Elektroporation erfolgte. Hierfür wurde exemplarisch nur eine der beiden *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs verwendet (siRNA *Bhlhe40_677*).

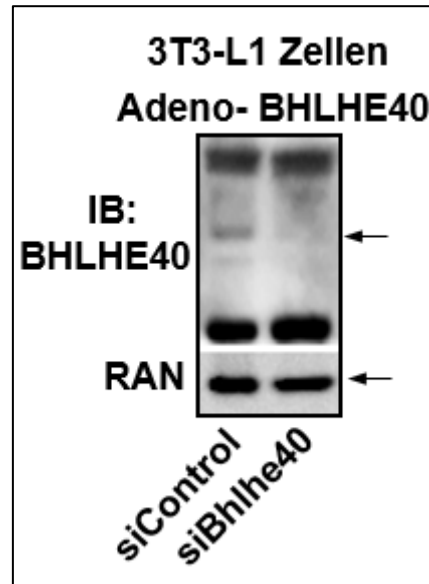


Abbildung 20: Einfluss eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf den Gehalt an BHLHE40-Protein.

Dargestellt ist der relative Gehalt an BHLHE40-Protein in 3T3-L1 Zellen nach Überexpression von *Bhlhe40* mit anschließendem *Bhlhe40*-Knockdown.

3.1.4.2 *Bhlhe40*-Knockdown beeinflusst *Bhlhe41*-Expression nicht signifikant

Nachdem die Überexpression von *Bhlhe40* (s. Kapitel 3.1.3.2) zu einer signifikanten Reduktion der *Bhlhe41*-Expression führte, sollte nun untersucht werden, ob umgekehrt ein *Bhlhe40*-Knockdown eine Steigerung der *Bhlhe41*-Expression bedingt. Dafür wurde die mRNA-Expression von *Bhlhe41* in 3T3-L1 Präadipozyten nach *Bhlhe40*-Knockdown mittels qRT-PCR gemessen. Abbildung 21 zeigt jedoch, dass die Expression von *Bhlhe41* durch den *Bhlhe40*-Knockdown, ebenso wie durch die *Bhlhe40*-Überexpression, vermindert wurde. Im Gegensatz zur Reduktion der *Bhlhe41*-Expression nach *Bhlhe40*-Überexpression (s. Abbildung 12), war die Reduktion der *Bhlhe41*-Expression nach *Bhlhe40*-Knockdown jedoch nicht signifikant.

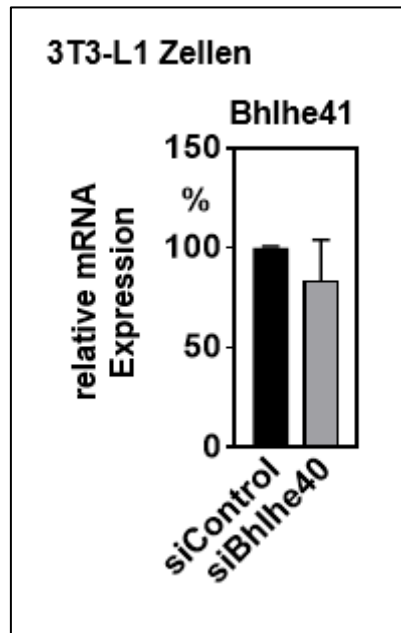


Abbildung 21: Keine signifikante Beeinflussung der *Bhlhe41*-Expression durch *Bhlhe40*-Knockdown.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe41* nach *Bhlhe40*-Knockdown mit siBhlhe40_677, gemessen mittels qRT-PCR. (n=3)

3.1.4.3 *Bhlhe40*-Knockdown beeinflusst *Pparγ*-Expression nicht signifikant

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *Bhlhe40*-Überexpression (s. Kap. 3.1.3.3), beeinflusste auch der *Bhlhe40*-Knockdown die Expression von *Pparγ* – vor Stimulation der 3T3-L1 Zellen mittels Differenzierungsinduktoren – nicht signifikant (s. Abbildung 22). Dies galt sowohl für die Expression von *Pparγ1*, als auch für die Expression von *Pparγ2*.

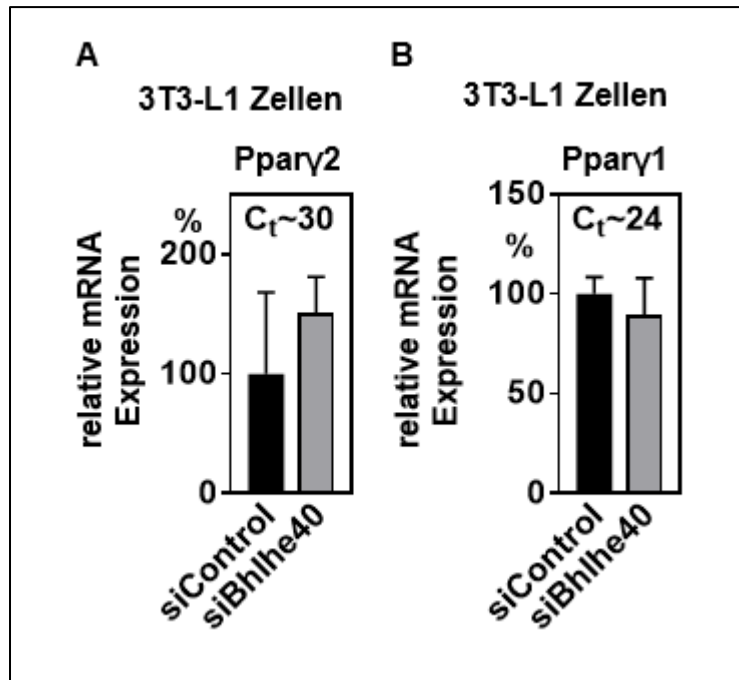


Abbildung 22: Keine signifikante Veränderung der *Pparγ2*- und *Pparγ1*-Expression nach *Bhlhe40*-Knockdown.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Pparγ2* (A) und *Pparγ1* (B) nach *Bhlhe40*-Knockdown (siBhlhe40_677), gemessen mittels qRT-PCR. (n=3) (C_t: threshold cycle)

Aufgrund der geringen Expression in Präadipozyten, gestaltete sich die Messung der mRNA-Expression von *Pparγ2* schwierig. Die vergleichende Betrachtung der C_t-Werte von *Pparγ1* und *Pparγ2* zeigte, dass *Pparγ1* ca. 64-fach stärker in den Präadipozyten exprimiert wurde als *Pparγ2*.

3.1.4.4 *Bhlhe40*-Knockdown fördert die Adipogenese

Abschließend wurde der Einfluss eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Differenzierung von Präadipozyten zu ausgereiften Adipozyten untersucht.

Dafür wurden 3T3-L1 Zellen nach *Bhlhe40*-Knockdown mittels Differenzierungsinduktoren zur Adipogenese stimuliert. Der *Bhlhe40*-Knockdown wurde exemplarisch mit der siRNA Bhlhe40_677 durchgeführt. Als Kontrolle dienten 3T3-L1 Zellen, die vor Stimulation zur Differenzierung mit Kontroll-siRNA elektroporiert wurden.

Die vergleichende Betrachtung beider Gruppen nach Oil-Red O Färbung und die Betrachtung mittels Phasenkontrastmikroskop zeigten, dass die Zellen nach *Bhlhe40*-Knockdown besser differenzierten als die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (s. Abbildung 23). Zu erkennen war dies – im Falle der Oil-Red O Färbung – an der größeren Anzahl Zellen mit rot angefärbten Lipiden. Dieses Ergebnis wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie bestätigt. Hierbei wurden die Lipidtropfen weiß dargestellt.

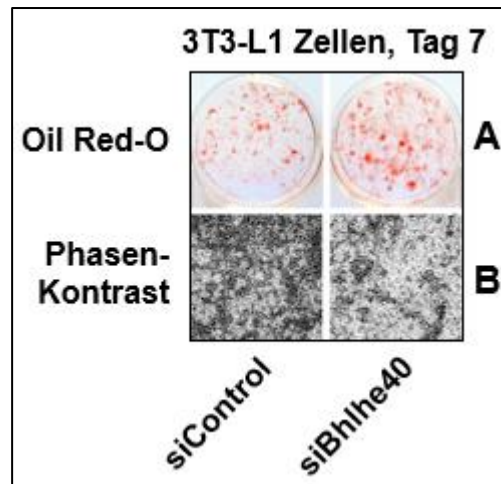


Abbildung 23: *Bhlhe40*-Knockdown fördert die Adipogenese.

Dargestellt sind 3T3-L1 Zellen nach *Bhlhe40*-Knockdown mittels siRNA *Bhlhe40_677* an Tag 7 der Differenzierung. Der Farbstoff Oil-Red-O färbte die Triglyceride in den differenzierten Zellen rot an (A). Unter dem Phasenkontrastmikroskop stellten sich die Fettropfen in den ausdifferenzierten Zellen durchsichtig bis weiß dar (B).

Zusätzlich zur Analyse des makro- und mikroskopischen Erscheinungsbildes der Zellen, wurden außerdem die zuvor validierten Adipozyten-Markergene *Ppar γ 2*, *aP2*, Adiponektin (*Adipoq*) und *C/ebp α* (s. Kapitel 3.1.1) mittels qRT-PCR gemessen.

Hierfür wurden 3T3-L1 Zellen 72 Stunden nach *Bhlhe40*- bzw. Kontroll-Knockdown mittels Differenzierungsinduktoren stimuliert und nach 7- 9 Tagen geerntet. Anschließend wurde die relative Genexpression der Adipozyten-Markergene zwischen *Bhlhe40*-Knockdown Zellen und der Kontrollgruppe verglichen. Dieses Experiment wurde mit beiden *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs (siRNA *Bhlhe40_677* (s. Abbildung 24A) und siRNA *Bhlhe40_419* (s. Abbildung 24B) durchgeführt. Hierbei konnten die Beobachtungen der Oil-Red O Färbung und der Phasenkontrastmikroskopie bestätigt werden, dass ein *Bhlh40*-Knockdown tatsächlich die Adipogenese fördert. Die relative mRNA-Expression der Adipozyten-Markergene *Ppar γ 2*, *aP2* und Adiponektin (*Adipoq*) war nach *Bhlhe40*-spezifischem Knockdown ca. 1,5 – bis 2 – fach erhöht im Vergleich zur Expression in den Kontrollzellen. Diese Unterschiede in der mRNA-Expression waren statistisch signifikant. Allein die gesteigerte relative mRNA-Expression des Adipozyten-Markers *C/ebp α* nach *Bhlhe40*-Knockdown war nicht signifikant verglichen mit der Kontrollgruppe.

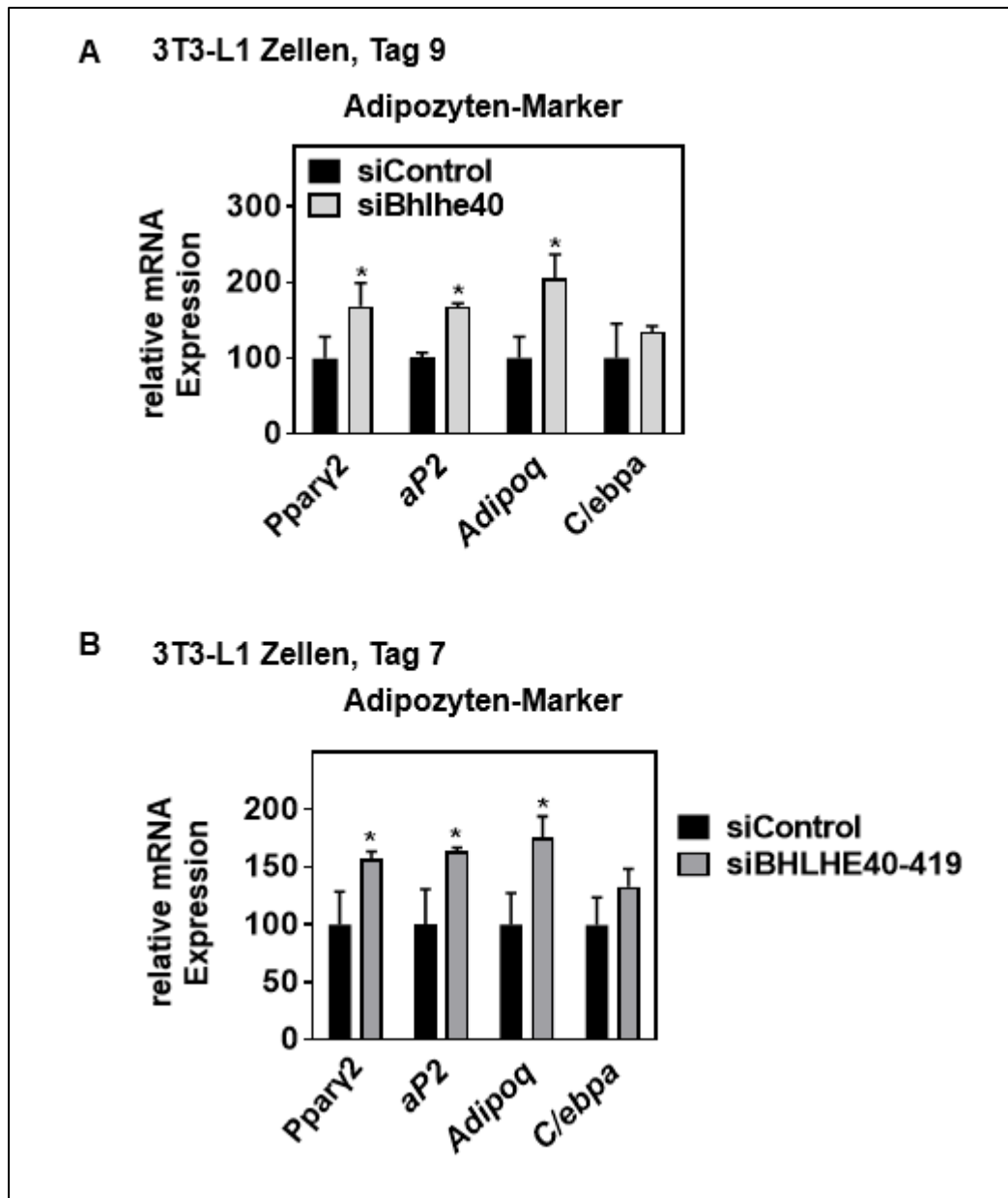


Abbildung 24: *Bhlhe40*-Knockdown fördert die Expression der Adipozyten-Markergene *Pparg2*, *aP2*, *Adipoq* und *C/ebpa*.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Adipozyten-Marker *Pparg2*, *aP2*, Adiponektin (*Adipoq*) und *C/ebpa* 9 bzw. 7 Tage nach *Bhlhe40*-Knockdown mittels siRNA *Bhlhe40_677* (A) oder siRNA *Bhlhe40_419* (B). Die Auswertung der qRT-PCR zeigte, mit Ausnahme von *C/ebpa*, eine signifikante Steigerung in der Expression der Adipozyten-Marker als Antwort auf den *Bhlhe40*-Knockdown. (* $p < 0,05$ zu siControl, $n=3$)

Abschließend wurde die Expression der oben genannten Adipozyten-Marker zusätzlich auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht (s. Abbildung 25).

Dafür wurden 3T3-L1 Zellen mit *Bhlhe40*-spezifischer siRNA bzw. mit Kontroll-siRNA elektroporiert und 72 Stunden später zur Adipogenese stimuliert. Exemplarisch wurde hier die *Bhlhe40*-spezifische siRNA *Bhlhe40_677* verwendet. 7 Tage nach Stimulation durch die Differenzierungsinduktoren wurden sowohl das Zellmedium, als auch die Zellen zur Proteingewinnung geerntet.

Auch hier zeigte sich eine Erhöhung der Adipozyten-Marker PPAR γ , C/EBP α und aP2 im Zellprotein der *Bhlhe40*-Knockdown Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe. Ebenso konnte der Adipozyten-Marker Adiponektin (ADIPOQ), ein Peptidhormon, das von Fettzellen sezerniert wird, vermehrt im Medium der *Bhlhe40*-Knockdown Zellen nachgewiesen werden.

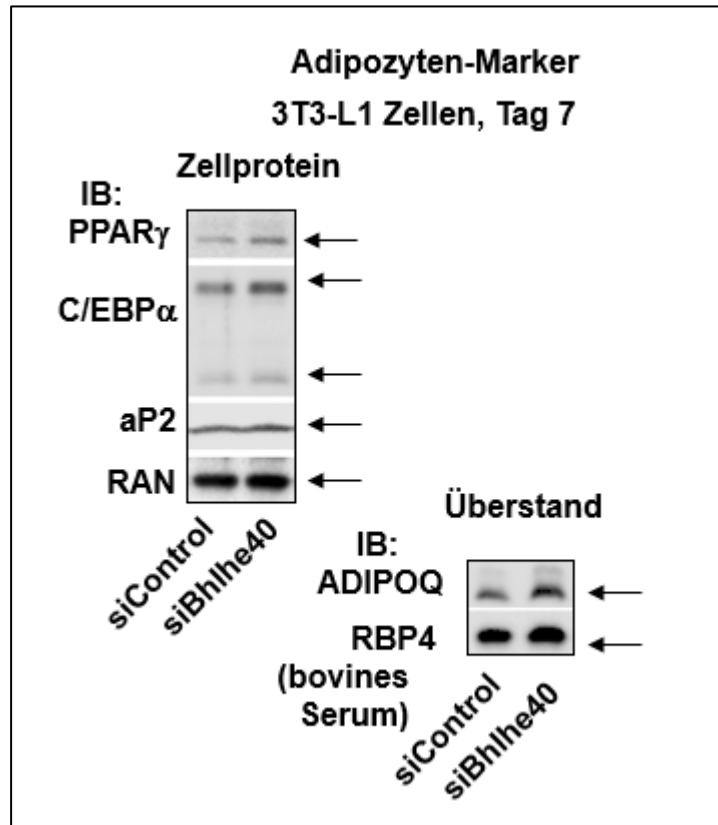


Abbildung 25: *Bhlhe40*-Knockdown fördert die Expression der Adipozyten-Markerproteine PPAR γ , aP2, Adiponektin und C/EBP α .

Die Darstellung der Markerproteine mittels Western Blot zeigt eine Zunahme der Proteinmenge nach Elektroporation der 3T3-L1 Zellen mit siRNA *Bhlhe40*_677 7 Tage nach Beginn der Differenzierung.

3.2 Die Rolle von BHLHE40 im Leberstoffwechsel

Basierend auf dieser Arbeit vorausgehenden Experimenten von Linda van den Berg (s. Kapitel 1.4.1) sollte nun im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss von BHLHE40 auf einige ausgewählte PPAR α - beziehungsweise ChREBP-Zielgene in der Leber genauer untersucht werden.

3.2.1 Expression von *Bhlhe40* in der Leber

BHLHE40 wird in einer Vielzahl von Zellen und Geweben in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Abbildung 26 zeigt bisher unveröffentlichte mRNA-Expressionsdaten der AG Schupp aus einer RNA-Sequenzanalyse verschiedener Gewebe männlicher C57BL/6J Mäuse. Der Datensatz wurde im *Gene Expression Omnibus* unter der Zugriffsnummer GSE120722 hinterlegt. Die Daten zeigen, dass *Bhlhe40* sowohl in Fett- als auch in Lebergewebe stark exprimiert wird.

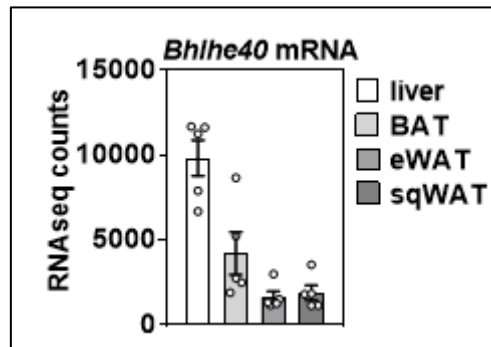


Abbildung 26: *Bhlhe40* mRNA-Expression in Leber- und Fettgewebe von männlichen C57BL/6J Mäusen.

Dargestellt ist die Zahl der *Bhlhe40* mRNA-Sequenzwiederholungen für Lebergewebe (liver), braunes Fettgewebe (BAT), epididymales weißes Fettgewebe (eWAT) und subkutanes weißes Fettgewebe (sqWAT). Die Abbildung wurde aus Expressionsdaten des *Gene Expression Omnibus* angefertigt (GEO 120722). (n=5) (BAT: brown adipose tissue, eWAT: epididymal white adipose tissue, sqWAT: subcutaneous white adipose tissue)

Die Leber spielt eine essentielle Rolle in der Regulation des Energiestoffwechsels. Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, inwiefern die Fütterung bzw. Futterentzug die Expression von *Bhlhe40* in der Leber beeinflussen (s. Abbildung 27).

Mittels Western Blot wurde hierfür die Menge an BHLHE40-Protein in Leberproben von gefütterten und 24 Stunden gefasteten C57BL/6J Mäusen (n = 5) verglichen. Als Ladekontrolle diente GAPDH, eine weitere Kontrolle stellte das Protein Retinol Saturase (RETSAT) dar, von welchem bekannt ist, dass es durch Nahrungsentzug hochreguliert wird (Sun, Ng et al. 2008). Der Western Blot zeigte, dass BHLHE40 unter Nahrungsentzug herunterreguliert wird und sich damit genau umgekehrt verhält, wie RETSAT (s. Abbildung 27A).

In einem zweiten Experiment wurde die relative Menge an BHLHE40-Protein in der Leber von 24 Stunden gefasteten und anschließend für 24 Stunden erneut gefütterten C57BL/6J Mäusen (n = 5) verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an BHLHE40-Protein durch eine erneute Fütterung wieder hochreguliert wird (s. Abbildung 27B).

