

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Direktor (komm.): Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

## **Rolle von posttranslationalen Modifizierungen von PPAR $\gamma$ 2 für seine Aktivität und Lokalisierung**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tillman Christopher Walk  
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.03.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Heeren**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Merkel**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Pröls**

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Fettgewebe .....	1
1.1.1 Topographie, Histologie und Funktion von Fettgewebe .....	2
1.1.2 Fettgewebismetabolismus.....	3
1.1.3 Die endokrine Funktion des Fettgewebes .....	7
1.1.4 Adipozytendifferenzierung .....	11
1.2 Kernrezeptoren .....	13
1.2.1 PPAR $\gamma$ .....	14
1.2.2 Struktur von PPAR $\gamma$ .....	16
1.2.3 Posttranslationale Modifikationen von PPAR $\gamma$ .....	17
1.2.4 Wirkmechanismen von PPAR $\gamma$ .....	19
1.2.5 Regulation der Adipogenese durch PPAR $\gamma$ .....	21
1.2.6 Regulation von Entzündung durch PPAR $\gamma$ Transrepression .....	22
1.3 Fragestellung .....	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Geräte.....	25
2.2 Chemikalien .....	26
2.3 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.4 hPPAR $\gamma$ 2 Plasmid-DNA .....	26
2.4.1 hPPAR $\gamma$ 2 Wildtyp .....	26
2.4.2 hPPAR $\gamma$ 2 Mutanten .....	26
2.5 Zellkultur .....	26
2.5.1 Zelllinien .....	26
2.5.2 Allgemeine Zellkultur .....	27

2.5.3 Adipozytendifferenzierung .....	27
2.6 Transformation von XL10-Gold bzw. XL1-Blue .....	29
2.7 Plasmid-DNA Präparation .....	30
2.8 Plasmid-DNA Restriktion und DNA-Gelelektrophorese .....	31
2.9 Transiente Transfektion von hMSC-TERT .....	31
2.10 Herstellung eines Gesamtzelllysats .....	32
2.11 Proteinbestimmung nach SDS-Lowry .....	33
2.12 Western Blot .....	34
2.12.1 Gelelektrophorese .....	34
2.12.2 Blotting .....	35
2.12.3 Färbung nach Ponceau .....	35
2.12.4 Immundetektion .....	36
2.13 Konventionelle Immunfluoreszenz-Färbung (IMF) .....	38
2.14 Duolink Immunfluoreszenz-Färbung .....	39
2.15 Molekulare Charakterisierung von Zellen .....	40
2.15.1 mRNA-Isolierung .....	40
2.15.2 cDNA-Synthese .....	41
2.15.3 TaqMan <i>real-time</i> PCR .....	42
3 Ergebnisse .....	43
3.1 Charakterisierung .....	43
3.1.1 DNA-Sequenzierung .....	43
3.1.2 Darstellung der PPAR $\gamma$ Mutanten auf DNA-Ebene (Plasmidrestriktion) ....	46
3.1.3 Messung der Expression von PPAR $\gamma$ mittels TaqMan <i>real time</i> PCR .....	47
3.1.4 Darstellung von PPAR $\gamma$ auf Proteinebene mittels Western Blot .....	47
3.1.5 Darstellung von PPAR $\gamma$ auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz .....	49
3.2 SUMOylierung des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps und der Mutante $\Delta$ 3 .....	53
3.2.1 SUMOylierung von PPAR $\gamma$ im Western Blot .....	53

3.2.2 SUMOylierung von PPAR $\gamma$ in der Duolink-Immunfluoreszenz.....	56
3.3 Funktionelle Analysen.....	60
3.3.1 Adipogenetisches Potenzial des PPAR $\gamma$ Wildtyps und $\Delta 3$ .....	60
3.3.2 Anti-entzündliches Potenzial des PPAR $\gamma$ Wildtyps und $\Delta 3$ .....	67
4 Diskussion.....	70
4.1 Charakterisierung .....	71
4.1.1 DNA-Sequenzierung .....	71
4.1.2 DNA-Restriktion.....	71
4.1.3 Expression auf mRNA-Ebene .....	72
4.1.4 Expression auf Proteinebene .....	72
4.2 SUMOylierungseigenschaften von PPAR $\gamma 2$ .....	74
4.3 Funktionsanalysen: Adipogenese und Immunmodulation.....	76
4.3.1 Adipogenese .....	77
4.3.2 Immunmodulation.....	83
5 Zusammenfassung.....	88
6 Literaturverzeichnis .....	91
7 Anhang.....	103
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	103
7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	107
7.3 Danksagung.....	110
7.4 Lebenslauf .....	111
7.5 Eidesstattliche Versicherung.....	112

# 1 Einleitung

## 1.1 Fettgewebe

Fettgewebe ist aufgrund seiner Energiespeicher-, Bau- und Isolierfunktion ein essentieller Bestandteil unseres Körpers. In den vergangenen 15 Jahren etablierte sich darüber hinaus die Sichtweise, dass es in seiner Gesamtheit das wohl größte endokrine Organ des Menschen darstellt und maßgeblich an der Regulierung der Energiehomöostase beteiligt ist (Rosen und Spiegelman, 2006). Zuviel Körperfett birgt jedoch beträchtliche medizinische Risiken für den Organismus. Fettleibigkeit ist ein fester Bestandteil des metabolischen Syndroms, welches durch das Vorhandensein von Adipositas, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Bluthochdruck in einem Individuum charakterisiert ist (Virtue und Vidal-Puig, 2010). Angesichts der Vergesellschaftung mit derlei chronischen Erkrankungen, welche ultimativ zu Myokardinfarkt und zerebralem Insult führen können (Grundy, 2004; Reaven, 1993), gepaart mit einem bereits epidemischen Ausmaß ihrer Prävalenz (Grundy, 2008), stellt die Adipositas heute eine der größten Bedrohungen für die Gesundheit unserer Gesellschaft dar (Hossain et al., 2007). Der Aufklärung zugrundeliegender molekularbiologischer Mechanismen gilt ein großes Interesse.