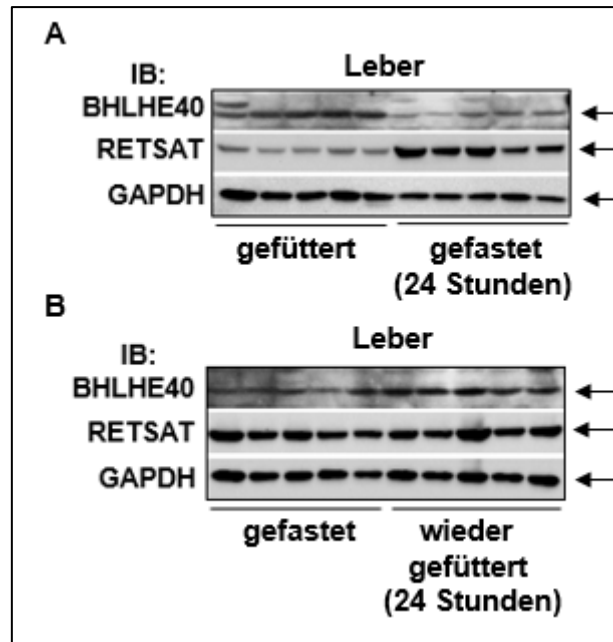


Abbildung 27: Menge an BHLHE40-Protein in der Leber in Abhängigkeit von dem Ernährungsstatus.
Mittels Western Blot wurde die Menge an BHLHE40-Protein in der Leber von gefütterten und gefasteten Mäusen (A) bzw. gefasteten und erneut gefütterten Mäusen (B) verglichen. Parallel wurde das Protein RETSAT gezeigt, welches durch Nahrungsentzug hochreguliert wird. (n=5)

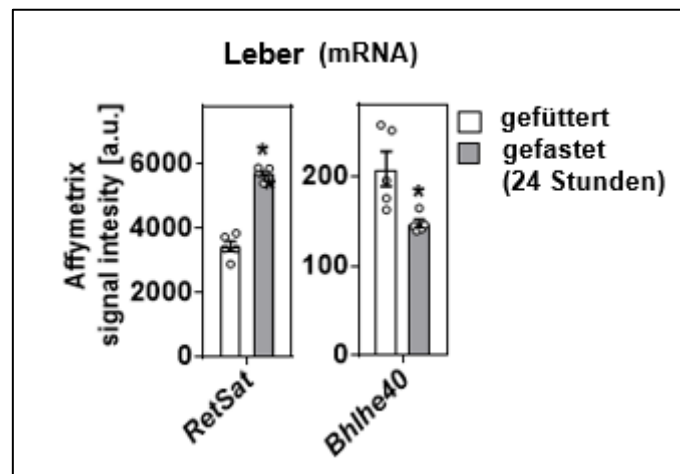


Abbildung 28: *Bhlhe40* mRNA-Expression in der Leber in Abhängigkeit von dem Ernährungsstatus.
Dargestellt sind Microarray-Daten der relativen mRNA-Expression von *Bhlhe40* und *RetSat* in der Leber von männlichen C57BL/6J Mäusen. 24-stündiger Nahrungsentzug führte zu einer signifikanten Reduktion der *Bhlhe40*-Expression bzw. einem signifikanten Anstieg der *RetSat*-Expression. (* $p < 0,05$ zu gefüttert, n=5)

Daten von männlichen C57BL/6J Mäusen aus einem früheren *Fasting*-Experiment (Schupp, Chen et al. 2013) zeigten diese Herunterregulation von *Bhlhe40* unter Nahrungsentzug auch auf mRNA-Ebene (s. Abbildung 28). Zum Vergleich wurde *RetSat* gezeigt, das durch Nahrungsentzug hochreguliert wird (s. Abbildungen 28).

3.2.2 Expression von *Bhlhe40* in primären murinen Hepatozyten

Als nächstes sollte die Expression von *Bhlhe40* in primären murinen Hepatozyten untersucht werden. Die primären Hepatozyten wurden hierfür aus der Leber von männlichen C57BL/6J Mäusen isoliert und anschließend in Kultur gebracht.

Im Anschluss daran wurde entweder ein *Bhlhe40*-Knockdown durchgeführt oder *Bhlhe40* mittels Adenoviren überexprimiert.

3.2.2.1 Validierung der *Bhlhe40* Überexpression in primären Hepatozyten

Die *Bhlhe40*-Überexpression erfolgte mittels adenoviralem Gentransfer. Als Kontrolle dienten GFP-exprimierende Adenoviren. Ebenso wie die 3T3-L1 Zellen (s. Kapitel 3.1.3.1) wurden auch die primären Hepatozyten mit steigenden Adeno-BHLHE40-Viruskonzentrationen infiziert, um die optimale Konzentration für die vorgesehenen Experimente zu ermitteln. Gleichzeitig wurden die Zellen in absteigender Konzentration mit Adeno-GFP-Viren infiziert, so dass die Gesamtvirusmenge für jede Bedingung gleich war. Die einzelnen Viruskonzentrationen für jede Bedingung sind schematisch in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40: Validierung der *Bhlhe40*-Überexpression in primäre Hepatozyten - Schema der verwendeten Adeno-BHLHE40- und Adeno-GFP-Konzentrationen

Virus	pfu/ml					
	Adeno-GFP	$9,6 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	$8,4 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$
Adeno-BHLHE40	—	$0,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$

Die erste Bande repräsentierte die Menge an endogenem BHLHE40-Protein (Infektion ausschließlich mit Adeno-GFP).

Basierend auf den Ergebnissen im Western Blot (s. Abbildung 29) und unter Beachtung der Zelltoxizität, wurde die zweit höchste Adeno-BHLHE40-Konzentration von $4,8 \times 10^5$ pfu/ml für die nachfolgenden Experimente (s Kapitel 3.2.2.2, Kapitel 3.2.3.2 und Kapitel 3.2.4.2) ausgewählt. Diese führte zu einer Infektion von ca. 90 % der Zellen (s. Abbildung 30).

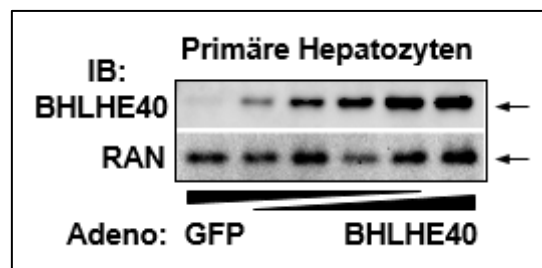


Abbildung 29: Dosisverlauf BHLHE40-Überexpression in primären Hepatozyten.

Dargestellt mittels Western Blot, ist die Menge an BHLHE40-Protein in Abhängigkeit von der verwendeten Virusdosis.

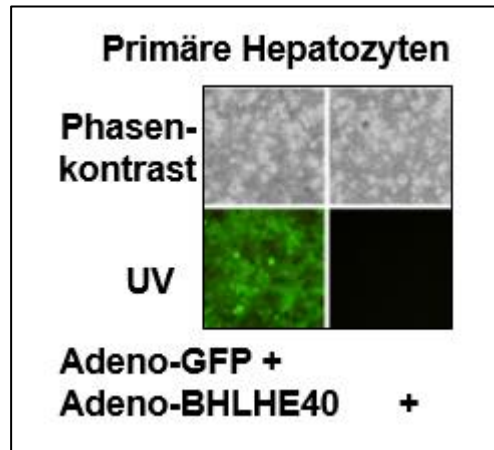


Abbildung 30: Infektion primärer Hepatozyten mit Adenoviren.

Die verwendete Virusdosis von $4,8 \times 10^5$ pfu/ml führte zu einer Infektion von ca. 90 % der Zellen. Die infizierten GFP-Kontrollzellen stellten sich dabei unter UV-Licht grün fluoreszierend dar.

Um die *Bhlhe40*-Überexpression in primären Hepatozyten auch auf mRNA-Ebene zu validieren, wurde als nächstes die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* mittels qRT-PCR gemessen. Die Auswertung der qRT-PCR ergab eine signifikante, ca. 10-fache Überexpression von *Bhlhe40* in Reaktion auf die Virusinfektion (s. Abbildung 31).

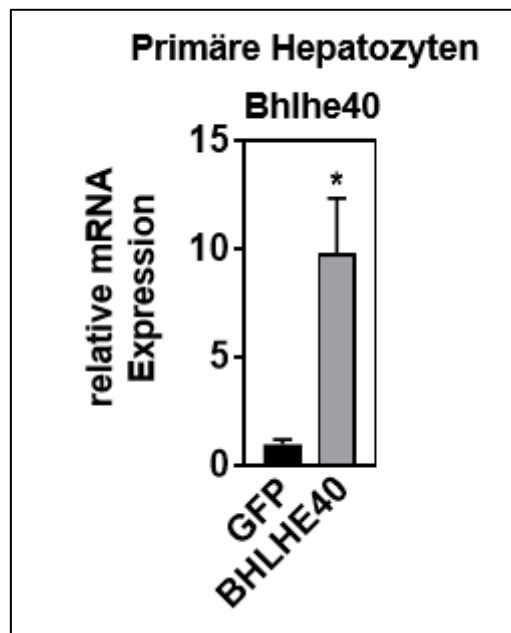


Abbildung 31: Überexpression von *Bhlhe40* in primären murinen Hepatozyten.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* mittels qRT-PCR. Die verwendete Viruskonzentration von $4,8 \times 10^5$ pfu/ml führte zu einer ca. 10-fachen Überexpression von *Bhlhe40*. (* $p < 0,05$ zu GFP, $n = 3$)

3.2.2.2 *Bhlhe40*-Überexpression mindert die Expression von *Bhlhe41*

Nachdem sich für 3T3-L1 Zellen gezeigt hatte, dass eine *Bhlhe40*-Überexpression die Expression von *Bhlhe41* signifikant mindert (s. Kapitel 3.1.3.2), sollte nun untersucht werden, ob dies auch für primäre Hepatozyten gilt.

Dafür wurde die mRNA-Expression von *Bhlhe41* nach *Bhlhe40*-Überexpression mittels qRT-PCR gemessen. Wie bereits zuvor in 3T3-L1 Zellen festgestellt, zeigte sich auch in primären Hepatozyten eine signifikante Minderung der relativen mRNA-Expression von *Bhlhe41* als Konsequenz der *Bhlhe40*-Überexpression (s. Abbildung 32).

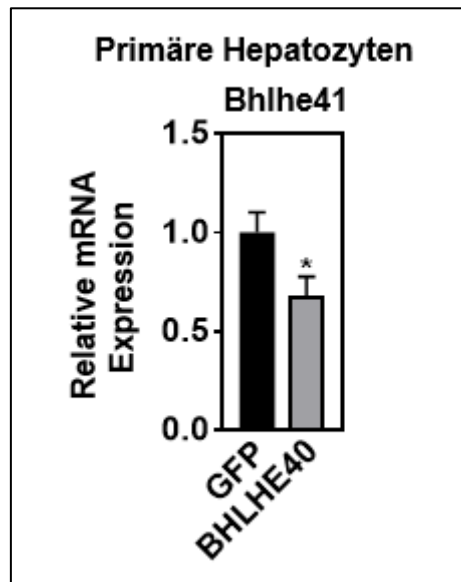


Abbildung 32: Expression von *Bhlhe41* in primären murinen Hepatozyten nach *Bhlhe40*-Überexpression.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe41* mittels qRT-PCR. Es zeigte sich eine signifikante Minderung der *Bhlhe41*-Expression in Reaktion auf die *Bhlhe40*-Überexpression. (* $p < 0,05$ zu GFP, $n=3$)

3.2.2.3 Validierung des *Bhlhe40*-Knockdowns in primären Hepatozyten

Der *Bhlhe40*-Knockdown erfolgte durch Transfektion mit zwei verschiedenen, *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs: siRNA *Bhlhe40_677* und siRNA *Bhlhe40_419*. Die Kontrollzellen wurden mit Kontroll-siRNA transfiziert.

Für die Validierung des *Bhlhe40*-Knockdowns wurden die Zellen 4 Stunden nach dem Aussäen auf 12-Well Platten über Nacht mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und 72 Stunden nach Transfektion geerntet. Mittels qRT-PCR wurde anschließend die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* bestimmt.

Die Auswertung der qRT-PCR-Daten zeigte, dass es in Reaktion auf die Transfektion zu einem *Bhlhe40*-Knockdown von ca. 60 % (siRNA *Bhlhe40_677*) bis 80 % (siRNA *Bhlhe40_419*) kommt (s. Abbildung 33).

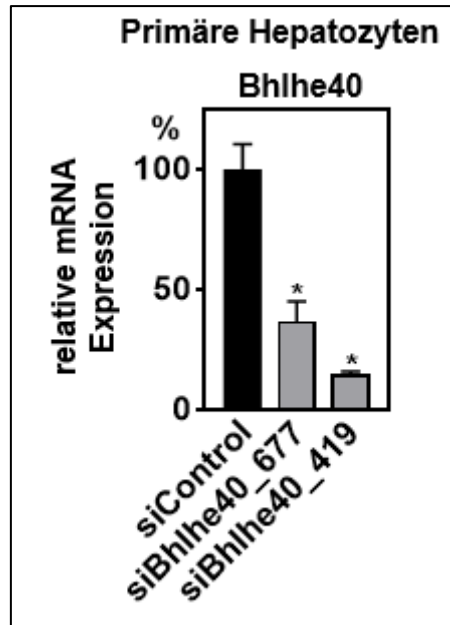


Abbildung 33: *Bhlhe40*-Knockdown in primären murinen Hepatozyten.

Dargestellt ist die relative *Bhlhe40* mRNA-Expression nach Transkription mit zwei verschiedenen, *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs. Die Messung mittels qRT-PCR zeigte eine ca. 60 %-ige (siBhlhe40_677) bis 80 %-ige (siBhlhe40_419) Reduktion der *Bhlhe40* Expression. (* $p < 0,05$ zu siControl, $n=3$)

Abbildung 34 zeigt den *Bhlhe40*-Knockdown in primären murinen Hepatozyten auf Proteinebene mittels Western Blot. Im Gegensatz zu dem *Bhlhe40*-Knockdown in 3T3-L1 Zellen (s. Kapitel 3.1.4.1), waren sowohl die Menge an endogenem BHLHE40 Protein in den Kontrollzellen (Adeno-GFP, siControl), als auch die Menge an BHLHE40 Protein nach *Bhlhe40*-Knockdown (siBhlhe40_677, siBhlhe40_419) mit dem verwendeten Antikörper ohne vorherige *Bhlhe40*-Überexpression zu detektieren. Zur besseren Identifizierung der BHLHE40-Bande wurde, neben den Proben des *Bhlhe40*-Knockdown, auch die Probe einer *Bhlhe40*-Überexpression (Adeno-BHLHE40) aufgetragen. RAN diente als Ladekontrolle.

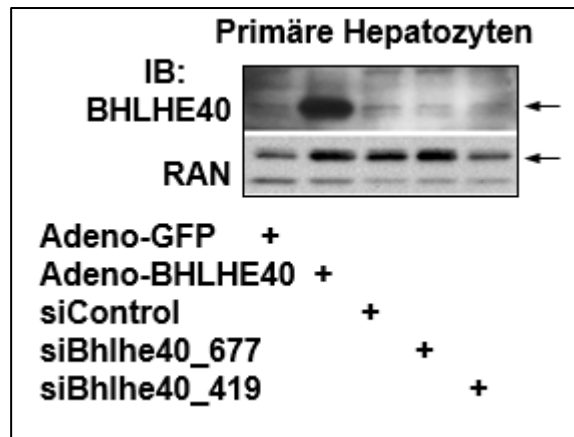


Abbildung 34: *Bhlhe40*-Knockdown in primären murinen Hepatozyten auf Proteinebene.

Dargestellt ist die Menge an endogenem BHLHE40-Protein (Adeno-GFP, siControl) bzw. die Menge an BHLHE40-Protein nach *Bhlhe40*-Knockdown (siBhlhe40_677, siBhlhe40_419) mittels Western Blot. RAN dient als Ladekontrolle.

3.2.2.4 *Bhlhe40*-Knockdown steigert die Expression von *Bhlhe41*

Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass die Expression von *Bhlhe41* in primären murinen Hepatozyten signifikant durch die Überexpression von *Bhlhe40* beeinflusst wird (s. Kapitel 3.2.2.2). Vor diesem Hintergrund sollte nun untersucht werden, ob der *Bhlhe40*-Knockdown ebenso Auswirkungen auf die Expression von *Bhlhe41* hat.

Dafür wurde die mRNA-Expression von *Bhlhe41* nach *Bhlhe40*-Knockdown mittels qRT-PCR gemessen.

Die Untersuchungen in 3T3-L1 Zellen zeigten keine signifikante Beeinflussung der *Bhlhe41*-Expression durch den *Bhlhe40*-Knockdown (s. Kapitel 3.1.4.2). Im Gegensatz dazu resultierte der *Bhlhe40*-Knockdown in primären murinen Hepatozyten in einer signifikanten Steigerung der Expression von *Bhlhe41* um ca. 110 % (siBhlhe40_677) bis 130 % (siBhlhe40_419) (s. Abbildung 35). Diese kompensatorische Steigerung der *Bhlhe41*-Expression durch *Bhlhe40*-Knockdown wurde von einer anderen Gruppe auch in der Leber von *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen beobachtet (Noshiro, Kawamoto et al. 2018).

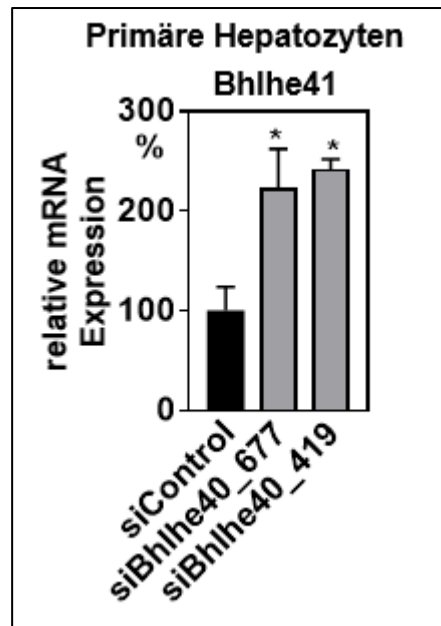


Abbildung 35: Expression von *Bhlhe41* in primären murinen Hepatozyten nach *Bhlhe40*-Knockdown.

Dargestellt mittels qRT-PCR ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe41* nach Transfektion mit zwei verschiedenen, *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs (siBhlhe40_677 und _419). (* $p < 0,05$ zu siControl, $n = 3$)

3.2.3 Einfluss von BHLHE40 auf PPAR α -Zielgene

PPAR α ist ein nukleärer Rezeptor, der stark in der Leber exprimiert wird und eine essentielle Rolle im Fettstoffwechsel und der zellulären Antwort auf Nahrungsentzug spielt (Leone, Weinheimer et al. 1999).

In Voruntersuchungen (Linda van den Berg) wurden RNA-Sequenzierungsdaten erhoben (s. Kapitel 1.4.1), welche Hinweise lieferten, dass ein *Bhlhe40*-Knockdown die Expression von Genen bestimmter Stoffwechselwege in der Leber beeinflusst. PPAR α und seine Zielgene waren einer dieser Stoffwechselwege.

Nachdem in der Literatur bisher wenig über eine Interaktion von BHLHE40 und PPAR α bekannt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden, ob und inwiefern sich ein *Bhlhe40*-Knockdown bzw. eine *Bhlhe40*-Überexpression auf PPAR α -Zielgene auswirken.

3.2.3.1 Auswirkungen eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von PPAR α -Zielgenen

Für das *Bhlhe40*-Knockdown-Experiment wurden primäre Hepatozyten aus der Leber von männlichen C57BL/6J Mäusen isoliert. Vier Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen über Nacht entweder mit 1 nmol *Bhlhe40*-spezifischer siRNA (siBhlhe40_419) oder mit 1 nmol Kontroll-siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit Zellmedium (DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S) behandelt, welches entweder den PPAR α -Agonist WY-14643 (50 μ M pro Well) oder DMSO als Kontrolle enthielt und anschließend geerntet.

Abbildung 36 zeigt, dass die Transfektion mit siBhlhe40_419 zu einer Reduktion der *Bhlhe40* mRNA-Expression um ca. 75 % führte. Des Weiteren wurde deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit PPAR α -Agonist WY-14643 keinen Einfluss auf die *Bhlhe40* mRNA-Expression hatte.

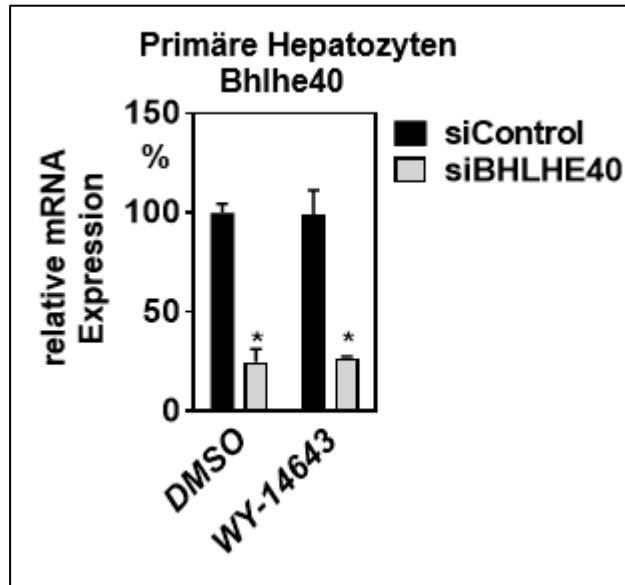


Abbildung 36: *Bhlhe40*-Knockdown in primären murinen Hepatozyten und anschließende Behandlung der Zellen mit PPAR α -Agonist WY-14643.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Bhlhe40* nach Transfektion mit siBhlhe40_419 und Behandlung der Zellen mit 50 μ M WY-14643. Die Auswertung der qRT-PCR-Daten zeigte eine ca. 75%ige Reduktion der *Bhlhe40*-Expression als Antwort auf den *Bhlhe40*-Knockdown. Die *Bhlhe40*-Expression wurde durch WY-14643 nicht induziert. (* $p < 0,05$ zu siControl, $n=3$)

Um mögliche Auswirkungen des *Bhlhe40*-Knockdowns auf PPAR α -Zielgene zu untersuchen, wurde mittels qRT-PCR exemplarisch die Expression von vier PPAR α -Zielgenen gemessen, die laut der RNA-Sequenzierungsdaten durch den *Bhlhe40*-Knockdown beeinflusst wurden. Zu diesen Zielgenen zählten *Fatty acid-binding protein 1 (Fabp1)*, *Angiopoietin-like 4 (Angptl4)*, *Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4)* und *Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase-2 (Hmgcs2)*. Abbildung 37 zeigt die Auswertung der qRT-PCR-Daten für die vier oben genannten Gene, gemessen nach *Bhlhe40*-Knockdown und Behandlung der Zellen mit PPAR α -Agonist WY-14643 (50 μ M pro Well) oder DMSO als Kontrolle. Es lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen (s. Abbildung 37):

Die relative mRNA-Expression aller gemessenen PPAR α -Zielgene, mit Ausnahme von *Pdk4*, wurde durch den *Bhlhe40*-Knockdown signifikant reduziert.

Die Behandlung der Zellen mit dem PPAR α -Agonist WY-14643 erhöhte die relative mRNA-Expression aller gemessenen PPAR α -Zielgene signifikant. Dieser Effekt war in den Kontrollzellen (siControl) und, mit Ausnahme von *Fabp1*, auch in den *Bhlhe40*-Knockdown Zellen (siBHLHE40) festzustellen.

Die Stimulation der Genexpression der gemessenen PPAR α -Zielgene durch den PPAR α -Agonist WY-14643 war in *Bhlhe40*-Knockdown Zellen signifikant schwächer als in den Kontrollzellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass BHLHE40 nötig ist für die volle Stimulation der Expression von PPAR α -Zielgenen.

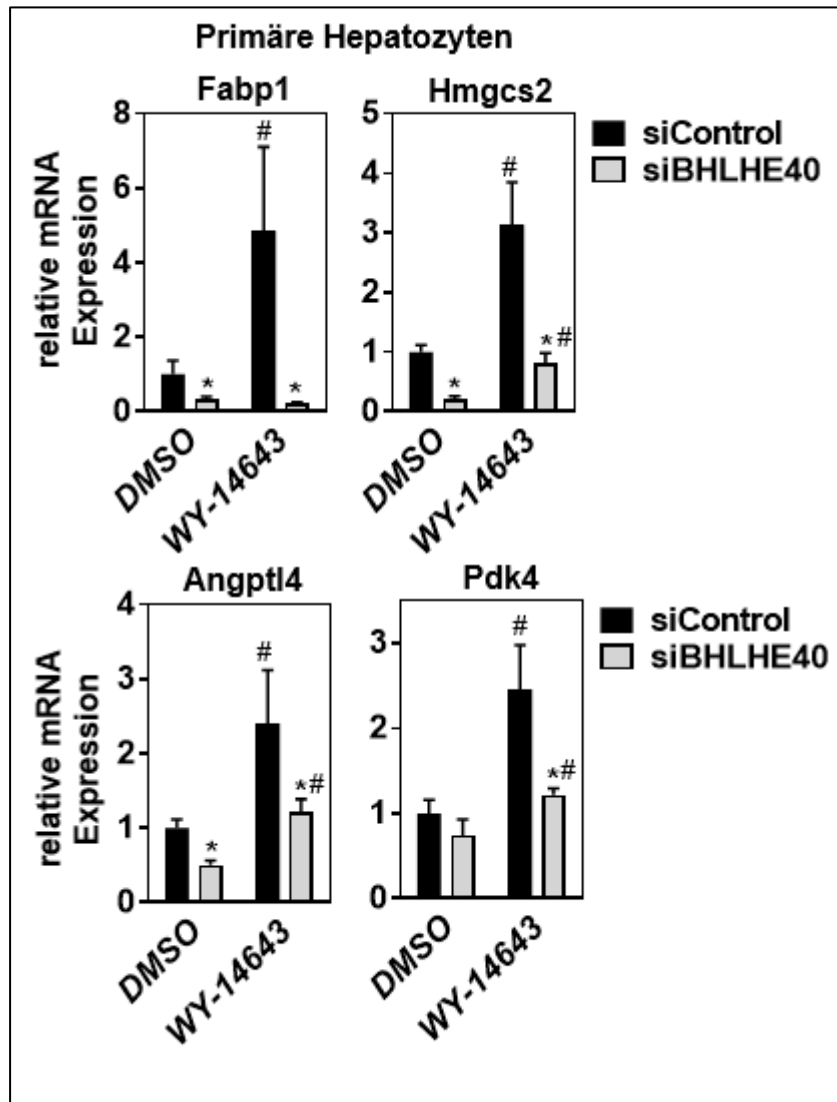


Abbildung 37: Expression von PPAR α -Zielgenen nach *Bhlhe40*-Knockdown und Behandlung der Zellen mit 50 μ M des PPAR α -Agonisten WY-14643.

Dargestellt mittels qRT-PCR ist die relative mRNA-Expression der PPAR α -Zielgene *Fabp1*, *Hmgcs2*, *Angptl4* und *Pdk4*. (* $p < 0,05$ zu siControl, # $p < 0,05$ zu DMSO, $n=3$)

3.2.3.2 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Aktivierung von PPAR α -Zielgenen

Im nächsten Experiment sollte nun untersucht werden, ob sich eine *Bhlhe40*-Überexpression ebenfalls auf die Aktivierung von PPAR α -Zielgenen auswirkt.

Dafür wurden die primären murinen Hepatozyten vier Stunden nach ihrer Isolierung über Nacht mit $4,8 \times 10^5$ pfu/ml *Bhlhe40*- bzw. GFP-exprimierenden Adenoviren infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit Medium (DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S) behandelt, das entweder den PPAR α -Agonist WY-14643 (50 μ M pro Well) oder DMSO als Kontrolle enthielt, bevor sie schließlich geerntet wurden.

In Reaktion auf die adenovirale Infektion stieg die mRNA-Expression von *Bhlhe40* in den mit DMSO behandelten Zellen um das ca. 10-fache an (s. Abbildung 38). In den mit PPAR α -Agonist WY-14643 behandelten Zellen war die mRNA-Expression von *Bhlhe40* sogar um das ca. 20-fache gesteigert (s. Abbildung 38). Der Unterschied in der Expression von *Bhlhe40*

Ergebnisse

unter Behandlung der Zellen mit WY-14643 bzw. DMSO war nicht signifikant (s. Abbildung 38).

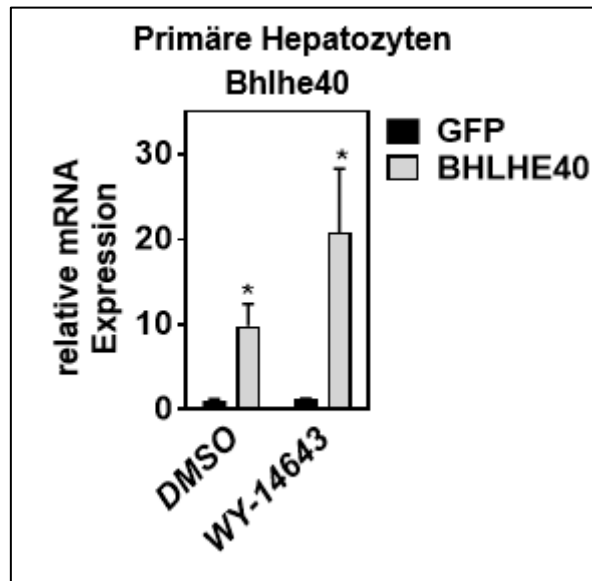


Abbildung 38: *Bhlhe40*-Überexpression in primären murinen Hepatozyten und anschließende Behandlung der Zellen mit PPAR α -Agonist WY-14643.

Dargestellt mittels qRT-PCR ist die relative *Bhlhe40* mRNA-Expression nach adenoviraler *Bhlhe40*-Überexpression und Behandlung der Zellen mit WY-14643 (50 μ M pro Well). In den mit DMSO behandelten Zellen zeigte sich ein ca. 10-facher Anstieg der *Bhlhe40*-Expression, in den mit WY-14643 inkubierten Zellen stieg die *Bhlhe40*-Expression um das ca. 20-fache. (* $p < 0,05$ zu GFP, $n=3$)

Um zu untersuchen, ob sich eine *Bhlhe40*-Überexpression ebenfalls auf die Aktivierung von PPAR α -Zielgenen auswirkt, wurden dieselben PPAR α -Zielgene gemessen, wie für das *Bhlhe40*-Knockdown-Experiment (s. Kapitel 3.2.3.1): *Fabp1*, *Hmgcs2*, *Angptl4* und *Pdk4*. Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR-Auswertung.

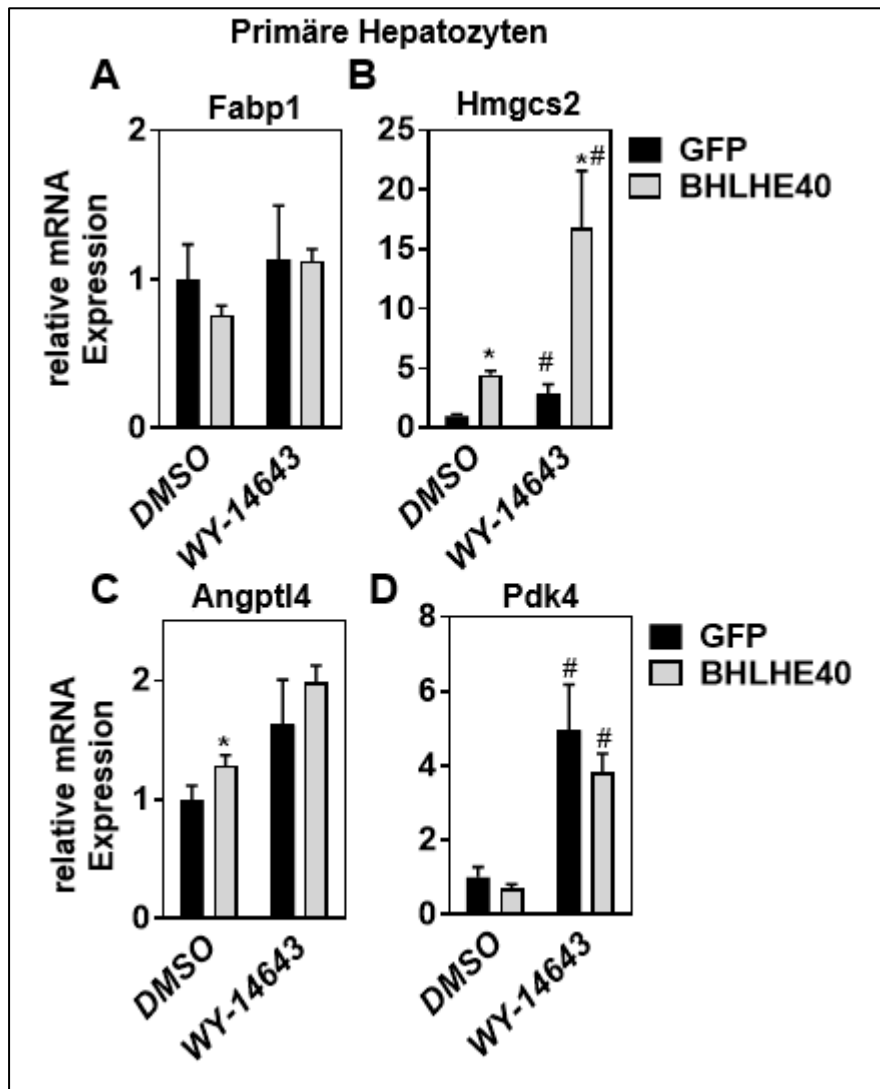


Abbildung 39: Expression von PPAR α -Zielgenen nach *Bhlhe40*-Überexpression und Behandlung der Zellen mit 50 μ M PPAR α -Agonist WY-14643.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der PPAR α -Zielgene *Fabp1* (A), *Hmgcs2* (B), *Angptl4* (C) und *Pdk4* (D) mittels qRT-PCR. (* $p < 0,05$ zu GFP, # $p < 0,05$ zu DMSO, $n=3$)

Betrachtet man die mRNA-Expression von *Fabp1*, ist festzustellen, dass weder die Überexpression von *Bhlhe40*, noch die Behandlung mit 50 μ M PPAR α -Agonist WY-14643 zu einem signifikanten Unterschied, verglichen mit den Kontrollzellen, führten.

Im Fall von *Hmgcs2* wiederum, zeigte sich eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression in Reaktion auf die *Bhlhe40*-Überexpression in den mit 50 μ M WY-14643 behandelten und in den mit DMSO behandelten Zellen. In den GFP-Kontrollzellen zeigte sich eine ebenfalls signifikante Steigerung der mRNA-Expression als Antwort auf die Stimulation durch PPAR α -Agonist WY-14643. Die möglicherweise interessanteste Erkenntnis ist jedoch, dass nach Behandlung mit PPAR α -Agonist WY-14643 eine signifikant stärkere Stimulation der *Hmgcs2*-Expression in den Zellen stattfand, in welchen *Bhlhe40* zuvor überexprimiert wurde.

Während sich die *Angptl4*-Expression in den mit DMSO behandelten Zellen in Reaktion auf die *Bhlhe40*-Überexpression ebenfalls signifikant erhöhte, führte die Behandlung mit WY-14643 zu keinem signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression von *Angptl4* zwischen *Bhlhe40*-überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen.

Die mRNA-Expression von *Pdk4* wurde durch die *Bhlhe40*-Überexpression nicht signifikant beeinflusst. PPAR α -Agonist WY-14643 führte zwar zu einer signifikanten Erhöhung der *Pdk4*-

mRNA-Expression, allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den *Bhlhe40*-überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen in der Reaktion auf die Behandlung mit WY-14643.

3.2.4 Einfluss von BHLHE40 auf ChREBP-Zielgene

ChREBP ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Glukose aktiviert wird und maßgeblich an der Regulation der Lipidsynthese und des Kohlenhydratstoffwechsels in der Leber beteiligt ist (Yamashita, Takenoshita et al. 2001, Iizuka und Horikawa 2008).

Bhlhe40 ist eines von vielen ChREBP-Zielgenen (Witte, Muenzner et al. 2015). In früheren Studien wurde eine Interaktion von ChREBP und BHLHE40 in Form eines negativen Feedback-Mechanismus zwischen ChREBP und BHLHE40 postuliert (Iizuka und Horikawa 2008).

Die RNA-Sequenzierungsdaten aus dem Vorversuch (Linda van den Berg) lieferten Hinweise auf einen Einfluss von BHLHE40 auf die Aktivierung von ChREBP-Zielgenen. Auf Grundlage dieser Daten wurden das *Thioredoxin interacting protein (Txnip)* und der *Regulator of G protein signaling 16 (Rgs16)*, beides ChREBP-Zielgene, exemplarisch ausgewählt, um die Auswirkungen eines *Bhlhe40*-Knockdowns bzw. einer *Bhlhe40*-Überexpression auf ChREBP-Zielgene genauer zu untersuchen.

3.2.4.1 Auswirkungen eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von ChREBP-Zielgenen

Für die Untersuchung des Einflusses eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die ChREBP-Zielgene *Txnip* und *Rgs16*, wurden primäre Hepatozyten aus der Leber von männlichen C57BL/6J Mäusen isoliert und die Zellen anschließend über Nacht (16 Stunden) entweder mit *Bhlhe40*-spezifischer siRNA (si*Bhlhe40*) oder mit Kontroll-siRNA (siControl) transfiziert. Im Anschluss daran wurden alle Zellen für 26 Stunden einem Zellkulturmedium (DMEM) mit einer niedrigen Glukosekonzentration (2,5 mM) ausgesetzt. Danach wurden die Zellen weitere 24 Stunden entweder weiterhin mit der niedrigen Glukosekonzentration inkubiert oder einer hohen Glukosekonzentration (27,5 mM) ausgesetzt. Schließlich wurden die Zellen geerntet und die RNA sequenziert (s. Kapitel 1.4.1).

Betrachtet man die Expression von *Txnip*, ist festzustellen, dass sich kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den *Bhlhe40*-Knockdown-Zellen und den Kontrollzellen zeigte, wenn den Zellen Medium mit einer nur geringen Glukosekonzentration (2,5 mM) zur Verfügung stand (s. Abbildung 40). Stand den Zellen allerdings ein Kulturmedium mit einer hohen Glukosekonzentration (27,5 mM) zur Verfügung, war nicht nur die *Txnip*-Expression insgesamt signifikant gesteigert, sondern der *Bhlhe40*-Knockdown führte zusätzlich zu einer signifikant niedrigeren Expression von *Txnip* verglichen mit den Kontrollzellen (s. Abbildung 40).

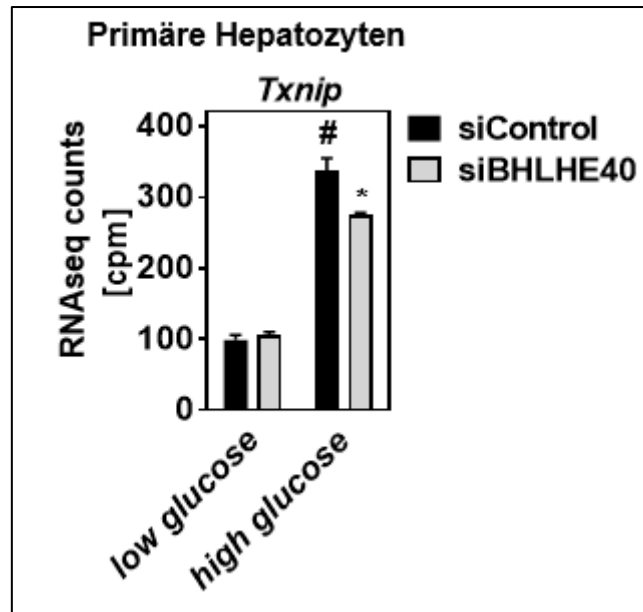


Abbildung 40: Expression von ChREBP-Zielgen *Txnip* nach *Bhlhe40*-Knockdown.

Dargestellt sind die RNA-Sequenzwiederholungen von *Txnip* nach Transfektion mit *Bhlhe40*-spezifischer siRNA, gemessen mittels RNA-Sequenzierung unter zwei verschiedenen Bedingungen. Bei Behandlung der Zellen mit einer geringen Glukosekonzentration (2,5 mM) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der *Txnip*-Expression von *Bhlhe40*-Knockdown-Zellen und Kontrollzellen. Unter einer hohen Glukosekonzentration (27,5 mM) war zum einen die Expression von *Txnip* insgesamt signifikant gesteigert, zum andern wurde *Txnip* in den *Bhlhe40*-Knockdown-Zellen signifikant niedriger exprimiert als in den Kontrollzellen. (cpm: counts per million) (* $p < 0,05$ zu siControl, # $p < 0,05$ zu low glucose, $n=3$)

Abbildung 41 zeigt die Expression von *Rgs16* nach *Bhlhe40*-Knockdown und Stimulation der Zellen mit einer geringen (2,5 mM) oder hohen (27,5 mM) Glukosekonzentration. Im Gegensatz zu *Txnip*, bestand bereits bei geringer Glukosekonzentration (2,5 mM) eine signifikant niedrigere Expression von *Rgs16* nach *Bhlhe40*-Knockdown im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dasselbe galt für die Behandlung der Zellen mit einer hohen Glukosekonzentration (27,5 mM). Auch hier war *Rgs16* nach *Bhlhe40*-Knockdown signifikant niedriger exprimiert. Wie auch im Fall von *Txnip*, war die *Rgs16*-Expression in den Kontrollzellen unter hoher Glukosekonzentration (27,5 mM) insgesamt signifikant gesteigert.

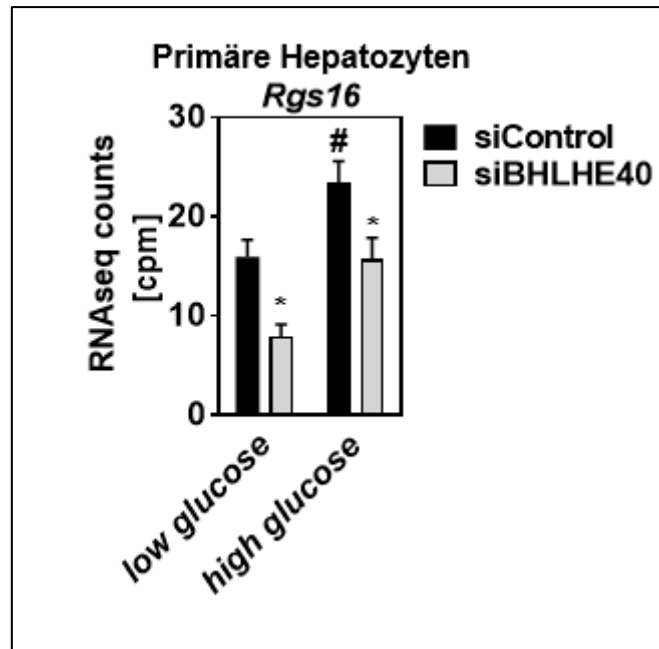


Abbildung 41: Expression von ChREBP-Zielgen *Rgs16* nach *Bhlhe40*-Knockdown.