### 1.1.1 Topographie, Histologie und Funktion von Fettgewebe

Das Fettgewebe des Menschen ist ein dem Mesenchym abstammendes Binde- und Stützgewebe (Gesta et al., 2007). Depotartig über den Körper verteilt, macht es ca. 15% des Körpergewichts eines normalgewichtigen jungen Erwachsenen aus. Grundsätzlich setzt sich Fettgewebe aus reifen Adipozyten, Adipozytenvorstufen (Prädipozyten), Fibroblasten und Immunozyten (insbesondere Makrophagen) zusammen. Eine bindegewebige kollagenfaserhaltige Matrix gibt dem Zellverband Halt und führt ihm Gefäße und Nervenfasern zu (Kershaw und Flier, 2004).

Unter topographischen, histologischen und funktionellen Gesichtspunkten betrachtet, ist weißes von braunem Fettgewebe zu unterscheiden. Weißes Fettgewebe (engl. *white adipose tissue*, WAT) kommt hauptsächlich als subkutanen und viszerales Fettgewebe vor. Seine Funktion für den Organismus besteht zum einen in der Speicherung von Energie, der Thermoisolation und der Verwendung als Bausubstanz, zum anderen in der endokrinen Regulierung der Energie- und Gewichtshomöostase des Organismus durch sogenannte Adipokine (Zytokine des Adipozyten) (Kershaw und Flier, 2004).

Histologisch zeichnen sich weiße Fettzellen durch eine einzelne Fettvakuole (engl. *lipid droplet*) aus, die der Speicherung von Triacylglyceriden als Energieträger dient, die übrigen Zellorganellen an den Zellrand drängt und dem Adipozyten so seine typische Siegelringmorphologie verleiht. Weißes Fettgewebe ist ein wandlungsfähiges Gewebe, das durch seine hohe Anpassungsfähigkeit an die wechselnde Verfügbarkeit von Nahrung seiner Rolle als größter Energiespeicher des Körpers Rechnung trägt. Adipozyten sind in der Lage, bei anhaltendem Nahrungsüberangebot ihr Volumen zu verdoppeln (Hypertrophie) und bei dem Erlangen eines kritischen Volumens zu proliferieren (Hyperplasie) (Hirsch und Batchelor, 1976). Im Zuge übermäßiger Adipozytenexpansion droht jedoch ein Übergang von der Homöostase zur sog. Allostase, welche möglicherweise mit Adipokin-vermittelter und lipotoxischer Schädigung des Organismus verbunden ist (Virtue und Vidal-Puig, 2010).

Braunes Fettgewebe (engl. *brown adipose tissue*, BAT) kommt beim Menschen in relativ geringem Maße vor. Lange war man der Ansicht, ausschließlich Säuglinge besäßen nennenswerte Vorkommen an braunem Fettgewebe, das im

Zuge des Heranreifens nahezu vollständig involutiert. Heute ist durch PET-CT Untersuchungen bekannt, dass auch Erwachsene BAT-Ansammlungen v.a. zervikal, supraklavikulär, axillär und paravertebral aufweisen (Nedergaard et al., 2007). Braune Fettzellen sind in der Lage, mithilfe des BAT-spezifischen mitochondrialen Proteins Thermogenin aus Fettsäuren Wärme zu erzeugen. Thermogenin, auch UCP-1 (engl. *uncoupling protein 1*) genannt, sorgt vereinfacht dargestellt für einen Kurzschluss im Protonenfluss der Atmungskette, was zu deren Entkopplung und somit zur direkten Wärmeentwicklung in der Zelle führt (Aquila et al., 1985).

### 1.1.2 Fettgewebismetabolismus

Eine schwankende Nahrungsverfügbarkeit oder der bloße Wechsel von postprandialen und postresorptiven Intervallen im Laufe eines Tages erfordern Mechanismen zur Gewährleistung einer steten Energie- und Substratversorgung der einzelnen Gewebe und Organe. Sie sind die Voraussetzung für intrazelluläre anabole und katabole Stoffwechselprozesse, welche durch energieverbrauchende Synthese und Transformation sowie Energie gewinnende Degradierung (Hydrolyse und Oxidation) von Makromolekülen geprägt sind (Nelson und Cox, 2009). Fettgewebe, das postprandial Energiereserven anlegt, um in Phasen anhaltender Nahrungskarenz oder starker körperlicher Aktivität den Körper mit ausreichend Energie in Form von Fettsäuren versorgen zu können, kommt eine zentrale Rolle in diesen v.a. durch die Antagonisten Insulin und Glukagon aber auch durch Glukokortikoide gesteuerten Prozesse zu.

Postprandial spalten Enzyme des Gastrointestinaltraktes Nahrung in ihre makromolekularen Bestandteile (Glukose, Proteine und Lipide) auf, sodass sie vom Enterozyten resorbiert und von hier über den Blutkreislauf ihren Zielgeweben zugeführt werden können. Es resultieren ansteigende Blutglukose- und Blutfettwerte sowie die reaktive Ausschüttung des pankreatischen Hormons Insulin. Insulin reguliert die Glukose- und Lipidhomöostase des Organismus, indem es Programme zur Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen sowie Glykolyse und Lipogenese im Adipozyten initiiert. Der Adipozyt nutzt Glukose als Energielieferant und Glycerol-3-Phosphat-Quelle (G3P), dem molekularem Rückgrat des energiereichen Fettsäureesters Triacylglycerol. Glukose gelangt

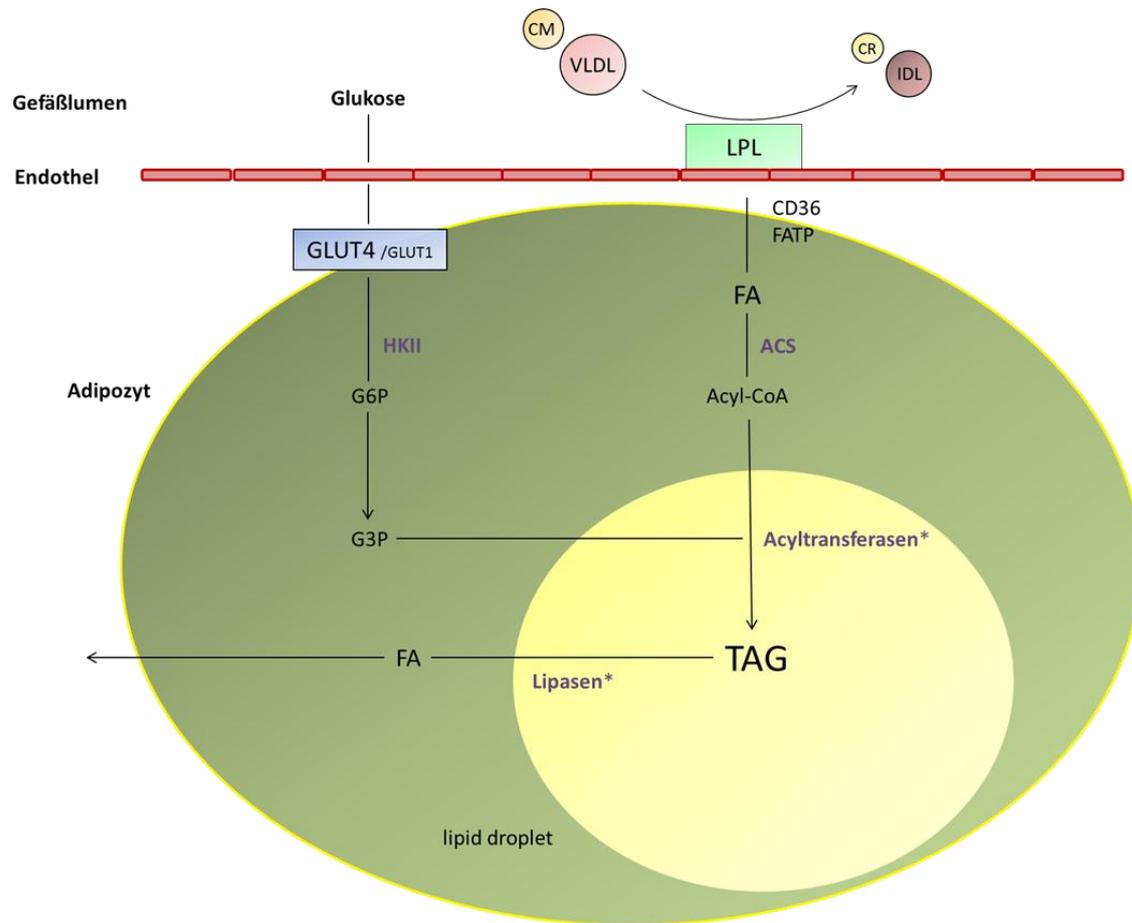
via Glukose-Transporter 1 und 4 (GLUT1 und GLUT4) in den Adipozyten. Der hoch affine GLUT4 wird, anders als der membranständige GLUT1, postprandial durch den Insulin vermittelten PI3K/ Akt-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinase) aus Vesikeln des Zytosols in die Zellmembran verlagert (Tanti et al., 1997; Saltiel und Pessin, 2002). Hier ermöglicht er den Transport größerer Mengen Glukose, die über den basalen Bedarf des Adipozyten hinausreichen, in das Zellinnere. Intrazellulär werden Glukosemoleküle durch die Hexokinase II zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert, dem für die fortlaufende Diffusion wichtigen Konzentrationsgradienten entzogen und der Glyceroneogenese bereitgestellt.

Triacylglycerol (TAG) stellt die längerfristige Speicherform von Energie im Adipozyten dar. Zusammen mit Cholesterinestern zum „*lipid droplet*“ akkumuliert und umhüllt von einer stabilisierenden, mit Perilipin besetzten Phospholipidschicht machen sie einen Großteil des Adipozytenvolumens aus (Brasaemle et al., 2000).