Dargestellt sind die RNA-Sequenzwiederholungen von *Rgs16* nach Transfektion mit *Bhlhe40*-spezifischer siRNA, gemessen mittels RNA-Sequenzierung unter zwei verschiedenen Bedingungen. Es zeigte sich zum einen eine signifikant höhere Expression von *Rgs16* unter hoher Glukosekonzentration (27,5 mM), zum andern führte der *Bhlhe40*-Knockdown zu einer signifikant geringeren Expression von *Rgs16* verglichen mit den Kontrollzellen. Dies galt sowohl für die niedrige (2,5 mM) als auch für die hohe (27,5 mM) Glukosekonzentration. (cmp:counts per million) (*p<0,05 zu siControl, #p<0,05 zu low glucose, n=3)

3.2.4.2 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Aktivierung von ChREBP-Zielgenen

Das folgende Experiment wurde ebenfalls mit primären Hepatozyten von männlichen C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Die *Bhlhe40*-Überexpression erfolgte, wie bei den vorherigen Experimenten, mittels adenoviralem Gentransfer. Die primären Hepatozyten wurden mit aufsteigenden Konzentrationen an *Bhlhe40*-exprimierenden Adenoviren infiziert, wobei die direkten Kontrollzellen ausschließlich mit GFP-exprimierenden Adenoviren infiziert wurden (s. Tabelle 41). Um eine Verzerrung der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Gesamtviruskonzentrationen zu verhindern, wurden die restlichen Zellen in absteigender Konzentration mit GFP-exprimierenden Adenoviren infiziert, so dass jedes Well mit der gleichen Gesamtkonzentration an Adenoviren inkubiert wurde. Anschließend wurde die Expression der ChREBP-Zielgene *Txnip* und *Rgs16* mittels qRT-PCR gemessen.

Tabelle 41: *Bhlhe40*-Überexpression und Aktivierung von ChREBP-Zielgenen - Schema der verwendeten Adeno-BHLHE40- und Adeno-GFP-Konzentrationen

Virus	pfu/ml			
	Adeno-GFP	9,6 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁵
Adeno-BHLHE40	—	2,4 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁵	9,6 x 10 ⁵

Die Auswertung der qRT-PCR-Daten zeigte, dass die Überexpression von *Bhlhe40* zu einer signifikanten, dosisabhängigen Induktion der *Txnip*-Expression führte (s. Abbildung 42).

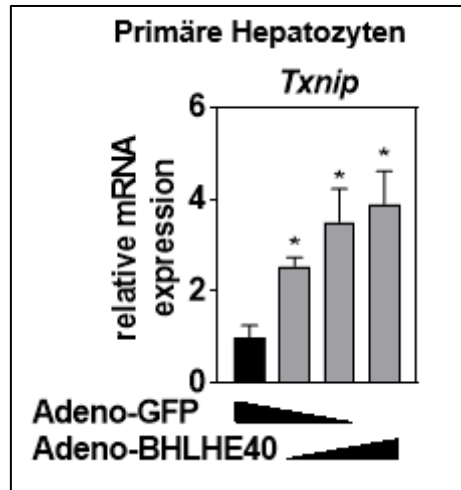


Abbildung 42: Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression auf das ChREBP-Zielgen *Txnip*.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Txnip* nach *Bhlhe40*-Überexpression. Die Auswertung der qRT-PCR-Daten zeigte einen signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der *Txnip*-mRNA-Expression. (* $p < 0,05$ zu Adeno-GFP, $n=3$)

Für das ChREBP-Zielgen *Rgs16*, ergab sich ein ähnliches Bild. Auch die mRNA-Expression von *Rgs16* stieg nach *Bhlhe40*-Überexpression signifikant an. Der Anstieg der mRNA-Expression schien allerdings unabhängig von der verwendeten Viruskonzentration zu sein (s. Abbildung 43).

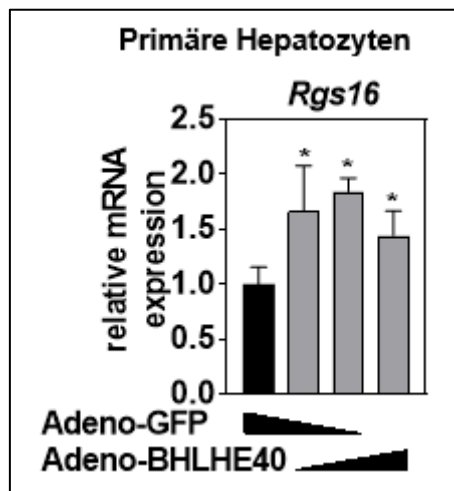


Abbildung 43: Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression auf das ChREBP-Zielgen *Rgs16*.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von *Rgs16* nach adenoviraler *Bhlhe40*-Überexpression. Die Auswertung der qRT-PCR-Daten zeigte einen signifikanten Anstieg der *Rgs16* mRNA-Expression, der jedoch unabhängig von der verwendeten Viruskonzentration zu sein schien. (* $p < 0,05$ zu Adeno-GFP, $n=3$)

3.3 Untersuchung neuer genomischer BHLHE40-Bindungsstellen in der Mäuseleber

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit sollten neue DNA-Bindungsstellen von BHLHE40 in der Mäuseleber detektiert werden. Zur Bestimmung etwaiger Protein-DNA-Interaktion erfolgte eine Chromatin-Immünpräzipitation mit anschließender qPCR. Ziel war es herauszufinden, ob BHLHE40 an bestimmte Genregionen bindet. Meist handelt es sich bei den mittels ChIP untersuchten Genregionen um Promotorregionen. Die Chromatin-Immünpräzipitation wurde mit Leberproben von ad-libitum gefütterten, männlichen C57BL/6J Mäusen (n=3) durchgeführt. Voruntersuchungen zeigten, dass eine Depletion von BHLHE40 in primären Hepatozyten die Expression bestimmter Gene beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die DNA-Bindungsstellen von BHLHE40 in der Nähe BHLHE40-regulierter Gene befinden. Die Untersuchung der Hypothese erfolgte mittels ChIP-qPCR für ausgewählte Genregionen.

3.3.1 Validierung der Chromatin-Immünpräzipitation als Methode

In der Arbeitsgruppe der Autorin existierten zuverlässige Erfahrungswerte für die Chromatin-Immünpräzipitation mittels spezifischem ChREBP-Antikörper. Aus diesem Grund wurde neben der BHLHE40-ChIP parallel eine ChREBP-ChIP durchgeführt. Die ChREBP-ChIP wurde hierbei als Positivkontrolle genutzt, um zu validieren, dass die ChIP methodisch funktioniert. Zur späteren Normalisierung der qPCR wurde die Amplifizierung eines genomischen Fragments 0,3 kb *upstream* des TSS des Insulingens gemessen (s. Abbildung 47). Insulin ist physiologisch streng reguliert und es wurde keine Anreicherung des untersuchten Genfragments durch ChREBP-ChIP bzw. BHLHE40 ChIP erwartet. Abbildung 47 bestätigt diese Erwartung: in Relation zum Input wurde das Genfragment weder durch die ChREBP-ChIP, noch durch die Bhlhe40-ChIP angereichert.

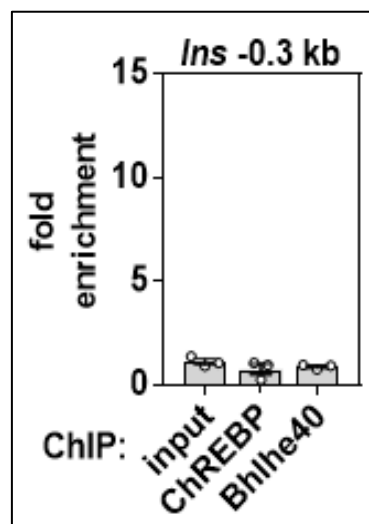


Abbildung 44: Keine Anreicherung des untersuchten genomischen Fragments in der Nähe des Insulingens durch ChREBP- bzw. Bhlhe40-ChIP.

Das untersuchte Genfragment konnte weder mittels ChREBP-, noch mittels Bhlhe40-Antikörper präzipitiert werden. (n=3) (*p<0,05; T-Test ChREBP zu Input bzw. Bhlhe40 zu Input)

Als nächstes wurde die Anreicherung genomischer Fragmente in der Nähe von ChREBP-Zielgenen mit bekannter ChREBP-Bindungsstelle untersucht. Durchgeführt wurde sowohl eine ChREBP-ChIP, als auch eine BHLHE40-ChIP. Es wurde zum einen das ChREBP-Zielgen *Txnip* und zum anderen das ChREBP-Zielgen *pyruvate kinase L/R (Pklr)* betrachtet, von denen bekannt ist, dass ChREBP in deren Promotorregion bindet (Poungvarin, Chang et al. 2015). Abbildung 45 zeigt sowohl für die untersuchte genomische ChREBP-Bindungsstelle nahe *Txnip* (s. Abbildung 45.A), als auch für die genomische ChREBP-Bindungsstelle nahe *Pklr* (s. Abbildung 45.B) eine Anreicherung durch Immunpräzipitation mittels ChREBP-spezifischem Antikörper. Relativ zum Input, stellte sich die Anreicherung des Genfragments in der Nähe von *Txnip* (- 0,1 kb in Relation zum TSS) nach Immunpräzipitation signifikant, ca. 30-fach erhöht dar (s. Abbildung 45A). Für das untersuchte Genfragment in der Nähe von *Pklr* (+ 0,23 kb in Relation zum TSS) war eine ca. 20-fache Anreicherung nach Immunpräzipitation festzustellen (s. Abbildung 45B). Diese Anreicherung war ganz knapp nicht signifikant, was durch die deutlichen Unterschiede in den Messwerten der einzelnen Mäuse zu erklären ist. Abbildung 45 zeigt darüber hinaus, dass die Präzipitation mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper lediglich in einer geringen Anreicherung der untersuchten genomischen Fragmente resultierte. Diese Anreicherung mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper war für das Genfragment in der Nähe von *Txnip* zwar signifikant in Relation zum Input, verglichen mit der Anreicherung mittels ChREBP-spezifischem Antikörper allerdings sehr gering.

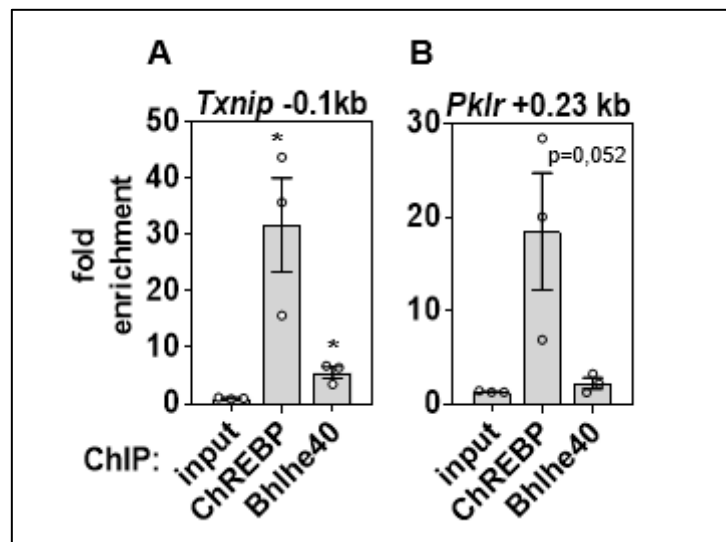


Abbildung 45: Anreicherung genomischer Fragmente in der Nähe der ChREBP-Zielgene *Txnip* und *Pklr* durch Immunpräzipitation.

Die Messung erfolgte mittels qPCR. Für Genfragmente nahe *Txnip* ergab sich eine signifikante, ca. 30-fache Anreicherung (A), für Genfragmente nahe *Pklr* eine ca. 20-fache Anreicherung (B) durch ChREBP-ChIP. Die Präzipitation beider untersuchter Genfragmente mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper führte lediglich zu einer geringen Anreicherung (A und B). (n=3) (*p<0,05; T-Test ChREBP zu Input bzw. Bhlhe40 zu Input)

3.3.2 Potenzielle neue DNA-Bindungsstelle von BHLHE40 in der Nähe der Gene *Klf10* und *Dgat2*

Zum Auffinden neuer genomischer Bhlhe40-Bindungsstellen wurden exemplarisch drei Genregionen auf Anreicherung durch Chromatin-Immunpräzipitation mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper untersucht. Es wurden dabei Genregionen in der Nähe jener BHLHE40-Zielgene ausgewählt, deren Genexpression in den Voruntersuchungen deutlich durch eine Bhlhe40-Depletion reguliert wurde. Dies waren die Gene *Krueppel-like factor 10*

(*Klf10*), *Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2 (Dgat2)* und *G1/S-specific cyclin-D2 (Ccnd2)*. *Klf10* stellt gleichzeitig ein bekanntes ChREBP-Zielgen dar (Poungvarin, Chang et al. 2015). Die Untersuchung erfolgte neben der BHLHE40-ChIP jeweils auch mit der ChREBP-ChIP. Die ChREBP-ChIP diente hierbei als Positivkontrolle.

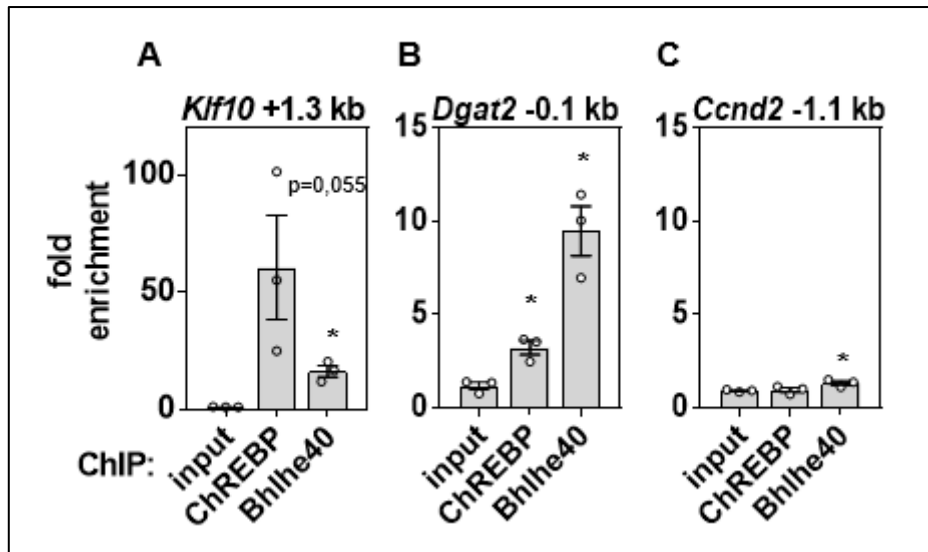


Abbildung 46: Anreicherung genomischer Fragmente nahe *Klf10*, *Dgat2* und *Ccnd2* durch Chromatin-Immünpräzipitation mittels ChREBP-spezifischem bzw. BHLHE40-spezifischem Antikörper.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels qPCR. Für das Genfragment in der Nähe von *Klf10* zeigte sich durch den BHLHE40-ChIP eine signifikante, ca. 15-fache Anreicherung (A). Die Immunpräzipitation mittels ChREBP-spezifischem Antikörper führte allerdings zu einer weitaus stärkeren, ca. 50-fachen Anreicherung (A). Die fehlende Signifikanz ist durch die großen Unterschiede in den Messwerten der einzelnen Mäuse zu erklären. Für das Genfragment nahe *Dgat2* zeigte sich eine signifikante, ca. 10-fache Anreicherung durch Immunpräzipitation mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper, die Anreicherung nach ChREBP-ChIP war zwar ebenfalls signifikant, aber deutlich geringer (B). Weder nach BHLHE40-, noch nach ChREBP-ChIP war eine deutliche Amplifizierung des Genfragments in der Nähe von *Ccnd2* mittels qPCR zu detektieren (C). Dennoch war die Anreicherung des Genfragments mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper signifikant (n=3) (* $p < 0,05$; T-Test ChREBP zu Input bzw. Bhlhe40 zu Input)

In Abbildung 46 ist die Auswertung der Chromatin-Immünpräzipitation für die drei oben genannten Gene *Klf10*, *Dgat2* und *Ccnd2* mittels qPCR dargestellt. Für das untersuchte genomische Fragment nahe *Klf10* (+ 1,3 kb in Relation zum TSS) zeigte sich eine signifikante, ca. 15-fache Anreicherung durch Immunpräzipitation mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper (s. Abbildung 46A). Dies zeigt, dass an dieser genomischen Stelle mehr BHLHE40 gebunden war. Die ChREBP-ChIP führte allerdings zu einer noch weitaus stärkeren, ca. 50-fachen Anreicherung des untersuchten Genfragments nahe *Klf10* (s. Abbildung 46A). Diese Anreicherung war knapp nicht signifikant ($p=0,05$), was durch die deutlichen Unterschiede in den Messwerten für die einzelnen Mäuse erklärbar ist. Für das Genfragment nahe *Dgat2* (- 0,1 kb in Relation zum TSS) war eine signifikante, ca. 10-fache Anreicherung durch die BHLHE40-ChIP erkennbar, während die Anreicherung nach ChREBP-ChIP zwar ebenfalls signifikant, aber geringer war (s. Abbildung 46B). Dies zeigte, dass an diesem genomischen Fragment nahe *Dgat2* verstärkt BHLHE40 gebunden wurde. Abbildung 46C zeigt, dass durch die Immunpräzipitation mittels ChREBP-spezifischem Antikörper keine Anreicherung des genomischen Fragments nahe *Ccnd2* (- 1,1 kb in Relation zum TSS) festzustellen war. Die Anreicherung mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper war zwar signifikant, aber gering (s. Abbildung 46C).

4. Diskussion

4.1 Einfluss von BHLHE40 auf die Differenzierung von Adipozyten

4.1.1 3T3-L1 Zellen als Modell der Adipogenese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von BHLHE40 während der Adipogenese untersucht. Dabei diente die Präadipozyten-Zelllinie 3T3-L1 als Modell für die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten. Die, aus einer murinen Fibroblasten-Zelllinie kultivierten, 3T3-L1 Zellen sammeln im Ruhestadium eine große Menge an Triglyzeriden an und es findet eine Umwandlung in Fettzellen statt (Green und Meuth 1974, Green und Kehinde 1975). Aus diesem Grund stellen 3T3-L1 Zellen ein häufig verwendetes *in vitro* Modell zum Studium der Adipogenese dar (MacDougald und Lane 1995, Morrison und McGee 2015). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 10 % FBS und 1 % P/S. Zur Differenzierungsinduktion wurden Insulin (2 μ M), Dexamethason (1 μ M) und IBMX (0,5 mM), in Anlehnung an Angaben aus der Literatur, verwendet (Russell und Ho 1976, Rubin, Hirsch et al. 1978, Zebisch, Voigt et al. 2012).

4.1.2 Hochregulation der *Bhlhe40*-Expression während der Adipogenese

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Steigerung der *Bhlhe40*-Expression in 3T3-Zellen nach Stimulation mit Insulin, Dexamethason und IBMX festgestellt werden (s. Abbildung 7). Dafür wurde die *Bhlhe40* mRNA-Expression vor adipogener Stimulation (Tag 0) und 2, 4 und 8 Tage nach adipogener Stimulation mittels qRT-PCR gemessen.

Es ist bereits bekannt, dass das *Bhlhe40*-Gen eines der unmittelbar, früh exprimierten Gene (IEG) in 3T3-L1 Zellen nach adipogener Stimulation darstellt (Inuzuka, Nanbu-Wakao et al. 1999). Inuzuka et al. (1999) konnten zeigen, dass *Bhlhe40* bereits vor adipogener Stimulation stärker exprimiert ist, als die restlichen IEGs und dass die *Bhlhe40*-Expression innerhalb einer Stunde nach Stimulation weiter zunimmt, bevor sie anschließend im Lauf von 24 Stunden wieder abnimmt. Es wird vermutet, dass FBS, welches den *platelet derived growth factor* (PDGF) enthält, Ursache für diese Steigerung der *Bhlhe40*-Expression sein könnte (Inuzuka, Nanbu-Wakao et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit generierte Daten signalisieren, dass die Expression von *Bhlhe40* während der Adipozytendifferenzierung wieder zunimmt. Abbildung 7 zeigt eine ca. 4-fache Steigerung der *Bhlhe40*-Expression von Tag 0 auf Tag 8, mit einem minimalen, nur kurzzeitigen Rückgang der Expression an Tag 2. Dieser Rückgang an Tag 2 deckt sich mit den Ergebnissen von Inuzuka et al. (1999), welche eine Abnahme der *Bhlhe40*-Expression 24 Stunden nach adipogener Stimulation feststellten.

Die Hochregulation der *Bhlhe40*-mRNA-Expression nach Stimulation mittels Differenzierungsinduktoren verläuft nach einem ähnlichen Muster wie auch die Expression von *Ppar γ* und dessen Zielgen *aP2* (s. Abbildung 6). Dies war Grund zu der Annahme, dass *Bhlhe40* möglicherweise ebenfalls ein PPAR γ -Zielgen darstellt.

Zu einem früheren Zeitpunkt publizierte Daten sprechen jedoch gegen diese Hypothese (Schupp, Cristancho et al. 2009). Abbildung 47 beschreibt ein *Ppar γ* -Knockdown Experiment, in dem die Auswirkungen eines *Ppar γ* -Knockdowns auf die mRNA-Expression von *aP2* und *Bhlhe40* untersucht wurden. Während die mRNA-Expression des PPAR γ -Zielgens *aP2* durch den *Ppar γ* -Knockdown signifikant reduziert war, wurde die mRNA-Expression von *Bhlhe40* kaum beeinflusst. Daraus folgt, dass *Bhlhe40* höchstwahrscheinlich kein PPAR γ -Zielgen ist und die Hochregulation der *Bhlhe40*-Expression während der Adipogenese nicht durch PPAR γ vermittelt ist.