Die Synthese von TAG im Adipozyten besteht in der Veresterung dreier Fettsäuren (FS) mit einem Glycerol-3-Phosphat. Dafür benötigtes G3P stammt aus einer abgekürzten Form der Glykolyse und der Glyceroneogenese (Reshef et al., 2003). Fettsäuren werden zu einem erheblichen Teil aus dem Plasmalipidpool rekrutiert, wobei postprandial Chylomikronen und postabsorptional v.a. hepatische *very low-density lipoproteins* (VLDL) sowie Albumin gebundene kurzkettige Fettsäuren (engl. *non-esterified fatty acids*, NEFAS) Verwendung finden. Die Aufnahme der Lipoprotein-gebundenen Fettsäuren erfolgt durch das Zusammenwirken der Endothel-ständigen Lipoprotein-Lipase (LPL) (Mead et al., 2002) mit den spezifischen Fetttransporter-Molekülen der Adipozytenmembran FATP1 (engl. *fatty acid transport protein1*) (Schaffer und Lodish, 1994) und CD36 (engl. *cluster of differentiation 36*) (Ibrahimi und Abumrad, 2002; Kalant und Cianflone, 2004) Dabei optimiert eine gesteigerte LPL Expression, u.a. vermittelt durch insulininduziertes SREBP1c (engl. *Sterol regulatory element binding protein*), die hydrolytische Abspaltung von Chylomikronen- bzw. VLDL-gebundener Fettsäuren (Kim et al., 1998). Intrazellulär bindet das Adipozyten-spezifische *fatty acid binding protein 4* (FABP4 oder auch engl. *Adipocyte protein*, aP2

genannt), ein schon in frühen Stadien der Adipogenese exprimiertes zytosolisches Protein, hydrophobe und potenziell zytotoxische Fettsäuren reversibel, um sie je nach Bedarf und Funktion aktiv den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle zuzuführen (Makowski und Hotamisligil, 2005). Bei guter Nährstoffversorgung des Organismus werden zu Acyl-CoA aktivierte Fettsäuren im Zuge der Lipogenese revereestert und im *lipid droplet* gespeichert (Ahmadian et al., 2010).

Macht eine längere Nahrungskarenz die Mobilisierung von Energie in Form von Fettsäuren notwendig, werden *lipid droplet*-TAGs im Rahmen der Lipolyse schrittweise durch die Lipasen ATGL (engl. *adipose triglyceride lipase*), HSL (engl. *hormone-sensitive lipase*) und MGL (engl. *monoglyceride lipase*) hydrolysiert und an die Peripherie abgegeben (Ahmadian et al., 2010). Impulsgebend sind dabei niedrige Insulin- sowie erhöhte Katecholamin- und Glukagonspiegel. Sie sorgen für eine verstärkte intrazelluläre cAMP-Synthese und PKA-Aktivität (Proteinkinase A) und somit für die Phosphorylierung lipolytisch relevanter Proteine. Dies stellt einen Mechanismus dar, der die HSL-Aktivität vervielfacht, sie vom Zytosol zum *lipid droplet* translozieren lässt und darüber hinaus Perilipin veranlasst, die Aktivität der Lipasen zu unterstützen (Kolditz und Langin, 2010; Brasaemle, 2007). Zusammengenommen stellen Lipolyse und Lipogenese einen Substratzyklus dar, in dem bis zu 70% der durch Hydrolyse entstehenden Fettsäuren noch z.T. im Adipozyten revereestert werden (Nelson und Cox, 2009).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Lipogenese und Lipolyse im Adipozyten.** Der Adipozyt speichert Energie in Form einer Triacylglyceridansammlung als sog. *lipid droplet*. Zur Synthese eines Triacylglycerids (TAG) werden im Zellinneren drei Acyl-CoA Moleküle mit einem Glukose-3-Phosphat Molekül (G3P) mithilfe von Acyltransferasen (\*GPAT/AGPAT2/DGAT) verestert. Acyl-CoA entsteht aus Fettsäuren, welche mittels intravaskulärer Spaltung von v.a. VLDL (*very low-density lipoproteins*) und Chylomikronen (CM) durch die Lipoproteinlipase (LPL) via FATP1 (*fatty acid transport protein 1*) und CD36 (*cluster of differentiation 36*) in den Adipozyten gelangen. G3P entsteht aus der Degradierung von Glukosemolekülen. Sie werden v.a. von dem membranständigen GLUT4 (Glukose Transporter 4) in die Zelle transportiert. Bei systemischen Energiebedarf werden TAG von Lipasen (\*\* ATGL/HSL/MGL) hydrolysiert und freie Fettsäuren (FS) an das Blut abgegeben. HKII= Hexokinase II, ACS= Acyl-CoA Synthetase, CR= Chylomikronen Remnant, G6P= Glukose-6-Phosphat. Die Abbildung wurde adaptiert nach Williams JCI 2003, Vazquez-Vela et al. Archives of Medical Research 2008 und Ahmadian Int. J. Biochem. Cell Biol 2010.

### 1.1.3 Die endokrine Funktion des Fettgewebes

Das Fettgewebe ist ein heterogenes Gewebe, das sich aus reifen Adipozyten, Adipozytenvorstufen, Fibroblasten und Immunozyten zusammensetzt. Es ist vaskularisiert und innerviert, erhält über eine Fülle von Rezeptoren (Rezeptoren für klassische endokrine Hormone, nukleäre Hormonrezeptoren, Zytokin-Rezeptoren und Katecholamin-Rezeptoren) sowohl neurologische als auch hormonale Afferenzen und verfügt über die Möglichkeit mittels einer Vielzahl bioaktiver Peptide (u.a. Leptin, Adiponektin, PAI-I, TNF- $\alpha$ , MCP-1 und IL-6) auto- und parakrin sowie mit entfernten Geweben und Organen auf endokriner Ebene zu interagieren. Somit ist das Fettgewebe, als funktionelle Einheit betrachtet, weit mehr als ein reiner Energiespeicher. Vielmehr muss man es als ein sekretorisches Organ, das Metabolismus und neuroendokrine (zentralnervöse) Vorgänge integriert sowie zu Immunantworten fähig ist, sehen (Kershaw und Flier, 2004; Frayn et al., 2003). Die Entdeckung des Adipokins Leptin im Jahre 1994 stellt einen Meilenstein für diese Sichtweise dar (Zhang et al., 1994). Leptin wird nahezu exklusiv von Adipozyten gebildet und wird durch das *obesity*-Gen (Leptin, Lep) kodiert. Es moduliert Körpergewicht und Energiehaushalt via Melanocortin-vermittelter Effekte am Melanocortin-Rezeptor 3 (MCR3) und Melanocortin-Rezeptor 4 (MCR4) des zentralen Nervensystems (ZNS), indem es Sättigungssignale generiert und damit auf die Appetitregulation Einfluss nimmt (Samama et al., 2003). Dabei korrelieren hohe Leptinspiegel positiv mit der Körperfettmasse. Leptin-Gen defiziente Mäuse (*ob<sup>-</sup>/ob<sup>-</sup>*) sind hyperphagisch und fettleibig (Frederich et al., 1995).

Heute ist eine Vielzahl an Zytokinen, welcher sich das Fettgewebe zur Kommunikation mit dem Organismus bedient, bekannt. Dabei stehen Peptide mit metabolisch „protektiver“ Wirkung, wie z.B. Adiponektin, denen mit metabolischer Entgleisung assoziierten Peptiden, wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) (Hotamisligil et al., 1993; Hotamisligil, 2006), MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*) (Sartipy und Loskutoff, 2003) und IL-6 (Interleukin 6) (Rotter et al., 2003; Lazar, 2005; Carey et al., 2006) gegenüber. Letztere werden bei Fettleibigkeit vermehrt von Adipozyten und Makrophagen des Fettgewebes sezerniert und gelten aufgrund ihrer pro-entzündlichen Eigenschaften als mitverursachend für chronische systemische

Entzündungsprozesse, die für die Entstehung von Insulinresistenz, Atherosklerose und Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) verantwortlich gemacht werden (Wellen und Hotamisligil, 2005). Einen wichtigen zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismus für die Entstehung solcher Entzündungsreaktionen stellt die Aktivierung von MAP-Kinasen, insbesondere von JNK (c-Jun N-terminal Kinase) und IKK (I $\kappa$ B Kinase), dar. Sie führen einerseits zur inhibitorischen Serinphosphorylierung von IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*), welche die zelluläre Insulinsensitivität direkt modulieren kann (Hotamisligil, 2006). Andererseits bewirken sie eine NF- $\kappa$ B bzw. AP-1 (*activator protein-1*) Translokation in den Zellkern, was zur Induktion entzündlicher Gene führt und zur Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse im Sinne eines *Circulus vitiosus* beiträgt (Wellen und Hotamisligil, 2005). Im Folgenden soll kurz auf die für diese Arbeit relevanten Zytokine Adiponektin, IL-6 und MCP-1 eingegangen werden.

### Adiponektin

Adiponektin (Scherer et al., 1995) wird nahezu exklusiv von reifen Adipozyten exprimiert und gilt daher als echtes Adipokin und Adipozytenmarker (Chandran et al., 2003). Seine Plasmakonzentration beträgt bei einem normalgewichtigen Menschen 5 – 10  $\mu$ g/dl. Dies entspricht in etwa 0,01% der Plasma-Gesamtproteinmenge (Rosen and Spiegelman, 2006; Arita et al., 1999; Diez und Iglesias, 2003). Das molekulare Gewicht des *full-length*-Proteins beträgt ca. 30-kD (Scherer et al., 1995). Neben dieser Variante existiert Adiponektin als proteolytisches Spaltfragment (sog. globuläres Adiponektin) und als multi-oligomere Struktur, die sich aus Isoformen des *full-length* Adiponektins, entstanden durch Hydroxylierung- und Glykosylierungsprozesse, zusammensetzt (Ouchi et al., 2003).