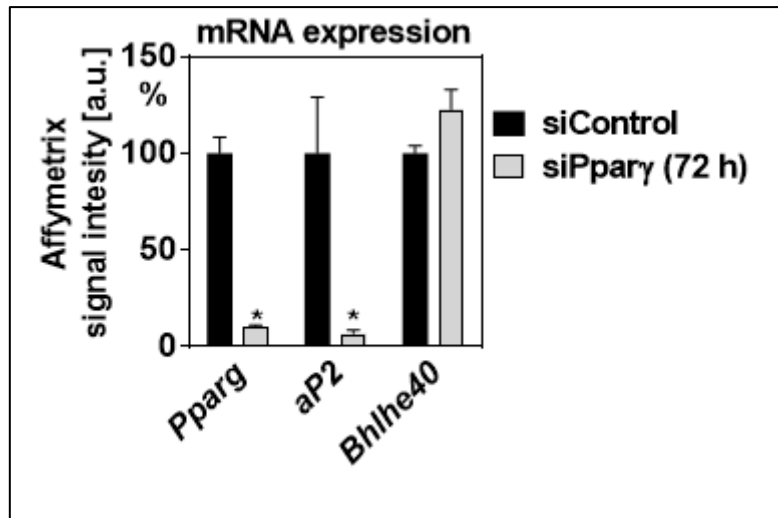


Abbildung 47: *Pparg*-Knockdown beeinflusst die *Bhlhe40*-Expression nicht signifikant.

Dargestellt mittels Microarray-Analyse ist die Signalintensität der Genexpression von *Pparg*, *aP2* und *Bhlhe40* 72 Stunden nach *Pparg*-Knockdown. Während die Expression von *Pparg* und dessen bekanntem Zielgen *aP2* durch den *Pparg*-Knockdown signifikant reduziert wurde, blieb die Expression von *Bhlhe40* weitgehend unbeeinflusst. (* $p < 0,05$ zu siControl, $n=3$)

4.1.3 Einfluss einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Adipozyten-Differenzierung

Aus einem von Yun *et al.* (2002) publizierten Artikel geht hervor, dass die retrovirale Überexpression von *Bhlhe40* in 3T3-L1 Präadipozyten deren Differenzierung beinahe vollständig hemmt. Es wurde weiterhin vermutet, dass diese Inhibition der Adipogenese durch eine Repression der *Pparg2*-Promotoraktivität vermittelt wird.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob dieses Ergebnis mit adenoviraler Überexpression von *Bhlhe40* bestätigt werden kann. Dafür wurde *Bhlhe40* in 3T3-L1 Zellen überexprimiert und die Zellen zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz zur Differenzierung stimuliert. Etwa eine Woche später wurden die Auswirkungen der *Bhlhe40*-Überexpression mittels qRT-PCR untersucht.

4.1.3.1 *Bhlhe40*-Überexpression mindert die Expression von *Bhlhe41*

BHLHE40 und BHLHE41, beides bHLH-Proteine, sind sehr nahe verwandt mit einer Homologie von über 95 % in ihrer bHLH-Domäne (Yamada und Miyamoto 2005).

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass die Genexpression beider Proteine während der Adipogenese sehr ähnlich verläuft und in deren Verlauf ansteigt (s. Abbildung 7). Abbildung 12 zeigt darüber hinaus eine signifikante Reduktion der *Bhlhe41*-Expression als Antwort auf die Überexpression von *Bhlhe40*.

Diese Ergebnisse deuten auf eine gegenseitige Regulation und Beeinflussung von BHLHE40 und BHLHE41 in 3T3-L1 Zellen hin. Es ist bereits bekannt, dass BHLHE40 und BHLHE41 eine co-regulatorische Funktion bei der Anpassung von ATDC5-Zellen (Krebszelllinie), menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) und HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms; benannt nach den Initialen der Spenderin Henrietta Lacks) an Sauerstoffmangel ausüben (Miyazaki, Kawamoto *et al.* 2002). ATDC5 ist eine chondrogene Zelllinie, die sich von murinen Teratokarzinomzellen ableitet, während HeLa-Zellen menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms darstellen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Expression von *Bhlhe41* in Kolonkarzinomzellen, durch die Bindung von BHLHE40 an das E-box-Element im proximalen *Bhlhe41*-Promotor, gehemmt wird (Li, Xie *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass eine *Bhlhe40*-Überexpression auch in 3T3-L1 Präadipozyten die Expression von *Bhlhe41* negativ reguliert (s. Abbildung 12). Als Mechanismus kommt eine BHLHE40-vermittelte Repression der *Bhlhe41*-Promotoraktivität in Frage. Mittels Luciferase-Reporter-Assay könnte dieser Sachverhalt in einer zukünftigen Forschungsarbeit genauer untersucht und gegebenenfalls bestätigt werden.

4.1.3.2 *Bhlhe40*-Überexpression beeinflusst *Ppar γ* -Expression nicht signifikant

Bhlhe40 ist als ein Zielgen des Transkriptionsfaktors HIF-1 an der Hypoxie-vermittelten Regulation der Adipogenese im Fettgewebe beteiligt. Die Expression von *Bhlhe40* wird unter Sauerstoffmangel stark erhöht, wobei die Aktivierung der Genexpression HIF-1-abhängig ist. Es wird vermutet, dass diese verstärkte Expression von BHLHE40 zu einer Repression der *Ppar γ* -Promotoraktivität führt und dadurch die Differenzierung der Adipozyten gehemmt wird (Yun, Maecker et al. 2002).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine *Bhlhe40*-Überexpression die Expression von *Ppar γ* bereits auf basalem Niveau, vor adipogener Stimulation, beeinflusst. Dafür wurde *Bhlhe40* in 3T3-L1 Präadipozyten adenoviral überexprimiert und anschließend die mRNA-Expression von *Ppar γ* 1 und *Ppar γ* 2 mittels qRT-PCR gemessen. Abbildung 13 zeigt, dass weder *Ppar γ* 1, noch *Ppar γ* 2 signifikant durch die *Bhlhe40*-Überexpression beeinflusst werden. Dieses Ergebnis spricht somit gegen die Theorie von Yun et al. (2002), wonach die Überexpression von BHLHE40 direkt die *Ppar γ* 2-Promotoraktivität hemmt.

Eine andere Hypothese ist, dass BHLHE40, ohne dabei selbst direkt an den *Ppar γ* 2-Promotor zu binden, eine verstärkte Rekrutierung von HDAC1 an den Promotor bewirkt und auf diese Weise die Adipozytendifferenzierung unterdrückt (Park und Park 2012). In ihrer Studie konnten Park und Park (2012) zeigen, dass BHLHE40, nach Induktion durch Sauerstoffmangel, zwar mit *C/ebp β* interagiert und so dessen Transaktivierung hemmt, jedoch die Bindung von *C/EBP β* an den *Ppar γ* 2-Promotor nicht verhindert. Weiterhin konnte eine Interaktion von BHLHE40 mit HDAC1 bestätigt werden (Sun und Taneja 2000). BHLHE40 scheint demnach als Co-Repressor zu fungieren, welcher eine Interaktion zwischen *C/EBP β* und HDAC1 am *Ppar γ* 2-Promotor vermittelt und dadurch dessen Aktivität supprimiert (Park und Park 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die *Bhlhe40*-Überexpression keinen direkten Einfluss auf die Expression von *Ppar γ* hat (s. Abbildung 13), stützen diese Theorie.

Die hohe Standardabweichung in der GFP-Kontrollgruppe bei der *Ppar γ* 2-Messung (s. Abbildung 13A) könnte mit der mengenmäßig geringen Expression von *Ppar γ* 2 in Vorläuferfettzellen zusammenhängen. Es ist bekannt, dass *Ppar γ* 2 in einer nur sehr geringen Menge in Präadipozyten exprimiert wird (Tontonoz, Hu et al. 1994), während *Ppar γ* 1 wesentlich stärker in Vorläuferfettzellen exprimiert wird (Saladin, Fajas et al. 1999, Rangwala und Lazar 2000). Dies wird auch anhand der C_t -Werte in Abbildung 13 deutlich. Der C_t -Wert, engl. *threshold cycle*, beschreibt den Beginn des exponentiellen Wachstums einer Kurve. Im Fall der qRT-PCR, stellt der C_t -Wert den Zyklus dar, bei welchem die Fluoreszenz zum ersten Mal exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Für *Ppar γ* 1 wurde ein C_t -Wert von 24, für *Ppar γ* 2 ein C_t -Wert von 30 gemessen. Daraus ergibt sich, dass *Ppar γ* 1 in der erfolgten Messung in Präadipozyten ca. 64-fach (2^6) stärker exprimiert war, als *Ppar γ* 2 (s. Abbildung 13).

4.1.3.3 *Bhlhe40*-Überexpression hemmt die Adipogenese

Zur Untersuchung des Einflusses einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Adipogenese wurden 3T3-L1 Präadipozyten mit *Bhlhe40*- bzw. GFP-exprimierenden Adenoviren infiziert und zur Differenzierung stimuliert. Eine Woche später wurden die Zellen nach Phänotyp (s. Abbildung 14) und Expression von Adipozyten-Markergenen (s. Abbildung 15) analysiert. Die Adipozyten-Marker wurden zusätzlich auf Proteinebene betrachtet (s. Abbildung 16). Die Resultate der durchgeführten Untersuchungen zeigen einheitlich, dass die Überexpression von *Bhlhe40* zu einer Inhibition der Adipogenese führt.

Damit konnten frühere Forschungsergebnisse bestätigt werden, dass eine *Bhlhe40*-Überexpression die Adipozytendifferenzierung hemmt (Yun, Maecker et al. 2002). Ein großer Unterschied zu dem Versuchsaufbau in der vorliegenden Arbeit liegt darin, dass hier Adenoviren statt Retroviren zur Überexpression von *Bhlhe40* verwendet wurden. Yun et al. (2002) zeigten die Hemmung der Adipogenese durch Anfärben der Zellen mittels Oil-Red-O. In dieser Arbeit wurde der Phänotyp zusätzlich unter dem Phasenkontrastmikroskop (s. Abbildung 14) dargestellt, sowie die Expression der Adipozyten-Marker PPAR γ , *aP2*, Adiponektin und C/EBP α auf mRNA- und Proteinebene gemessen. Abbildung 15 zeigt eine signifikante 60-75-%ige Reduktion der relativen mRNA-Expression von *Ppar γ* , *aP2* und *Adipoq* bei *Bhlhe40*-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Einzig die Expression des Adipozyten-Markers *C/ebp α* ist nicht signifikant verändert, verglichen mit den GFP-Kontrollzellen (s. Abbildung 15).

Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses ist, dass BHLHE40 erst nach *C/ebp α* hemmend in die Kaskade der Adipozytendifferenzierung eingreift. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass Markergene, wie *aP2* und *Adipoq*, deren Expression durch PPAR γ 2 und C/EBP α gemeinsam induziert wird (Cook, Hunt et al. 1985, Hunt, Ro et al. 1986, Farmer 2006), signifikant durch die *Bhlhe40*-Überexpression reduziert werden. Die Expression von *C/ebp α* wiederum, wie auch die Expression von *Ppar γ 2*, wird durch C/EBP β und C/EBP δ aktiviert (Rangwala und Lazar 2000, Park und Park 2010). Dadurch, dass die Expression von *C/ebp α* nicht signifikant durch die *Bhlhe40*-Überexpression reduziert wird, scheint es unwahrscheinlich, dass BHLHE40 bereits auf der Stufe von C/EBP β und C/EBP δ auf die Adipozytendifferenzierung einwirkt. Somit deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass BHLHE40 die Adipogenese *upstream* von *Ppar γ 2* hemmt. In dieser Arbeit wurde allerdings nicht untersucht, ob BHLHE40 nach Zugabe der Differenzierungsinduktoren hemmend auf die *Ppar γ 2*-Promotoraktivität wirkt. Dies wäre der Datenlage der vorliegenden Arbeit nach durchaus auch denkbar. PPAR γ 2 wird auch als Masterregulator der Adipogenese bezeichnet (Chawla, Schwarz et al. 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass PPAR γ 2 alleine ausreicht, um auch in C/EBP α -defizitären Zellen die Adipogenese voranzutreiben, während umgekehrtes nicht gilt (Rosen, Hsu et al. 2002). Daher scheint es nicht unwahrscheinlich, dass die Interaktion von BHLHE40 mit *Ppar γ 2* genügt, um die Expression der weiter *downstream* in der Differenzierungskaskade gelegenen Gene *aP2* und Adiponektin zu inhibieren, selbst dann, wenn die Expression von *C/ebp α* durch die *Bhlhe40*-Überexpression unbeeinflusst bleibt.

4.1.4 Einfluss eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Adipozyten-Differenzierung

Während in der Vergangenheit der Einfluss einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Adipogenese schon mehrfach untersucht wurde (Yun, Maecker et al. 2002, Park und Park 2012), wissen wir relativ wenig über die Effekte eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf 3T3-L1 Präadipozyten. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Adipozyten-Differenzierung genauer analysiert werden.

4.1.4.1 *Bhlhe40*-Knockdown beeinflusst *Bhlhe41*-Expression nicht signifikant

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von BHLHE40 und BHLHE41, sowie dem detektierten Effekt der *Bhlhe40*-Überexpression auf *Bhlhe41* (s. Kapitel 3.1.3.2), wurde mittels qRT-PCR untersucht, ob ein *Bhlhe40*-Knockdown ebenso Auswirkungen auf die Expression von *Bhlhe41* hat.

Für Hepa1c1c7-Zellen, Zellen einer Maushepatom-Zelllinie, wurde bereits nachgewiesen, dass ein *Bhlhe40*-Knockdown zu einer erhöhten Expression von *Bhlhe41* führt (Choi, Cho et al. 2008).

Abbildung 21 zeigt jedoch, dass die *Bhlhe41*-Expression in 3T3-L1 Zellen nicht signifikant durch den *Bhlhe40*-Knockdown beeinflusst wird. Damit scheint die Regulation von *Bhlhe41* durch BHLHE40 in 3T3-L1 Präadipozyten nicht symmetrisch zu verlaufen, andernfalls würde man eine gesteigerte Expression von *Bhlhe41* als Antwort auf den *Bhlhe40*-Knockdown erwarten. Die verwendeten *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs führten allerdings maximal zu einem

Bhlhe40-Knockdown von 40-50 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Deswegen muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass eventuell ein stärkerer *Bhlhe40*-Knockdown nötig ist, um einen signifikanten Effekt auf die Expression von *Bhlhe41* auszuüben. Dies könnte in einem zukünftigen Experiment unter Verwendung einer weiteren *Bhlhe40*-spezifischen siRNA genauer untersucht werden.

4.1.4.2 *Bhlhe40*-Knockdown beeinflusst *Pparγ*-Expression nicht signifikant

Wie bereits erwähnt, wurde in der Vergangenheit eine direkte Beeinflussung der *Pparγ2*-Promotoraktivität durch BHLHE40 als Mechanismus hinter der hemmenden Wirkung von BHLHE40 auf die Adipogenese vorgeschlagen (Yun, Maecker et al. 2002). Nachdem die durchgeführten Experimente keinen direkten Einfluss einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Expression von *Pparγ* zeigten, sollte nun untersucht werden, ob ein *Bhlhe40*-Knockdown die Adipozytendifferenzierung beeinflusst.

In Abbildung 22 ist dargestellt, dass der *Bhlhe40*-Knockdown keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *Pparγ1* und *Pparγ2* in undifferenzierten, nicht-induzierten Präadipozyten hat. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls gegen eine direkte Regulation von PPAR γ durch BHLHE40.

4.1.4.3 *Bhlhe40*-Knockdown fördert die Adipogenese

Während sich in der Vergangenheit bereits mehrere Veröffentlichungen mit den Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression auf die Adipogenese auseinander gesetzt haben, ist zu den Konsequenzen eines *Bhlhe40*-Knockdowns bisher wenig bekannt. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit die Folgen eines *Bhlhe40*-Knockdowns für die Differenzierung von Adipozyten genauer untersucht werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein *Bhlhe40*-Knockdown den gegenteiligen Effekt, wie eine *Bhlhe40*-Überexpression hat und die Adipogenese fördert.

Der *Bhlhe40*-Knockdown wurde mit zwei verschiedenen, *Bhlhe40*-spezifischen siRNAs (si*Bhlhe40_677*, si*Bhlhe40_419*) durchgeführt (s. Abbildungen 17-19).

Die Analyse der Zelldifferenzierung erfolgte nach Phänotyp mittels Oil-Red O Färbung und Phasenkontrastmikroskopie, sowie auf mRNA- und Proteinebene. Sowohl die Oil-Red O Färbung, als auch die Phasenkontrastmikroskopie zeigten eine bessere Differenzierung der Zellen nach *Bhlhe40*-Knockdown (s. Abbildung 23). Dieses Ergebnis konnte mittels Analyse der mRNA- und Proteinexpression der Adipozyten-Marker PPAR γ , aP2, Adiponektin und C/EBP α , welche nach *Bhlhe40*-Knockdown wesentlich stärker exprimiert wurden, bestätigt werden (s. Abbildungen 24 & 25).

Damit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die erhobenen Daten die zuvor aufgestellte Hypothese stützen und sich ein *Bhlhe40*-Knockdown in 3T3-L1 Zellen tatsächlich stimulierend auf die Adipogenese auswirkt.

Ob und welche Konsequenzen dieses Ergebnis tatsächlich für die Adipogenese *in vivo* hat, bleibt abzuwarten. Es ist bekannt, dass die Expression von *Bhlhe40* als Antwort auf Sauerstoffmangel gesteigert wird (Yun, Maecker et al. 2002, Park und Park 2012). Allerdings gibt es nach Wissen der Autorin bisher noch keine Hinweise darauf, welche natürlichen Faktoren zu einer verminderten *Bhlhe40*-Expression *in vivo* führen könnten.

Zur Funktion von BHLHE40 bei der Adipogenese *in vivo* ist bisher wenig bekannt. Es existiert allerdings eine Studie an *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen, in welcher postuliert wird, dass eine BHLHE40-Defizienz die Entwicklung von Adipositas unter einer Hochfett-Diät verhindern kann (Noshiro, Kawamoto et al. 2018). Ohne Herausforderung mittels Hochfett-Diät war das Körpergewicht von *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen annähernd gleich. Jedoch zeigten *Bhlhe40*^{-/-}-Mäuse, denen eine Hochfett-Diät gefüttert wurde, eine geringere Körpergewichtszunahme als die Kontrollen vom Wildtyp. Zudem war der Fettgehalt im Abdomen bei *Bhlhe40*^{-/-}-Mäusen in Relation zum Wildtyp signifikant reduziert, sowohl unter der Hochfett-, als auch unter der Kontrolldiät. Die Ergebnisse der oben genannten Studie stehen damit im Widerspruch zu den Erkenntnissen aus dieser Arbeit nach denen ein *Bhlhe40*-Knockdown *in vitro* die Adipogenese fördert. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte in dem unterschiedlichen Aufbau

der Experimente begründet liegen: dem *Bhlhe40*-Knockdown in 3T3-L1 Zellen *in vitro* steht ein Ganzkörper-Knockdown von *Bhlhe40* *in vivo* gegenüber.

Ein besseres Verständnis der Funktion von BHLHE40 während der Adipogenese *in vivo* sowie des zugrunde liegenden Mechanismus der Beeinflussung der Adipogenese sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein und könnte möglicherweise zur Entwicklung von Strategien zur Bekämpfung von Fettleibigkeit beitragen.

4.2 Die Rolle von BHLHE40 im Leberstoffwechsel

4.2.1 Einfluss von BHLHE40 auf die Expression von *Bhlhe41*

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich BHLHE40 und BHLHE41 gegenseitig beeinflussen und in ihrer Funktion ergänzen (Li, Xie et al. 2003, Choi, Cho et al. 2008, Cho, Noshiro et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine *Bhlhe40*-Überexpression in 3T3-L1 Zellen eine kompensatorische Herunterregulation der Expression von *Bhlhe41* zur Folge hat (s. Kapitel 3.1.3.2).

Etwaige Interaktionen zwischen BHLHE40 und BHLHE41 wurden deswegen auch für primäre murine Hepatozyten untersucht. Die adenovirale Infektion primärer Hepatozyten führte zu einer ca. 10-fachen Überexpression von *Bhlhe40* (s. Abbildung 31). Die Transfektion mittels *Bhlhe40*-spezifischer siRNA hatte einen *Bhlhe40*-Knockdown von maximal 60-80 % (s. Abbildung 33). Anschließend wurde mittels qRT-PCR jeweils die mRNA-Expression von *Bhlhe41* gemessen.

Ebenso wie in 3T3-L1 Zellen, wird auch in primären Hepatozyten die mRNA-Expression von *Bhlhe41* in Reaktion auf die *Bhlhe40*-Überexpression signifikant gemindert (s. Abbildung 32). Anders als in 3T3-L1 Zellen jedoch, in denen der *Bhlhe40*-Knockdown keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression von *Bhlhe41* hatte, erfolgte in den primären Hepatozyten als Antwort auf den *Bhlhe40*-Knockdown eine kompensatorische Hochregulation der *Bhlhe41*-mRNA-Expression um 110-130 % (s. Abbildung 35). Dieser Unterschied zwischen 3T3-L1 Zellen und primären Hepatozyten in der Regulation von BHLHE41 nach *Bhlhe40*-Knockdown, könnte tatsächlich mit der Stärke des Knockdowns in Zusammenhang stehen (Knockdown von 40-50 % in 3T3-L1 Zellen im Gegensatz zu 60-80 % in primären Hepatozyten). Möglicherweise ist eine stärkere Reduktion der *Bhlhe40*-Expression nötig, damit es zu einer Kompensation durch BHLHE41 kommt.

Ein nächster Schritt, um die Interaktion von BHLHE40 und BHLHE41 noch besser zu verstehen, könnte die Untersuchung der Effekte einer *Bhlhe41*-Überexpression bzw. eines *Bhlhe41*-Knockdowns auf die Expression von *Bhlhe40* sein.

4.2.2 Einfluss von BHLHE40 auf PPAR α -Zielgene

Während aus der Literatur bereits bekannt ist, dass BHLHE40 in der Lage ist PPAR γ und dessen Zielgene zu beeinflussen (s. Kapitel 4.1), wurde der Einfluss von BHLHE40 auf PPAR α -Zielgene bisher nicht untersucht. PPAR α ist ein nukleärer Rezeptor, dessen Zielgene unter anderem an der Fettsäureoxidation in den Mitochondrien (Song, Attia et al. 2010) und an der Ketogenese beteiligt sind (Grabacka, Pierzchalska et al. 2016). Nachdem Voruntersuchungen zu der vorliegenden Arbeit Hinweise lieferten, dass BHLHE40 auch in die Regulation von PPAR α -Zielgenen involviert ist (Daten nicht gezeigt), sollte nun genauer analysiert werden, inwiefern sich eine *Bhlhe40*-Überexpression bzw. ein *Bhlhe40*-Knockdown auf die PPAR α -Zielgene *Pdk4*, *Fabp1*, *Angptl4* und *Hmgcs2* auswirkt. Die Ergebnisse zeigen, dass der *Bhlhe40*-Knockdown (s. Abbildung 37) insgesamt einen deutlicheren Effekt auf die Expression der PPAR α -Zielgene hat, als die *Bhlhe40*-Überexpression (s. Abbildung 39). Nach *Bhlhe40*-Knockdown zeigt sich bei allen untersuchten Genen eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression (s. Abbildung 37). Eine Ausnahme stellt hier nur *Pdk4* dar, dessen Expression, in den mit DMSO behandelten Zellen, durch den *Bhlhe40*-Knockdown nicht signifikant reduziert war (s. Abbildung 37). Wie genau BHLHE40 die Veränderungen in der Expression der PPAR α -Zielgene vermittelt, ist noch nicht klar. Es ist bereits bekannt, dass

BHLHE40 als Co-Repressor von RXR α fungiert (Cho, Noshiro et al. 2009). Auf diese Weise ist BHLHE40 auch in der Lage, die Transaktivierung von anderen nukleären Rezeptoren zu hemmen, die Heterodimere mit RXR α bilden, wie zum Beispiel PPAR α . Gegen diesen Mechanismus spricht in diesem Fall allerdings, dass nicht die *Bhlhe40*-Überexpression, sondern der *Bhlhe40*-Knockdown zu einer verminderten PPAR α -Zielgen-Expression führt (s. Abbildung 37). In dem untersuchten Zusammenhang deutet dieses Ergebnis damit eher auf eine Funktion von BHLHE40 als Koaktivator hin.

Der *Bhlhe40*-Knockdown in primären Hepatozyten führt allerdings nicht bei allen PPAR α -Zielgenen zu einer verminderten Expression. Die Expression des PPAR α -Zielgens *fibroblast growth factor 21* (*Fgf21*) wird durch den *Bhlhe40*-Knockdown gefördert (Daten nicht gezeigt). Ein Anstieg der hepatischen FGF21-Expression auf mRNA- und Proteinebene konnte auch für *Bhlhe40*^{-/-}-Mäuse gezeigt werden (Fujita, Makishima et al. 2016). Den Phänotyp betreffend zeigten die *Bhlhe40*^{-/-}-Mäuse einen verminderten Fettgehalt in der Leber und ein niedrigeres Level an oxidativem Stress. Fujita et al. (2016) untersuchten den Einfluss von BHLHE40 auf FGF21 zusätzlich *in vitro*. So konnte die Gruppe zeigen, dass die Expression von *Fgf21* auch *in vitro* durch einen *Bhlhe40*-Knockdown gefördert und umgekehrt durch eine *Bhlhe40*-Überexpression vermindert wird.

Ein nächstes Ziel könnte es sein, die in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersuchten PPAR α -Zielgene in einem *Bhlhe40*-Knockdown Mausmodell unter Fütterung und Nahrungsentzug zu analysieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BHLHE40, über die Regulation von PPAR α -Zielgenen, in die Steuerung des Fettsäuremetabolismus und der Ketogenese involviert zu sein scheint. Der Prozess hinter dieser Regulation ist noch nicht endgültig geklärt und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Im Folgenden wird noch einmal im Einzelnen auf die untersuchten Gene *Pdk4*, *Fabp1*, *Angptl4* und *Hmgcs2* eingegangen.

4.2.2.1 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression bzw. eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von *Pdk4*

In Übereinstimmung mit bereits existierender Literatur (Song, Attia et al. 2010) zeigen die durchgeführten Experimente, dass die relative mRNA-Expression von *Pdk4* in den Kontrollzellen unter Behandlung mit dem PPAR α -Agonist WY-14643 signifikant erhöht ist (s. Abbildungen 37 und 39). Dieses Ergebnis bestätigt damit *Pdk4* als ein PPAR α -Zielgen.

Die beiden Hauptsubstrate zur Energiegewinnung *in vivo* sind Glukose und Fettsäuren (Wolfe 1998). Das mitochondriale Enzym PDK4 ist beteiligt an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Glukose- und Fettsäuremetabolismus in Adaption an wechselnde Umweltbedingungen (Kulkarni, Salehzadeh et al. 2012, Park, Jeon et al. 2018). PDK4 inhibiert dabei den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, welcher die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA während der Glukoseoxidation katalysiert (Harris, Bowker-Kinley et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine *Pdk4*-Überexpression die Fettsäureoxidation stimuliert (Park, Jeon et al. 2018).

Während die *Bhlhe40*-Überexpression - unabhängig von der Behandlung der Zellen mit DMSO oder WY-14643 - keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von *Pdk4* ausübt (s. Abbildung 39), war in den mit WY-14643 behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der *Pdk4*-Expression unter *Bhlhe40*-Knockdown festzustellen (s. Abbildung 37). Daraus folgt, dass BHLHE40 benötigt wird, für die volle Induktion der *Pdk4*-Expression nach Behandlung der Zellen mit WY-14643. PDK4 scheint demnach ein Angriffspunkt für BHLHE40, um indirekt Einfluss auf den Glukose- und Fettsäurestoffwechsel in primären Hepatozyten zu nehmen.

4.2.2.2 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression bzw. eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von *Fabp1*

FABP1 ist im Zytosol von Hepatozyten lokalisiert (Furuhashi und Hotamisligil 2008) und verantwortlich für die Aufnahme und den intrazellulären Transport von Fettsäuren (Chmurzynska 2006). Eine erhöhte Konzentration von langkettigen Fettsäuren im Zytosol ist assoziiert mit Krankheiten wie Fettleibigkeit und Diabetes mellitus. FABPs sorgen dafür, dass

diese langkettigen Fettsäuren gebunden und durch Fettsäureoxidation abgebaut bzw. Speicherorganellen zugeführt werden (Atshaves, Martin et al. 2010).

Abbildung 37 zeigt eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression von *Fabp1* in den siControl-Zellen als Reaktion auf die Behandlung mit PPAR α -Agonist WY-14643. Damit wird vorhandene Literatur bestätigt, wonach es sich bei *Fabp1* ebenfalls um ein PPAR α -Zielgen handelt (Issemann, Prince et al. 1992, Mandard, Muller et al. 2004). Bei der *Bhlhe40*-Überexpression lässt sich, in den mit Adenovirus behandelten Kontrollzellen (GFP), überraschenderweise keine signifikante Zunahme der Expression von *Fabp1* nach Behandlung mit WY-14643 feststellen. Dieses Nicht-Ansprechen auf WY-14643 im Überexpressionsexperiment, könnte eventuell in Verbindung mit der Inkubation der Zellen mit Adenoviren stehen.

Als Folge des *Bhlhe40*-Knockdowns ist die relative mRNA-Expression von *Fabp1* sowohl in den DMSO-Kontrollzellen, als auch in den mit WY-14643 behandelten Zellen, signifikant vermindert (s. Abbildung 37). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass BHLHE40 für die volle Induktion von *Fabp1* benötigt wird. Interessant ist, dass die Minderung der *Fabp1*-Expression im *Bhlhe40*-Knockdown nicht durch Behandlung mit WY-14643 gerettet werden kann. Dies deutet auf eine Interaktion von BHLHE40 mit PPAR α hin, durch welche die Expression des PPAR α -Zielgens *Fabp1* gehemmt wird.

4.2.2.3 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression bzw. eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von *Angptl4*

Angptl4 stellt ebenfalls ein bekanntes PPAR α -Zielgen dar (Rakhshandehroo, Knoch et al. 2010) und spielt eine bedeutende Rolle im Lipidmetabolismus, in welchem es das Enzym Lipoproteinlipase hemmt (Li 2006, Yau, Wang et al. 2009, Zhu, Goh et al. 2012). Die Lipoproteinlipase katalysiert die Hydrolyse von Triglyzeriden und stellt dem Organismus dadurch nicht-veresterte Fettsäuren und 2-Monoacylglycerol zur Verfügung (Mead, Irvine et al. 2002). *Angptl4*-Knockout Mäuse (*Angptl4*^{-/-}) zeigen eine geringere Triglyzeridkonzentration im Blut, bedingt durch den erhöhten Abbau und die verminderte Produktion von *very low density lipoproteins* (VLDLs) (Desai, Lee et al. 2007). Die Überexpression von *Angptl4* in der Leber hingegen, führt zu Hypertriglyzeridämie und einer reduzierten Aktivität der Lipoproteinlipase (Koster, Chao et al. 2005).

Ebenso wie bei den restlichen, untersuchten PPAR α -Zielgenen, wird auch die mRNA-Expression von *Angptl4* im *Bhlhe40*-Knockdown-Experiment durch die Inkubation mit PPAR α -Agonist WY-14643 signifikant gesteigert (s. Abbildung 37). Diese Induktion der *Angptl4*-mRNA-Expression durch WY-14643, ist im *Bhlhe40*-Überexpressions-Experiment, wie auch bei *Fabp1*, nicht zu sehen (s. Abbildung 39).

Als Antwort auf den *Bhlhe40*-Knockdown nimmt die *Angptl4*-Expression, sowohl in den mit DMSO behandelten Zellen, als auch in den mit WY-14643 behandelten Zellen, signifikant ab (s. Abbildung 37). Die *Bhlhe40*-Überexpression hingegen, führt unter beiden Bedingungen zu einer Zunahme der *Angptl4*-Expression verglichen mit den Kontrollzellen (s. Abbildung 39). Allerdings ist diese Zunahme nur bei den mit DMSO inkubierten Zellen signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, dass BHLHE40 nötig erscheint, für die volle Aktivierung der *Angptl4*-Expression.

In Kapitel 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass BHLHE40 in der Leber von C57BL/6J Mäusen unter Fütterung hochreguliert wird (s. Abbildung 27). Für den menschlichen Organismus ist bekannt, dass die Konzentration von ANGPTL4 im Plasma unter Fasten, reduzierter Kalorienaufnahme und Sport ansteigt, vermutlich vermittelt durch eine erhöhte Menge an freien Fettsäuren (Kersten, Lichtenstein et al. 2009). Diese Ergebnisse erscheinen zusammen genommen auf den ersten Blick widersprüchlich: BHLHE40 wird unter Fütterung hochreguliert, ANGPTL4 wird im gefasteten Zustand hochreguliert, dennoch soll BHLHE40 nötig sein für die volle Induktion der *Angptl4*-Expression. Eine Erklärung könnte eine Art Feedforward-Mechanismus sein. Durch die Hochregulation von BHLHE40 unter Fütterung bereitet sich der Organismus bereits auf die nächste Fastenperiode vor, in der BHLHE40 bzw. ANGPTL4 dann benötigt werden, für die adäquate Reaktion auf eine erhöhte Konzentration freier Fettsäuren im Plasma.

4.2.2.4 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression bzw. eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von *Hmgcs2*

Hmgcs2 ist ein PPAR α -Zielgen, welches im Rahmen der Ketogenese eine bedeutende Rolle bei der Anpassung von Organismen an Nahrungsentzug spielt (Rakhshandehroo, Knoch et al. 2010). Acetyl-CoA, Endprodukt der Fettsäureoxidation, bildet das Ausgangssubstrat für die Ketogenese, bei der zunächst Acetoacetyl-CoA aus zwei Molekülen Acetyl-CoA gebildet wird. Anschließend wird ein drittes Molekül Acetyl-CoA angelagert und es entsteht 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA. Diese Reaktion wird katalysiert durch das mitochondriale Enzym HMGCS2 und stellt gleichzeitig den limitierenden Schritt im Prozess der Ketogenese dar (Grabacka, Pierzchalska et al. 2016).

Es konnte in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die mRNA-Expression von *Hmgcs2* in den Kontrollzellen durch Inkubation mit PPAR α -Agonist WY-14643 signifikant steigern lässt. Dies gilt sowohl für das *Bhlhe40*-Überexpression-Experiment (s. Abbildung 39), als auch für das *Bhlhe40*-Knockdown-Experiment (s. Abbildung 37). Somit bestätigt dieses Ergebnis *Hmgcs2* als PPAR α -Zielgen.

Abbildung 37 zeigt weiterhin, dass die Expression von *Hmgcs2* nach *Bhlhe40*-Knockdown, sowohl in den mit DMSO inkubierten Zellen, als auch in den mit WY-14643 inkubierten Zellen, signifikant reduziert war. Ähnliches konnte bereits für die Gene *Pdk4*, *Fabp1* und *Angptl4* gezeigt werden (s. Abbildung 37). Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Genen, beeinflusste die *Bhlhe40*-Überexpression die Expression von *Hmgcs2* allerdings wesentlich stärker und hatte den exakt entgegengesetzten Effekt wie der *Bhlhe40*-Knockdown. In Reaktion auf die *Bhlhe40*-Überexpression, stieg die *Hmgcs2*-Expression unter DMSO- und WY-14643-Behandlung signifikant an (s. Abbildung 39). Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass BHLHE40 nicht nur für die volle Induktion der *Hmgcs2*-Expression nötig ist, sondern auch im Stande ist, die *Hmgcs2*-Expression weiter zu steigern.

Diese Aussage mag zunächst paradox erscheinen. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die BHLHE40-Expression in der Leber unter Fütterung gesteigert wird (s. Kapitel 3.2.1, Abbildung 27). Weiterhin ist bekannt, dass HMGCS2 ein Schlüsselenzym der Ketogenese darstellt, einem Prozess, der vornehmlich unter Nahrungsentzug stattfindet, wenn nicht genügend Glukose vorhanden ist, um den Energiebedarf des Organismus zu decken (Grabacka, Pierzchalska et al. 2016). Dennoch deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass BHLHE40 notwendig ist, für die volle Expression von *Hmgcs2* (s. Abbildung 37 und 39).

Neben der Ketose unter Nahrungsentzug, ist allerdings eine zweite Form der Ketose bekannt. Diese steht in Zusammenhang mit Diabetes mellitus und kann als eine Art Schutzmechanismus verstanden werden (Balasubramanyam, Nalini et al. 2008, Kruljac, Cacic et al. 2017). Diabetes mellitus ist unter anderem gekennzeichnet durch eine Hyperglykämie und einen Mangel an Glukose in den insulinresistenten Zellen (Diabetes mellitus Typ II), das heißt es ist genügend Glukose im Blut vorhanden, die aber nicht in die Zellen aufgenommen werden kann. Bezüglich der Hyperglykämie ähnelt der Diabetes mellitus daher eher dem metabolischen Zustand nach Nahrungsaufnahme. Aus der Literatur ist bekannt, dass BHLHE40 in der Leber durch Glukose hochreguliert wird (Kato, Kawamoto et al. 2014).

Eine Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnte demnach sein, dass BHLHE40 für die Ketose unter Hyperglykämie verantwortlich oder zumindest mitverantwortlich ist, indem es die Expression von *Hmgcs2* steigert und dadurch die Ketogenese fördert.

Um einschätzen zu können, ob diese Erkenntnisse auch *in vivo* von Bedeutung sind, wäre der nächste Schritt ein *Gain-of-Function*-Experiment mit einer leberspezifischen *Bhlhe40*-Überexpression, mit dem Ziel, deren Auswirkungen auf PPAR α -Zielgene und die Ketogenese genauer zu untersuchen.

4.2.3 Einfluss von BHLHE40 auf ChREBP-Zielgene

ChREBP ist ein Glukose-sensitiver Transkriptionsfaktor, der beteiligt ist an der Regulation der Lipogenese, sowie des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber und eine negative Feedback-Schleife mit BHLHE40 bildet (Yamashita, Takenoshita et al. 2001, Iizuka und Horikawa 2008, Iizuka und Horikawa 2008). Um die Folgen und das Ausmaß der Interaktion von ChREBP und BHLHE40 noch besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit die Effekte einer *Bhlhe40*-

Überexpression bzw. eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die ChREBP-Zielgene *Txnip* und *Rgs16* genauer untersucht. Während BHLHE40 bisher aus der Literatur vorwiegend als Repressor der Transkription bekannt ist (Davis und Turner 2001, Cho, Noshiro et al. 2009), deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine Funktion von BHLHE40 als Aktivator sowohl von ChREBP-, als auch von PPAR α -Zielgenen hin.

4.2.3.1 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression bzw. eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von *Txnip*

Txnip ist ein bekanntes ChREBP-Zielgen und stellt einen entscheidenden Regulator des Glukose- und Fettmetabolismus dar (Minn, Hafele et al. 2005, Alhawiti, Al Mahri et al. 2017). Eine hohe Glukosekonzentration fördert die Expression von *Txnip*, während Insulin die *Txnip*-Expression hemmt (Parikh, Carlsson et al. 2007). Mäuse, die von einer natürlichen TXNIP-Defizienz betroffen sind, entwickeln einen Phänotyp, der gekennzeichnet ist durch Hyperlipidämie, Hypoglykämie und Ketose (Chutkow, Patwari et al. 2008).

Abbildung 40 stellt die Effekte eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Expression von *Txnip* dar. Nach *Bhlhe40*- bzw. Kontrollknockdown wurden die Zellen entweder mit *low glucose* Medium oder mit *high glucose* Medium inkubiert. Es zeigt sich, dass die mRNA-Expression von *Txnip* in den Kontrollzellen signifikant durch eine hohe Glukosekonzentration gesteigert wird. Weiterhin ist ersichtlich, dass der *Bhlhe40*-Knockdown unter einer niedrigen Glukosekonzentration keine signifikanten Auswirkungen auf die *Txnip*-Expression hat. Werden die Zellen allerdings mit einem *high glucose* Medium inkubiert, führt der *Bhlhe40*-Knockdown zu einer signifikant niedrigeren mRNA-Expression von *Txnip*.

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 gezeigt, wird BHLHE40 unter Fasten weniger stark exprimiert (s. Abbildung 27). Dies könnte erklären, warum die Expression von *Txnip* unter *low glucose* Medium kaum durch den *Bhlhe40*-Knockdown beeinflusst wird (s. Abbildung 40). Möglicherweise ist eine Mindestmenge an BHLHE40 nötig für die Beeinflussung der *Txnip*-Expression. Eine andere Erklärung könnte sein, dass neben BHLHE40 noch weitere Faktoren für die Wirkung auf *Txnip* notwendig sind, für die eine anabole Stoffwechsellage Voraussetzung ist. Steht auf der anderen Seite viel Glukose zur Verfügung, scheint BHLHE40 für die volle Induktion der *Txnip*-Expression notwendig zu sein (s. Abbildung 40).

Die Folgen einer *Bhlhe40*-Überexpression für die *Txnip*-Expression sind in Abbildung 42 dargestellt. Die *Bhlhe40*-Überexpression führt zu einer dosisabhängigen, signifikanten Steigerung der *Txnip*-Expression. Daraus folgt, dass BHLHE40 die mRNA-Expression des ChREBP-Zielgens *Txnip* fördert. Aus der Literatur ist allerdings auch der gegenteilige Effekt auf ChREBP-Zielgene bekannt. So wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression der ChREBP-Zielgene Fettsäure-Synthase (*fas*) und Leber-Pyruvat-Kinase (*lpk*) durch die Überexpression von *Bhlhe40* gehemmt wird (Iizuka und Horikawa 2008).

Um die Bedeutung dieser Ergebnisse *in vivo* genauer zu untersuchen, könnte in einem nächsten Schritt ein Mausmodell mit einer leberspezifischen *Bhlhe40*-Überexpression generiert werden und der Einfluss von Fütterung bzw. Fasten auf die *Txnip*-Expression gemessen werden.

4.2.3.2 Auswirkungen einer *Bhlhe40*-Überexpression bzw. eines *Bhlhe40*-Knockdowns auf die Aktivierung von *Rgs16*

Rgs16 ist ebenfalls ein ChREBP-Zielgen, das in der Leber gegen Ende einer Fastenperiode hochreguliert wird und hemmend auf die Fettsäureoxidation in den Hepatozyten wirkt (Pashkov, Huang et al. 2011).

Inwiefern BHLHE40 an der Regulation der *Rgs16*-Expression beteiligt ist, wurde mittels *Bhlhe40*-Knockdown bzw. *Bhlhe40*-Überexpression untersucht.

Nach *Bhlhe40*-Knockdown, wurden die Zellen entweder mit *low* oder *high glucose* Zellmedium inkubiert und anschließend jeweils die Menge der relativen *Rgs16* mRNA-Expression mittels qRT-PCR gemessen. Ebenso wie im Fall von *Txnip*, wird auch die *Rgs16*-Expression in den

Kontrollzellen durch eine hohe Glukosekonzentration signifikant gesteigert (s. Abbildung 41). Im Unterschied zu *Txnip*, reduziert der *Bhlhe40*-Knockdown die Expression von *Rgs16* sowohl bei hoher, als auch bei niedriger Glukosekonzentration signifikant (s. Abbildung 41). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BHLHE40 nötig ist, für die volle Induktion der *Rgs16*-Expression.

Als Antwort auf die *Bhlhe40*-Überexpression, wird die Expression von *Rgs16* signifikant gesteigert, wobei diese Steigerung der Genexpression unabhängig von der verwendeten Viruskonzentration ist (s. Abbildung 43).

Um die Bedeutung von BHLHE40 für die *Rgs16*-Expression und die Folgen für die Fettsäureoxidation *in vivo* besser einschätzen zu können, könnte in einem nächsten Versuch das Zusammenwirken beider Gene anhand eines Mausmodells mit leberspezifischer Überexpression und Feeding-/Fasting-Protokoll genauer analysiert werden.