Besonderes Interesse gilt dem Adiponektin aufgrund seiner protektiven Wirkung bezüglich chronisch entzündlicher Prozesse, Insulinresistenz und Atherosklerose. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Adiponektinspiegel mit normalem Körpergewicht, „guter“ Adipozytenfunktion und systemischer Insulinsensitivität positiv korrelieren. Wohingegen Fettleibigkeit, Typ2 Diabetes mellitus und Kardiovaskuläre Erkrankungen mit verminderten

Plasmakonzentrationen in Zusammenhang stehen (Chandran et al., 2003; Diez und Iglesias, 2003; Ouchi et al., 2003). Adiponektin vermittelt seine Effekte über die Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 (Adiponektin Rezeptor 1 und 2). AdipoR1 ist auf diversen Zellentitäten, jedoch verstärkt auf Myozyten anzutreffen. AdipoR2 wird hauptsächlich auf Hepatozyten exprimiert (Yamauchi et al., 2003). Intrazellulär bewirkt Adiponektin die Aktivierung Zellmetabolismus-relevanter Signalmoleküle wie AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und PPARs (*peroxisome proliferator activated receptors*), was auf der Endstrecke zur Insulinsensitivierung der Zelle sowie durch NF- $\kappa$ B-Signalwegsinterventionen (Ouchi et al., 2000) zur Vermeidung von entzündlichen Prozessen beiträgt.

### IL-6

IL-6 (Interleukin 6) ist ein pro-entzündliches Zytokin, das sowohl in akuten Entzündungsreaktionen als auch in chronischen *low-grade* Entzündungsprozessen, wie sie in Situationen metabolischer Entgleisung anzutreffen sind, eine Rolle spielt. Bei einem vom Glykolysierungsgrad abhängigen molekularen Gewicht von 22 bis 27 kDA zirkuliert es physiologischerweise mit einer Konzentration von ca. 1 bis 2 pg/ml im menschlichen Körper (Ridker et al., 2000). Etwa ein Drittel des sich im Plasma befindenden IL-6 wird von Adipozyten, Makrophagen und anderen Matrixkomponenten des Fettgewebes generiert (Mohamed-Ali et al., 1997; Fernandez-Real und Ricart, 2003). In Kontinuität damit konnte ein Zusammenhang von bestehender Fettleibigkeit, Insulinresistenz und einer erhöhten IL-6 Plasmakonzentration in der Vergangenheit gezeigt werden (Fernandez-Real und Ricart, 2003). Dies macht IL-6 heute zu einem Prädiktor für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 (Kershaw und Flier, 2004).

IL-6 wird u.a. durch TNF- $\alpha$  induziert und bindet über einen Komplex, bestehend aus dem IL-6 Rezeptor (IL-6 R) und dem ubiquitär vorkommenden gp130-Rezeptor (Taga et al., 1989), an diverse Zielzellen. Intrazellulär führt dies nicht nur zur Aktivierung des o.g. pro-entzündlichen MAPK-, sondern auch des JAK /STAT-Signalweges (Janus Kinase, *signal transducer and activator of transcription*). Letzterer bewirkt in Hepato-, Myo- und Adipozyten über die

Induktion sog. SOCS (*suppressors of cytokine signalling*) den Abbau von IRS-1, was in verminderter Insulinsensitivität der einzelnen Zelle resultiert. Gegenspieler des IL-6 sind das protektive Adipokin Adiponektin und der nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*), welche ein positiver Feedbackmechanismus verbindet (Wulster-Radcliffe et al., 2004). PPAR $\gamma$  seinerseits kann durch pharmakologische Agonisten der TZD (Thiazolidindion)-Klasse induziert werden.

### MCP-1

Bei dem *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) handelt es sich um ein entzündliches chemotaktisches Zytokin (Chemokin) der CCL-Familie (*chemokine cc motif ligand*), das Monozyten entlang eines chemischen Gradienten zu Entzündungsherden führt (Rollins, 1997).

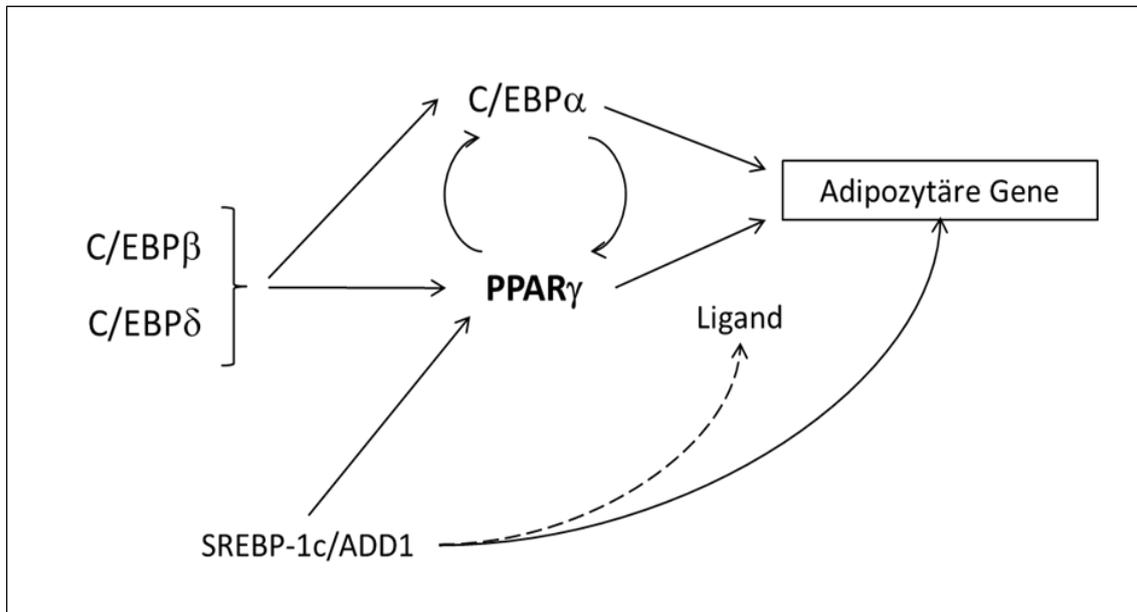
Adipositas verbunden mit der Situation persistierender metabolischer Entgleisung, die ultimativ zur Insulinresistenz führen kann, wurde in der Vergangenheit mit geringgradiger aber chronischer Entzündung des Fettgewebes, einhergehend oder ausgelöst durch MCP-1-geleitete Monozyteninfiltration, assoziiert (Kanda et al., 2006; Wellen und Hotamisligil, 2003). MCP-1 wird vom Fettgewebe sezerniert. Seine Fettgewebs- und Plasmakonzentration korreliert mit der Körperfettmasse (Kamei et al., 2006). Die erhöhte Monozytenanzahl sowie deren gesteigerter Aktivierungsgrad wirken über die Sezernierung weiterer pro-entzündlicher Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-6, entzündungsfördernd auf das Fettgewebe ein (Weisberg et al., 2003).