4.3 Untersuchung neuer genomischer BHLHE40-Bindungsstellen in der Mäuseleber

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde nach neuen DNA-Bindungsstellen von BHLHE40 in der Leber gesucht. Die Methode der Wahl stellte hierbei die Chromatin-Immunpräzipitation dar. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich BHLHE40-DNA-Bindungsstellen vermutlich in der Nähe direkt regulierter Gene befinden. Untersucht wurden einige Gene, deren mRNA-Expression in den Voruntersuchungen am deutlichsten durch die BHLHE40-Depletion beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Dies waren im Einzelnen *Klf10*, *Dgat2* und *Ccnd2*.

Für das Genfragment nahe *Klf10* zeigte sich eine ca. 50-fache Anreicherung durch Immunpräzipitation mittels ChREBP-spezifischem Antikörper (s. Abbildung 46.A). Da *Klf10* ein bekanntes ChREBP-Zielgen ist (Poungvarin, Chang et al. 2015) in dessen Promotorregion bereits eine ChREBP-Bindungsstelle nachgewiesen wurde, wurde eine Anreicherung des untersuchten Genfragments durch den ChREBP-ChIP erwartet (Iizuka, Takeda et al. 2011). Die fehlende Signifikanz lässt sich durch die deutlichen Abweichungen in den Messwerten der einzelnen Mäuse erklären. Zusätzlich ist in Abbildung 46A eine signifikante, ca. 15-fache Anreicherung des untersuchten Genfragments nahe *Klf10* durch BHLHE40-Immunpräzipitation zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass BHLHE40 ebenso wie ChREBP innerhalb des untersuchten genomischen Fragments an die DNA bindet. Jedoch stellt das Fragment eine schwächere Bindungsstelle für BHLHE40, als für ChREBP dar. Für die ChREBP-Zielgene *Fas* und *Lpk* ist bekannt, dass ChREBP und BHLHE40 um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren und BHLHE40 dadurch in der Lage ist die Expression von *Fas* und *Lpk* zu hemmen (Iizuka und Horikawa 2008). Es wäre denkbar, dass ChREBP und BHLHE40 auch im Fall des Gens *Klf10*, um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Die stärkere Anreicherung nach ChREBP-ChIP könnte durch eine höhere Affinität von ChREBP für die DNA-Bindungsstelle erklärt werden.

Betrachtet man als nächstes das untersuchte genomische Fragment in der Nähe von *Dgat2*, ist eine schwache, aber signifikante Anreicherung nach ChREBP-ChIP ersichtlich (s. Abbildung 46B). Eine wesentlich stärkere, ca. 10-fache Anreicherung dieses genomischen Fragments ist allerdings durch Immunpräzipitation mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper zu detektieren (s. Abbildung 46B). Diese Anreicherung ist ebenfalls signifikant und zeigt, dass BHLHE40 in der Nähe von *Dgat2* verstärkt an DNA bindet.

Abbildung 46C stellt die Ergebnisse der Chromatin-Immunpräzipitation für das untersuchte Genfragment nahe *Ccnd2* dar. Während hier durch die ChREBP-ChIP keine Anreicherung des genomischen Fragments festgestellt werden konnte, zeigte sich eine signifikante, wenn auch geringe Anreicherung mittels BHLHE40-spezifischem Antikörper. Dies deutet auf eine schwache BHLHE40-Bindungsstelle in der Nähe von *Ccnd2* hin.

Nachdem durch die Chromatin-Immunpräzipitation nun einige Genregionen eingegrenzt werden konnten, in denen sich potenzielle neue BHLHE40-Bindungsstellen befinden, wäre ein nächster Schritt eine vollständige DNA-Sequenzierung der ChIP-Proben, um die

Bindungsstellen genauer zu spezifizieren und genomweit weitere BHLHE40-DNA-Bindungsstellen zu detektieren.

4.4 Bedeutung von BHLHE40 für den Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus

In der vorliegenden Arbeit konnten frühere Forschungsergebnisse bestätigt werden, wonach BHLHE40 direkt und indirekt – durch Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren – in die Regulation des Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus involviert ist. Es wurde nicht nur der Einfluss von BHLHE40 auf die Adipozyten-Differenzierung (s. Kapitel 3.1), sondern auch eine mögliche Rolle von BHLHE40 im Leberstoffwechsel (s. Kapitel 3.2), sowie genomische BHLHE40-Bindungsstellen in der Leber (s. Kapitel 3.3) untersucht.

Übergewicht, Fettleibigkeit und daraus entstehende Komorbiditäten wie Diabetes mellitus stellen ein immer größeres, gesundheitsgefährdendes Problem in der heutigen Gesellschaft dar (Field, Coakley et al. 2001, Pi-Sunyer 2009, Bhurosy und Jeewon 2014). Vor diesem Hintergrund sollte die vorliegende Arbeit dazu dienen einen tieferen Einblick in die Steuerung des Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus auf Zellebene zu erlangen, denn der Schlüssel zu einer erfolgreichen Präventions- und Bekämpfungsstrategie ist ein möglichst umfassendes Verständnis der grundlegenden Prozesse, die zur Entstehung von Übergewicht und Fettleibigkeit beitragen. Der Fokus lag dabei auf der Rolle von BHLHE40 in der Adipogenese und in der Regulation bestimmter Stoffwechselwege in der Leber.

In der bestehenden Literatur zu BHLHE40 wurde bereits vermutet, dass die Überexpression von BHLHE40 zu einer Hemmung der Adipogenese führt (Yun, Maecker et al. 2002, Park und Park 2012). Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (s. Kapitel 3.1.3.4). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von BHLHE40 den gegenteiligen Effekt hat und die Adipogenese fördert (s. Kapitel 3.1.4.4). BHLHE40 könnte demnach eine weitere Stellschraube in der Regulation der Adipogenese darstellen und ein möglicher Ansatzpunkt für die Entwicklung von Präventiv- und Therapiemaßnahmen gegen Übergewicht und Adipositas sein. Allerdings muss sicherlich beachtet werden, dass es sich bei den vorliegenden Daten um Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten mit einer etablierten, immortalisierten Zelllinie (3T3-L1 Zelllinie) handelt und dass die Untersuchung an Zellverbänden nicht einfach auf die komplexen Stoffwechselvorgänge in einem Organismus *in vivo* übertragen werden können.

Für die Untersuchung des Einflusses von BHLHE40 auf den Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus in der Leber wurden primäre Hepatozyten verwendet. Der Vorteil von frisch isolierten Primärzellen besteht darin, dass sie das *in vivo* Verhalten von Zellen deutlich besser widerspiegeln als immortalisierte Zelllinien. In der Vergangenheit wurde BHLHE40 bereits über ein Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel ChREBP oder SREBP-1C, mit der Steuerung des Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus in der Leber in Verbindung gebracht (Iizuka und Horikawa 2008, Shen, Cui et al. 2014, Tian, Wu et al. 2018). Ein der vorliegenden Arbeit vorausgehendes Pilotexperiment (s. Kapitel 1.4.1) lieferte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen BHLHE40 und der Regulation verschiedener Stoffwechselwege in der Leber. Ausgehend von den Daten aus diesem Pilotexperiment, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von BHLHE40 auf bestimmte ChREBP- und PPAR α -Zielgene genauer analysiert (s. Kapitel 3.2.3 und Kapitel 3.2.4). Dabei konnten Hinweise für eine mögliche regulatorische Funktion von BHLHE40 im Prozess der Ketogenese gefunden werden, ein Prozess, der bekanntlich unter Nahrungsentzug auftritt. Dieses Ergebnis ist insofern höchstinteressant, als dass BHLHE40 die Expression des Schlüsselenzyms der Ketogenese (HMGCS2) zu fördern scheint (s. Abbildung 39B), BHLHE40 selbst allerdings unter Fütterung hochreguliert wird (s. Abbildung 27 und Abbildung 28). Jedoch könnte dieses scheinbar widersprüchliche Ergebnis erste Anhaltspunkte liefern, um den pathologischen Mechanismus hinter der Entstehung einer Ketose bei Diabetikern besser zu verstehen und dabei helfen präventive Maßnahmen zu entwickeln. Charakteristisch bei Diabetes mellitus ist unter anderem die Hyperglykämie,

welche mit dem Zustand nach Nahrungsaufnahme vergleichbar ist, einem Zustand in welchem BHLHE40 hochreguliert ist. Allerdings handelt es sich hierbei ebenfalls um ein *in vitro* Experiment, das die komplexen Stoffwechselforgänge *in vivo* nur limitiert abbilden kann. Die physiologische Relevanz *in vivo* könnte im Mausmodell weiter untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Untersuchung neuer Funktionen des Transkriptionsfaktors BHLHE40

BHLHE40 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der basic helix-loop-helix Proteine, der hauptsächlich als Transkriptionsrepressor fungiert. Die repressive Wirkung wird meist via direkter DNA-Bindung oder indirekt, über Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, vermittelt. BHLHE40 ist involviert in die Steuerung der Adipogenese im Fettgewebe. Darüber hinaus lieferten Voruntersuchungen zu der vorliegenden Arbeit Hinweise darauf, dass BHLHE40, über die Beeinflussung von PPAR α - und ChREBP-Zielgenen, an der Regulation des Energiestoffwechsels in der Leber beteiligt ist. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Rolle von BHLHE40 während der Adipozytendifferenzierung noch besser zu verstehen, sowie potenzielle neue Funktionen von BHLHE40 im Energiemetabolismus der Leber aufzudecken. In diesem Zusammenhang wurde zusätzlich mittels Chromatin-Immunpräzipitation nach neuen genomischen BHLHE40-Bindungsstellen in der Leber gesucht.

Zunächst konnten die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass eine *Bhlhe40*-Überexpression in 3T3-L1 Zellen zu einer Inhibition der Adipogenese führt. Diese hemmende Wirkung scheint allerdings nicht, wie vorgeschlagen, über eine direkte Repression der *Ppar γ 2*-Promotoraktivität vermittelt zu werden. Vielmehr deuten Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass BHLHE40 die Differenzierungskaskade *upstream* von PPAR2 hemmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein *Bhlhe40*-Knockdown den gegenteiligen Effekt auf 3T3-L1 Zellen hat und die Adipozytendifferenzierung fördert.

Anhand von *Bhlhe40*-Knockdown und -Überexpression in primären murinen Hepatozyten, konnte im zweiten Teil dieser Arbeit festgestellt werden, dass BHLHE40 die Expression bestimmter PPAR α - und ChREBP-Zielgene fördert. Insbesondere die Expression von *Hmgcs2*, limitierendes Enzym in der Ketogenese, wird durch *Bhlhe40*-Knockdown und *Bhlhe40*-Überexpression signifikant reguliert. Zusammen mit der Tatsache, dass BHLHE40 unter Fütterung in der Leber hochreguliert wird, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass BHLHE40 an der Entstehung der diabetischen Ketose unter Hyperglykämie beteiligt ist.

Zuletzt wurden mittels BHLHE40-spezifischer Chromatin-Immunpräzipitation in Leberproben von gefütterten, männlichen C57BL/6J Mäusen neue genomische BHLHE40-Bindungsstellen in der Nähe der Gene *Klf10* und *Dgat2* detektiert.

6. Summary

Deciphering novel functions of the transcriptional regulator BHLHE40

BHLHE40 is a transcription factor that belongs to the basic helix-loop-helix protein superfamily and acts mainly as a transcriptional repressor. Its repressive function is primarily exerted by either direct DNA-binding or by protein-protein interaction with other transcription factors. In adipose tissue BHLHE40 is involved in the regulation of adipogenesis. Moreover, prior unpublished work suggests that BHLHE40 also takes part in the control of energy metabolism in the liver by influencing PPAR α and ChREBP target genes. The objective of the present thesis was to gain a better understanding of the role of BHLHE40 in adipocyte differentiation, as well as to investigate potential novel functions of BHLHE40 in controlling gene expression of metabolic pathways in the liver. Additionally, chromatin immunoprecipitation was used to detect genomic BHLHE40-binding sites in the liver.

First, data confirmed previous findings that 3T3-L1 cells overexpressing *Bhlhe40*, indeed, show diminished differentiation into adipocytes. However, this inhibitory effect does not seem to be mediated by direct repression of *Ppar γ 2* promoter activity as proposed previously. In fact, my data indicates that BHLHE40 inhibits adipocyte differentiation upstream of PPAR γ 2. Furthermore, a knockdown of *Bhlhe40* has the opposite effect on 3T3-L1 cells and promotes adipocyte differentiation.

In the second part of the thesis, based on *Bhlhe40* knockdown and overexpression in murine primary hepatocytes it was shown that BHLHE40 strengthens the expression of specific PPAR α and ChREBP target genes. In particular, *Bhlhe40* knockdown as well as *Bhlhe40* overexpression both influence the expression of *Hmgcs2*, a rate-limiting enzyme in ketogenesis. Combined with the finding that feeding leads to upregulation of BHLHE40 in liver, these data suggest that BHLHE40 is involved in the development of diabetic ketosis in hyperglycemic patients.

In the third part of this thesis, chromatin immunoprecipitation of liver samples of fed male C57BL/6J mice was used to detect novel genomic BHLHE40-binding sites close to genes *Klf10* and *Dgat2*.

7. Literaturverzeichnis

Alhawiti, N. M., S. Al Mahri, M. A. Aziz, S. S. Malik und S. Mohammad (2017). "TXNIP in Metabolic Regulation: Physiological Role and Therapeutic Outlook." Curr Drug Targets **18**(9): 1095-1103.

Antonevich, T. und R. Taneja (1999). "Assignment1 of the human Stra13 gene (STRA13) to chromosome 3p26 by in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet **85**(3-4): 254-255.

Aranda, A. und A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." Physiol Rev **81**(3): 1269-1304.

Atchley, W. R. und W. M. Fitch (1997). "A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5172-5176.

Atshaves, B. P., G. G. Martin, H. A. Hostetler, A. L. McIntosh, A. B. Kier und F. Schroeder (2010). "Liver fatty acid-binding protein and obesity." J Nutr Biochem **21**(11): 1015-1032.

Balasubramanyam, A., R. Nalini, C. S. Hampe und M. Maldonado (2008). "Syndromes of ketosis-prone diabetes mellitus." Endocr Rev **29**(3): 292-302.

Bhurosy, T. und R. Jeewon (2014). "Overweight and obesity epidemic in developing countries: a problem with diet, physical activity, or socioeconomic status?" ScientificWorldJournal **2014**: 964236.

Boudjelal, M., R. Taneja, S. Matsubara, P. Bouillet, P. Dolle und P. Chambon (1997). "Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells." Genes Dev **11**(16): 2052-2065.

Brown, M. S. und J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." Cell **89**(3): 331-340.

Campbell, N. A., J. B. Reece, L. A. Urry, M. A. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky und R. B. Jackson (2009). Biologie. München, Pearson Deutschland GmbH.

Chawla, A., E. J. Schwarz, D. D. Dimaculangan und M. A. Lazar (1994). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation." Endocrinology **135**(2): 798-800.

Chen, G., G. Liang, J. Ou, J. L. Goldstein und M. S. Brown (2004). "Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11245-11250.

Chmurzynska, A. (2006). "The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism." J Appl Genet **47**(1): 39-48.

Cho, Y., M. Noshiro, M. Choi, K. Morita, T. Kawamoto, K. Fujimoto, Y. Kato und M. Makishima (2009). "The basic helix-loop-helix proteins differentiated embryo chondrocyte (DEC) 1 and DEC2 function as corepressors of retinoid X receptors." Mol Pharmacol **76**(6): 1360-1369.

- Choi, S. M., H. J. Cho, H. Cho, K. H. Kim, J. B. Kim und H. Park (2008). "Stra13/DEC1 and DEC2 inhibit sterol regulatory element binding protein-1c in a hypoxia-inducible factor-dependent mechanism." Nucleic Acids Res **36**(20): 6372-6385.
- Chutkow, W. A., P. Patwari, J. Yoshioka und R. T. Lee (2008). "Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production." J Biol Chem **283**(4): 2397-2406.
- Cook, K. S., C. R. Hunt und B. M. Spiegelman (1985). "Developmentally regulated mRNAs in 3T3-adipocytes: analysis of transcriptional control." J Cell Biol **100**(2): 514-520.
- Crick, F. (1958). "On protein synthesis." Symp Soc Exp Biol. **12**: 138-163.
- Crick, F. (1970). "Central dogma of molecular biology." Nature **227**: 561-563.
- Darlington, G. J., S. E. Ross und O. A. MacDougald (1998). "The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation." J Biol Chem **273**(46): 30057-30060.
- Darlington, T. K., K. Wager-Smith, M. F. Ceriani, D. Staknis, N. Gekakis, T. D. Steeves, C. J. Weitz, J. S. Takahashi und S. A. Kay (1998). "Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim." Science **280**(5369): 1599-1603.
- Davis, R. L. und D. L. Turner (2001). "Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning." Oncogene **20**(58): 8342-8357.
- Davis, R. L., H. Weintraub und A. B. Lassar (1987). "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts." Cell **51**(6): 987-1000.
- Dawson, S. R., D. L. Turner, H. Weintraub und S. M. Parkhurst (1995). "Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression." Mol Cell Biol **15**(12): 6923-6931.
- Desai, U., E. C. Lee, K. Chung, C. Gao, J. Gay, B. Key, G. Hansen, D. Machajewski, K. A. Platt, A. T. Sands, M. Schneider, I. Van Sligtenhorst, A. Suwanichkul, P. Vogel, N. Wilganowski, J. Wingert, B. P. Zambrowicz, G. Landes und D. R. Powell (2007). "Lipid-lowering effects of anti-angiopoietin-like 4 antibody recapitulate the lipid phenotype found in angiopoietin-like 4 knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(28): 11766-11771.
- Desvergne, B. und W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-688.
- Farmer, S. R. (2006). "Transcriptional control of adipocyte formation." Cell Metab **4**(4): 263-273.
- Ferre, P. und F. Foufelle (2010). "Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c." Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**: 83-92.
- Field, A. E., E. H. Coakley, A. Must, J. L. Spadano, N. Laird, W. H. Dietz, E. Rimm und G. A. Colditz (2001). "Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period." Arch Intern Med **161**(13): 1581-1586.
- Fisher, A. L., S. Ohsako und M. Caudy (1996). "The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain." Mol Cell Biol **16**(6): 2670-2677.

Foufelle, F. und P. Ferre (2002). "New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c." Biochem J **366**(Pt 2): 377-391.

Fujita, Y., M. Makishima und U. K. Bhawal (2016). "Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice." Biochem Biophys Res Commun **469**(3): 477-482.

Furuhashi, M. und G. S. Hotamisligil (2008). "Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets." Nat Rev Drug Discov **7**(6): 489-503.

Gekakis, N., D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi und C. J. Weitz (1998). "Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism." Science **280**(5369): 1564-1569.

Grabacka, M., M. Pierzchalska, M. Dean und K. Reiss (2016). "Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPARalpha." Int J Mol Sci **17**(12).

Graw, J. (2015). Genetik. Berlin Heidelberg, Springer Verlag.

Green, H. und O. Kehinde (1975). "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion." Cell **5**(1): 19-27.

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

Hampsey, M. (1998). "Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery." Microbiol Mol Biol Rev. **62**(2): 465-503.

Harris, R. A., M. M. Bowker-Kinley, B. Huang und P. Wu (2002). "Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex." Adv Enzyme Regul **42**: 249-259.

Honma, S., T. Kawamoto, Y. Takagi, K. Fujimoto, F. Sato, M. Noshiro, Y. Kato und K. Honma (2002). "Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock." Nature **419**(6909): 841-844.

Hunt, C. R., J. H. Ro, D. E. Dobson, H. Y. Min und B. M. Spiegelman (1986). "Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3786-3790.

Iizuka, K. und Y. Horikawa (2008). "ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome." Endocr J **55**(4): 617-624.

Iizuka, K. und Y. Horikawa (2008). "Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping." Biochem Biophys Res Commun **374**(1): 95-100.

Iizuka, K., J. Takeda und Y. Horikawa (2011). "Kruppel-like factor-10 is directly regulated by carbohydrate response element-binding protein in rat primary hepatocytes." Biochem Biophys Res Commun **412**(4): 638-643.

Inuzuka, H., R. Nanbu-Wakao, Y. Masuho, M. Muramatsu, H. Tojo und H. Wakao (1999). "Differential regulation of immediate early gene expression in preadipocyte cells through multiple signaling pathways." Biochem Biophys Res Commun **265**(3): 664-668.

Issemann, I., R. Prince, J. Tugwood und S. Green (1992). "A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation?" Biochem Soc Trans **20**(4): 824-827.

- Jarjour, N. N., T. R. Bradstreet, E. A. Schwarzkopf, M. E. Cook, C. W. Lai, S. C. Huang, R. Taneja, T. S. Stappenbeck, S. J. Van Dyken, J. F. Urban, Jr. und B. T. Edelson (2020). "BHLHE40 Promotes TH2 Cell-Mediated Antihelminth Immunity and Reveals Cooperative CSF2RB Family Cytokines." J Immunol **204**(4): 923-932.
- Jeong, Y. S., D. Kim, Y. S. Lee, H. J. Kim, J. Y. Han, S. S. Im, H. K. Chong, J. K. Kwon, Y. H. Cho, W. K. Kim, T. F. Osborne, J. D. Horton, H. S. Jun, Y. H. Ahn, S. M. Ahn und J. Y. Cha (2011). "Integrated expression profiling and genome-wide analysis of ChREBP targets reveals the dual role for ChREBP in glucose-regulated gene expression." PLoS One **6**(7): e22544.
- Kanelis, V., L. Donaldson, D. R. Muhandiram, D. Rotin, J. D. Forman-Kay und L. E. Kay (2000). "Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: application to modular binding domain complexes." J Biomol NMR **16**(3): 253-259.
- Kato, Y., T. Kawamoto, K. Fujimoto und M. Noshiro (2014). "DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 coordinate physiological processes, including circadian rhythms in response to environmental stimuli." Curr Top Dev Biol **110**: 339-372.
- Kawamoto, T., M. Noshiro, F. Sato, K. Maemura, N. Takeda, R. Nagai, T. Iwata, K. Fujimoto, M. Furukawa, K. Miyazaki, S. Honma, K. Honma und Y. Kato (2004). "A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation." Biochem Biophys Res Commun **313**(1): 117-124.
- Kersten, S., L. Lichtenstein, E. Steenbergen, K. Mudde, H. F. Hendriks, M. K. Hesselink, P. Schrauwen und M. Muller (2009). "Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(6): 969-974.
- Kim, J. B., H. M. Wright, M. Wright und B. M. Spiegelman (1998). "ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4333-4337.
- Klambt, C., E. Knust, K. Tietze und J. A. Campos-Ortega (1989). "Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*." EMBO J **8**(1): 203-210.
- Kliwer, S. A., K. Umesono, D. J. Noonan, R. A. Heyman und R. M. Evans (1992). "Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors." Nature **358**(6389): 771-774.
- Kochanek, S. (2001). "Gentransfer mit adenoviralen Vektoren." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **44**(11): 1031-1037.
- Koster, A., Y. B. Chao, M. Mosior, A. Ford, P. A. Gonzalez-DeWhitt, J. E. Hale, D. Li, Y. Qiu, C. C. Fraser, D. D. Yang, J. G. Heuer, S. R. Jaskunas und P. Eacho (2005). "Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism." Endocrinology **146**(11): 4943-4950.
- Kruljac, I., M. Cacic, P. Cacic, V. Ostojic, M. Stefanovic, A. Sikic und M. Vrkljan (2017). "Diabetic ketosis during hyperglycemic crisis is associated with decreased all-cause mortality in patients with type 2 diabetes mellitus." Endocrine **55**(1): 139-143.

- Kulkarni, S. S., F. Salehzadeh, T. Fritz, J. R. Zierath, A. Krook und M. E. Osler (2012). "Mitochondrial regulators of fatty acid metabolism reflect metabolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus." Metabolism **61**(2): 175-185.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings und S. M. Reppert (1999). "mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop." Cell **98**(2): 193-205.
- Latchman, D. S. (2004). Eukaryotic transcription factors. London San Diego (Calif.), Elsevier Academic Press.
- Leone, T. C., C. J. Weinheimer und D. P. Kelly (1999). "A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7473-7478.
- Li, C. (2006). "Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4." Curr Opin Lipidol **17**(2): 152-156.
- Li, C., B. Zhu, Y. M. Son, Z. Wang, L. Jiang, M. Xiang, Z. Ye, K. E. Beckermann, Y. Wu, J. W. Jenkins, P. J. Siska, B. G. Vincent, Y. S. Prakash, T. Peikert, B. T. Edelson, R. Taneja, M. H. Kaplan, J. C. Rathmell, H. Dong, T. Hitosugi und J. Sun (2019). "The Transcription Factor Bhlhe40 Programs Mitochondrial Regulation of Resident CD8(+) T Cell Fitness and Functionality." Immunity **51**(3): 491-507 e497.
- Li, Y., M. Xie, X. Song, S. Gragen, K. Sachdeva, Y. Wan und B. Yan (2003). "DEC1 negatively regulates the expression of DEC2 through binding to the E-box in the proximal promoter." J Biol Chem **278**(19): 16899-16907.
- MacDougald, O. A. und M. D. Lane (1995). "Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation." Annu Rev Biochem **64**: 345-373.
- Mandard, S., M. Muller und S. Kersten (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." Cell Mol Life Sci **61**(4): 393-416.
- Massari, M. E. und C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol **20**(2): 429-440.
- McHill, A. W. und K. P. Wright, Jr. (2017). "Role of sleep and circadian disruption on energy expenditure and in metabolic predisposition to human obesity and metabolic disease." Obes Rev **18 Suppl 1**: 15-24.
- Mead, J. R., S. A. Irvine und D. P. Ramji (2002). "Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease." J Mol Med (Berl) **80**(12): 753-769.
- Minn, A. H., C. Hafele und A. Shalev (2005). "Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis." Endocrinology **146**(5): 2397-2405.
- Miyazaki, K., T. Kawamoto, K. Tanimoto, M. Nishiyama, H. Honda und Y. Kato (2002). "Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes." J Biol Chem **277**(49): 47014-47021.
- Miyazaki, K., M. Miyazaki, Y. Guo, N. Yamasaki, M. Kanno, Z. Honda, H. Oda, H. Kawamoto und H. Honda (2010). "The role of the basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 in the regulatory T cells." J Immunol **185**(12): 7330-7339.

- Morgan, A. A. und E. Rubenstein (2013). "Proline: the distribution, frequency, positioning, and common functional roles of proline and polyproline sequences in the human proteome." PLoS One **8**(1): e53785.
- Morrison, S. und S. L. McGee (2015). "3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages." Adipocyte **4**(4): 295-302.
- Murre, C., G. Bain, M. A. van Dijk, I. Engel, B. A. Furnari, M. E. Massari, J. R. Matthews, M. W. Quong, R. R. Rivera und M. H. Stuver (1994). "Structure and function of helix-loop-helix proteins." Biochim Biophys Acta **1218**(2): 129-135.
- Murre, C., P. S. McCaw und D. Baltimore (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." Cell **56**(5): 777-783.
- Noshiro, M., M. Furukawa, S. Honma, T. Kawamoto, T. Hamada, K. Honma und Y. Kato (2005). "Tissue-specific disruption of rhythmic expression of Dec1 and Dec2 in clock mutant mice." J Biol Rhythms **20**(5): 404-418.
- Noshiro, M., T. Kawamoto, A. Nakashima, N. Ozaki, M. Saeki, K. Honda, K. Fujimoto und Y. Kato (2020). "DEC1 regulates the rhythmic expression of PPARgamma target genes involved in lipid metabolism in white adipose tissue." Genes Cells.
- Noshiro, M., T. Kawamoto, A. Nakashima, N. Ozaki, T. Ueno, M. Saeki, K. Honda, K. Fujimoto und Y. Kato (2018). "Deficiency of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 prevents obesity induced by a high-fat diet in mice." Genes Cells.
- Noshiro, M., E. Usui, T. Kawamoto, F. Sato, A. Nakashima, T. Ueshima, K. Honda, K. Fujimoto, S. Honma, K. Honma, M. Makishima und Y. Kato (2009). "Liver X receptors (LXRalpha and LXRBeta) are potent regulators for hepatic Dec1 expression." Genes Cells **14**(1): 29-40.
- Ow, J. R., Y. H. Tan, Y. Jin, A. G. Bahrivani und R. Taneja (2014). "Stra13 and Sharp-1, the non-grouchy regulators of development and disease." Curr Top Dev Biol **110**: 317-338.
- Ozaki, N., M. Noshiro, T. Kawamoto, A. Nakashima, K. Honda, U. Fukuzaki-Dohi, S. Honma, K. Fujimoto, K. Tanimoto, K. Tanne und Y. Kato (2012). "Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by RORalpha and their roles in adipogenesis." Genes Cells **17**(2): 109-121.
- Panda, S. (2016). "Circadian physiology of metabolism." Science **354**(6315): 1008-1015.
- Parent, M. E., M. El-Zein, M. C. Rousseau, J. Pintos und J. Siemiatycki (2012). "Night work and the risk of cancer among men." Am J Epidemiol **176**(9): 751-759.
- Parikh, H., E. Carlsson, W. A. Chutkow, L. E. Johansson, H. Storgaard, P. Poulsen, R. Saxena, C. Ladd, P. C. Schulze, M. J. Mazzini, C. B. Jensen, A. Krook, M. Bjornholm, H. Tornqvist, J. R. Zierath, M. Ridderstrale, D. Altshuler, R. T. Lee, A. Vaag, L. C. Groop und V. K. Mootha (2007). "TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans." PLoS Med **4**(5): e158.
- Park, B. Y., J. H. Jeon, Y. Go, H. J. Ham, J. E. Kim, E. K. Yoo, W. H. Kwon, N. H. Jeung, Y. H. Jeon, S. H. Koo, B. G. Kim, L. He, K. G. Park, R. A. Harris und I. K. Lee (2018). "PDK4 Deficiency Suppresses Hepatic Glucagon Signaling by Decreasing cAMP Levels." Diabetes **67**(10): 2054-2068.

- Park, Y. K. und H. Park (2010). "Prevention of CCAAT/enhancer-binding protein beta DNA binding by hypoxia during adipogenesis." J Biol Chem **285**(5): 3289-3299.
- Park, Y. K. und H. Park (2012). "Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) represses PPARgamma2 gene through interacting with CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta)." Mol Cells **33**(6): 575-581.
- Parkhurst, S. M., D. Bopp und D. Ish-Horowicz (1990). "X:A ratio, the primary sex-determining signal in Drosophila, is transduced by helix-loop-helix proteins." Cell **63**(6): 1179-1191.
- Paroush, Z., R. L. Finley, Jr., T. Kidd, S. M. Wainwright, P. W. Ingham, R. Brent und D. Ish-Horowicz (1994). "Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins." Cell **79**(5): 805-815.
- Pashkov, V., J. Huang, V. K. Parameswara, W. Kedzierski, D. M. Kurrasch, G. G. Tall, V. Esser, R. D. Gerard, K. Uyeda, H. C. Towle und T. M. Wilkie (2011). "Regulator of G protein signaling (RGS16) inhibits hepatic fatty acid oxidation in a carbohydrate response element-binding protein (ChREBP)-dependent manner." J Biol Chem **286**(17): 15116-15125.
- Pi-Sunyer, X. (2009). "The medical risks of obesity." Postgrad Med **121**(6): 21-33.
- Poungvarin, N., B. Chang, M. Imamura, J. Chen, K. Moolsuwan, C. Sae-Lee, W. Li und L. Chan (2015). "Genome-Wide Analysis of ChREBP Binding Sites on Male Mouse Liver and White Adipose Chromatin." Endocrinology **156**(6): 1982-1994.
- Rakhshandehroo, M., B. Knoch, M. Muller und S. Kersten (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." PPAR Res **2010**.
- Rangwala, S. M. und M. A. Lazar (2000). "Transcriptional control of adipogenesis." Annu Rev Nutr **20**: 535-559.
- Rauschmeier, R., C. Gustafsson, A. Reinhardt, A. G. N, L. Tortola, D. Cansever, S. Subramanian, R. Taneja, M. J. Rossner, M. H. Sieweke, M. Greter, R. Mansson, M. Busslinger und T. Kreslavsky (2019). "Bhlhe40 and Bhlhe41 transcription factors regulate alveolar macrophage self-renewal and identity." EMBO J **38**(19): e101233.
- Reinard, T. (2018). "Molekularbiologische Methoden 2.0." (2. Auflage): 328.
- Rosen, E. D., C. H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez und B. M. Spiegelman (2002). "C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway." Genes Dev **16**(1): 22-26.
- Rossner, M. J., J. Dorr, P. Gass, M. H. Schwab und K. A. Nave (1997). "SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation." Mol Cell Neurosci **9**(5-6): 460-475.
- Rubin, C. S., A. Hirsch, C. Fung und O. M. Rosen (1978). "Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells." J Biol Chem **253**(20): 7570-7578.
- Rushlow, C. A., A. Hogan, S. M. Pinchin, K. M. Howe, M. Lardelli und D. Ish-Horowicz (1989). "The Drosophila hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc." EMBO J **8**(10): 3095-3103.

- Russell, T. R. und R. Ho (1976). "Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F2alpha and 1-methyl-3-isobutyl xanthine." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(12): 4516-4520.
- Saladin, R., L. Fajas, S. Dana, Y. D. Halvorsen, J. Auwerx und M. Briggs (1999). "Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis." Cell Growth Differ **10**(1): 43-48.
- Sato, F., U. K. Bhawal, T. Yoshimura und Y. Muragaki (2016). "DEC1 and DEC2 Crosstalk between Circadian Rhythm and Tumor Progression." J Cancer **7**(2): 153-159.
- Sato, F., T. Kawamoto, K. Fujimoto, M. Noshiro, K. K. Honda, S. Honma, K. Honma und Y. Kato (2004). "Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1." Eur J Biochem **271**(22): 4409-4419.
- Schupp, M., F. Chen, E. R. Briggs, S. Rao, H. J. Pelzmann, A. R. Pessentheiner, J. G. Bogner-Strauss, M. A. Lazar, D. Baldwin und A. Prokesch (2013). "Metabolite and transcriptome analysis during fasting suggest a role for the p53-Ddit4 axis in major metabolic tissues." BMC Genomics **14**: 758.
- Schupp, M., A. G. Cristancho, M. I. Lefterova, E. A. Hanniman, E. R. Briggs, D. J. Steger, M. Qatanani, J. C. Curtin, J. Schug, S. A. Ochsner, N. J. McKenna und M. A. Lazar (2009). "Re-expression of GATA2 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma depletion to revert the adipocyte phenotype." J Biol Chem **284**(14): 9458-9464.
- Shen, L., A. Cui, Y. Xue, Y. Cui, X. Dong, Y. Gao, H. Yang, F. Fang und Y. Chang (2014). "Hepatic differentiated embryo-chondrocyte-expressed gene 1 (Dec1) inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (Srebp-1c) expression and alleviates fatty liver phenotype." J Biol Chem **289**(34): 23332-23342.
- Shen, M., T. Kawamoto, M. Teramoto, S. Makihira, K. Fujimoto, W. Yan, M. Noshiro und Y. Kato (2001). "Induction of basic helix-loop-helix protein DEC1 (BHLHB2)/Stra13/Sharp2 in response to the cyclic adenosine monophosphate pathway." Eur J Cell Biol **80**(5): 329-334.
- Shen, M., T. Kawamoto, W. Yan, K. Nakamasu, M. Tamagami, Y. Koyano, M. Noshiro und Y. Kato (1997). "Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 294-298.
- Shen, M., E. Yoshida, W. Yan, T. Kawamoto, K. Suardita, Y. Koyano, K. Fujimoto, M. Noshiro und Y. Kato (2002). "Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages." J Biol Chem **277**(51): 50112-50120.
- Skinner, M. K., A. Rawls, J. Wilson-Rawls und E. H. Roalson (2010). "Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature." Differentiation **80**(1): 1-8.
- Song, S., R. R. Attia, S. Connaughton, M. I. Niesen, G. C. Ness, M. B. Elam, R. T. Hori, G. A. Cook und E. A. Park (2010). "Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements." Mol Cell Endocrinol **325**(1-2): 54-63.
- Spiegelman, B. M. (1998). "PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor." Diabetes **47**(4): 507-514.

- Stevens, J. D., E. H. Roalson und M. K. Skinner (2008). "Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation." Differentiation **76**(9): 1006-1022.
- Strahl, B. D. und C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-45.
- Sun, H., B. Lu, R. Q. Li, R. A. Flavell und R. Taneja (2001). "Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice." Nat Immunol **2**(11): 1040-1047.
- Sun, H., M. G. Mattei und R. Taneja (1999). "Assignment of stra13 to the sub-telomeric region of mouse chromosome 6 by in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet **87**(3-4): 211-212.
- Sun, H. und R. Taneja (2000). "Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4058-4063.
- Sun, Y., L. Ng, W. Lam, C. K. Lo, P. T. Chan, Y. L. Yuen, P. F. Wong, D. S. Tsang, W. T. Cheung und S. S. Lee (2008). "Identification and characterization of a novel mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated and starvation-induced gene, Ppsig." Int J Biochem Cell Biol **40**(9): 1775-1791.
- Teramoto, M., K. Nakamasu, M. Noshiro, Y. Matsuda, O. Gotoh, M. Shen, S. Tsutsumi, T. Kawamoto, Y. Iwamoto und Y. Kato (2001). "Gene structure and chromosomal location of a human bHLH transcriptional factor DEC1 x Stra13 x SHARP-2/BHLHB2." J Biochem **129**(3): 391-396.
- Thomas, M. und C. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." Crit Rev Biochem Mol Biol. **41**(3): 105-178.
- Tian, J., J. L. Goldstein und M. S. Brown (2016). "Insulin induction of SREBP-1c in rodent liver requires LXRA/C/EBPbeta complex." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(29): 8182-8187.
- Tian, J., J. Wu, X. Chen, T. Guo, Z. J. Chen, J. L. Goldstein und M. S. Brown (2018). "BHLHE40, a third transcription factor required for insulin induction of SREBP-1c mRNA in rodent liver." Elife **7**.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari und B. M. Spiegelman (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." Genes Dev **8**(10): 1224-1234.
- Tontonoz, P., E. Hu und B. M. Spiegelman (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." Cell **79**(7): 1147-1156.
- Villares, R. und C. V. Cabrera (1987). "The achaete-scute gene complex of D. melanogaster: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc." Cell **50**(3): 415-424.
- Williamson, M. P. (1994). "The structure and function of proline-rich regions in proteins." Biochem J **297** (Pt 2): 249-260.
- Witte, N., M. Muenzner, J. Rietscher, M. Knauer, S. Heidenreich, A. M. Nuotio-Antar, F. A. Graef, R. Fedders, A. Tolkachov, I. Goehring und M. Schupp (2015). "The Glucose Sensor ChREBP Links De Novo Lipogenesis to PPARgamma Activity and Adipocyte Differentiation." Endocrinology **156**(11): 4008-4019.

Wolfe, R. R. (1998). "Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans." Am J Clin Nutr **67**(3 Suppl): 519S-526S.

Wrba, F., H. Dolznig und C. Mannhalter (2011). Genetik verstehen - Grundlagen der molekularen Biologie. Wien, Facultas Verlags- und Buchhandels AG.

Yamada, K. und K. Miyamoto (2005). "Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli." Front Biosci **10**: 3151-3171.

Yamashita, H., M. Takenoshita, M. Sakurai, R. K. Bruick, W. J. Henzel, W. Shillinglaw, D. Arnot und K. Uyeda (2001). "A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9116-9121.

Yau, M. H., Y. Wang, K. S. Lam, J. Zhang, D. Wu und A. Xu (2009). "A highly conserved motif within the NH2-terminal coiled-coil domain of angiotensin-like protein 4 confers its inhibitory effects on lipoprotein lipase by disrupting the enzyme dimerization." J Biol Chem **284**(18): 11942-11952.

Yun, Z., H. L. Maecker, R. S. Johnson und A. J. Giaccia (2002). "Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia." Dev Cell **2**(3): 331-341.

Zebisch, K., V. Voigt, M. Wabitsch und M. Brandsch (2012). "Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes." Anal Biochem **425**(1): 88-90.

Zhu, P., Y. Y. Goh, H. F. Chin, S. Kersten und N. S. Tan (2012). "Angiotensin-like 4: a decade of research." Biosci Rep **32**(3): 211-219.

Zhu, Y., C. Qi, J. R. Korenberg, X. N. Chen, D. Noya, M. S. Rao und J. K. Reddy (1995). "Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7921-7925.

Danksagung

Meinen herzlichen Dank an **Herrn Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach** für die Betreuung meiner externen Doktorarbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der FU Berlin. Vielen Dank für Ihre Unterstützung und Anregungen im Rahmen meiner Dissertation, die zügige Beantwortung inhaltlicher und organisatorischer Fragen und nicht zuletzt die Möglichkeit meine Ergebnisse vor Ihrer Arbeitsgruppe am Fachbereich zu präsentieren. Danke auch für die nützlichen Hinweise zur Bewerbung auf das Elsa-Neumann-Stipendium. Ihre Zeit und Ihr Engagement waren mir eine große Hilfe.

Ein besonderes Dankeschön an **Herrn Prof. Dr. Michael Schupp** vom Institut für Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation und die Chance, dieses Projekt in seiner Arbeitsgruppe umzusetzen. Michael, herzlichen Dank für deine hervorragende Betreuung: deine Tür stand wortwörtlich immer offen, du hattest immer wieder Zeit für Fragen und die Diskussion von Ergebnissen und hast mir bei Problemen mit Rat und Tat beigegeben. Deine Unterstützung und dein Optimismus haben mir geholfen, nicht aufzugeben und mein Forschungsprojekt zielstrebig zu verwirklichen. Vielen Dank für deine Zeit und Geduld.

Vielen Dank auch an **Dr. Linda van den Berg, Krista Kokki** und **Herrn Prof. Ville Hietakangas** von der Universität Helsinki für die Arbeit und durchgeführten Versuche, die letztendlich zu meiner Doktorarbeit geführt haben. Danke für die Überlassung der Daten und die Beantwortung meiner Fragen.

Herzlichen Dank an das **Team der Veterinärmedizinischen Bibliothek der FU Berlin** für die Beantwortung meiner Fragen rund um die Literaturrecherche und Formatierung meiner Dissertation.

Danke, Danke, Danke an **alle Mitglieder der AG Schupp**. Wir haben zusammen gelacht, geweint und diskutiert und ich möchte die Zeit mit euch nicht mehr missen. Vielen Dank für eure Freundschaft. Mein besonderer Dank gilt Manuela, Pamela und Till: mit eurem unermüdlichen Einsatz und eurer Geduld bei der Einarbeitung habt ihr mir, als „Laborfrischling“, wahnsinnig geholfen.

Last but not least, vielen herzlichen Dank an **meinen Mann Andi, meine Familie und meine Freunde**. Ihr habt mir während meines Studiums und meiner Promotion immer zur Seite gestanden, Freud und Leid mit mir geteilt und wart eine großartige Unterstützung. Danke für jedes Daumen drücken und Mitfiebern, eurer Nachfragen und eure ermutigenden Worte und nicht zuletzt auch die finanzielle Unterstützung. Ihr habt mir geholfen, meine Träume zu verwirklichen und ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. DANKE!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Haibach, den 16.07.2020

Catrin Stegmann, geb. Taupp



9 783967 290615

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-061-5