MCP-1 wirkt über den CCR2 (*chemokine cc motif receptor 2*), der neben Makrophagen und verschiedenen Zelltypen des Immunsystems auch von Adipozyten und Myozyten exprimiert wird. Intrazellulär führt seine Aktivierung, vergleichbar mit der Wirkung entzündlicher Zytokine, scheinbar zu einer Induktion des Jak /STAT-Signalwegs sowie zur Stimulation von MAPK-Kaskaden, wodurch die Transkription von Zielgenen induziert wird (Biswas und Sodhi, 2002; Cambien et al., 2001). Die Expression des MCP-1 wird von TNF- $\alpha$  bzw. des von ihm aktivierten JNK-AP1-Weges verstärkt induziert (Ueda et al., 1997). Adiponektin und PPAR $\gamma$ -Agonisten wirken diesen Abläufen entgegen (Dietze-Schroeder et al., 2005; Di Gregorio et al., 2005).

#### 1.1.4 Adipozytendifferenzierung

Adipozyten machen den Großteil der Fettgewebsmasse eines Individuums aus und sind zentrale Figuren des Lipidmetabolismus und der Energiehomöostase (s.o.). Man nimmt an, dass sie aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen hervorgehen, die dem Mesoderm entstammen (Gesta et al., 2007). Dieser Vorgang der Zelldifferenzierung ist bisher nur lückenhaft und hauptsächlich auf murinen Zellmodellen (3T3-L1 und 3T3-F442A) basierend erklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass sich multipotente mesenchymale Stammzellen im Zuge der Determination, zunächst mit dem Verlust der Fähigkeit sich in andere mesenchymale Zelllinien zu differenzieren, auf die adipozytäre Laufbahn in Form des Adipoblasten festlegen (MacDougald und Mandrup, 2002; Rosen und MacDougald, 2006). Im weiteren Verlauf des Differenzierungsprozesses entsteht ein teilungsfähiger Präadipozyt, der unter adäquaten Stimuli zum ausgewachsenen Adipozyten heranreift (Gesta et al., 2007). Zeichen dieser terminalen Differenzierung stellen u.a. die Akkumulierung eines univakuolen Fetttropfens, eine insulinsensitive Glukoseaufnahme sowie spezifische Genexpressionsprofile, die PPAR $\gamma$ 2, FABP4 und Adiponektin beinhalten, dar. Bereits in der frühen präadipozytären Phase steuern nukleäre Transkriptionsfaktoren der *CAAT enhancer binding protein* (C/EBP) Familie und der *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) mittels Regulation einer kaskadenartig ablaufenden adipozytenspezifischen Genexpression die Adipogenese (Rosen und MacDougald, 2006). Vereinfacht dargestellt wird zunächst durch das Zusammenwirken von C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  (Farmer, 2006; MacDougald und Lane, 1995) die Expression PPAR $\gamma$ s, der Schlüsseltranskriptionsfaktor der Adipozytenndifferenzierung (Tontonoz et al., 1994; Rosen et al., 1999; Rosen et al., 2002), induziert. Dies wiederum aktiviert C/EBP $\alpha$ , welches sich zum einen autostimuliert und zum anderen die PPAR $\gamma$ -Aktivität verstärkt (Rosen et al., 2002). Somit entsteht ein Feedbackzyklus, der nicht nur selbsterhaltende sondern auch potenzierende Wirkung auf die Adipogenese hat (Wu et al., 1999). Dieses System wird von dem proadipogenetischen Faktor ADD1 (*adipocyte determination and differentiation factor 1*, auch SREBP1c genannt) unterstützt. Er fördert direkt die Expression PPAR $\gamma$ s (Fajas et al., 1999) und induziert weitere adipozytäre Gene

wie die *fatty acid synthase* (FAS) (Rosen and Spiegelman, 2000). Darüber hinaus geht man davon aus, dass er für die Synthese eines endogenen PPAR $\gamma$  Liganden (vermutlich ein Fettsäurederivat, welches bis dato noch nicht näher identifiziert werden konnte) verantwortlich ist (Kim et al., 1998).



**Abbildung 1.2: Wichtige Transkriptionsfaktoren der Adipogenese.** Die Differenzierung von Adipozyten wird von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Im Zentrum der Abläufe steht PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) als einziger essentieller Transkriptionsfaktor. Das Zusammenwirken von C/EBP  $\beta$  und  $\delta$  ist für die Induktion PPAR $\gamma$ s notwendig. Das Zusammenspiel von C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$  stellt einen sich potenzierenden Regelkreis dar. SREPB-1c/ADD1 (*sterol regulatory element-binding protein, adipocyte determination- and differentiation- dependent factor 1*) unterstützt die Adipogenese durch die Induktion PPAR $\gamma$ s und weiterer adipozytärer Gene sowie putativ durch die Synthese von PPAR $\gamma$ -Liganden. C/EBP= CAAT *enhancer binding protein*. Die Abbildung wurde adaptiert nach MacDougald and Mandrup *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*. 2002

## 1.2 Kernrezeptoren

Die Kernrezeptor (engl. *nuclear receptor*) Superfamilie umfasst 48 (Lehrke und Lazar, 2005) i.d.R. Liganden-aktivierbare Transkriptionsfaktoren, welche im Zusammenspiel mit Koregulatoren mittels direkter und indirekter DNA-Bindung die Genexpression einer Zelle spezifisch steuern können (Glass und Rosenfeld, 2000). Als Sensoren für endokrine Botenstoffe und Metabolite stellen sie eine Verbindung zwischen dem Gesamtorganismus und der Transkriptionsaktivität der einzelnen Zelle her, was ihnen eine Schlüsselrolle bezüglich der Entwicklung und Homöostase des Körpers sowie in der Modulation von Immunprozessen zukommen lässt.

Die molekulare Struktur der funktionell vielfältigen Rezeptorfamilie ist bemerkenswert einheitlich. Nahezu alle Vertreter verfügen über eine N-terminal gelegene Liganden-unabhängige DNA-*activation-function* (AF1), eine zentral lokalisierte DNA-Bindungs-Domäne (DBD) und eine C-terminale Liganden-Bindungsdomäne (LBD), in deren Nähe sich die Liganden-abhängige *activation-function* 2 (AF2) befindet. Die DNA-Bindungs-Domäne (DBD) ermöglicht dem Kernrezeptor, spezifische Bindungen mit responsiven Elementen der DNA (engl. *hormone responsive element*, HRE) einzugehen, welche in Enhancer- oder Promotorregionen der zu regulierenden Zielgene eingebettet sind. Die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) zeichnet sich ebenfalls durch spezifische Bindungsmodalitäten aus. Wobei die Bindung eines adäquaten Liganden zur Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors führt und auf diese Weise über dessen subzelluläre Lokalisation, Dimerisierungsstatus sowie transkriptionelle Aktivität durch Koregulatoren-Austausch entscheiden kann (Huang et al., 2010; Glass und Ogawa, 2006; McKenna und O'Malley, 2002; Mangelsdorf et al., 1995). Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren sind klassische Beispiele für solche nukleären Rezeptoren. Beide werden infolge adäquater Hormonbindung im Zytosol aktiviert und translozieren daraufhin als Homodimere in den Zellkern, um über *hormone responsive elements* (HRE) der DNA Zielgene zu regulieren (Glass und Ogawa, 2006).

### 1.2.1 PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  (Graves et al., 1992) ist ein Liganden-gesteuerter Transkriptionsfaktor der *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) Familie, welche der Kernrezeptor Superfamilie zuzuordnen ist (Mangelsdorf et al., 1995). Aufgrund der späten Identifizierung einiger endogener Liganden wird PPAR $\gamma$  als „*Adopted Orphan Receptor*“ bezeichnet. PPAR $\gamma$  kann durch supraphysiologische Konzentrationen von Fettsäuren (insbesondere PUFAs, engl. *polyunsaturated fatty acids*) sowie deren Metabolite, u.a. Eicosanoide (Kliwer et al., 1997; Tontonoz und Spiegelman, 2008), oder spezifisch durch das hoch affine Thiazolidinedion Rosiglitazon (Lehmann et al., 1995) aktiviert werden. Er bindet als obligates Heterodimer mit dem *9-cis Retinoid acid receptor* (RXR) (Kliwer et al., 1992; Issemann et al., 1993; Tontonoz und Spiegelman, 2008) an *PPAR responsive elements* (PPREs) von Zielgenen (Issemann et al., 1993). Neben PPAR $\gamma$  (auch NR1C3 genannt) existieren mit PPAR $\alpha$  (NR1C1) und  $\delta$  (NR1C2) zwei weitere Mitglieder der PPAR Familie. Gemeinsam regulieren sie, in Kontinuität mit ihren natürlichen Liganden, u.a. wichtige Aspekte des Fettstoffwechsels und scheinen darüber hinaus an der Modulation zellulärer Immunreaktionen beteiligt zu sein. PPAR $\alpha$ , der ursprünglich namensgebende Isotyp (Issemann und Green, 1990), kommt hauptsächlich in der Leber und im braunen Fettgewebe vor und nimmt dort regulatorische Aufgaben im Fettsäurekatabolismus wahr. Die Rolle PPAR $\delta$  ist weniger gut verstanden. Man nimmt jedoch an, dass es eine Funktion für die Oxidation von Fettsäuren in Myo- und Adipozyten hat (Wang et al., 2003; Castrillo und Tontonoz, 2004; Hummasti und Tontonoz, 2006).

PPAR $\gamma$  ist in höheren Konzentrationen in weißem und braunem Fettgewebe sowie in Monozyten nachzuweisen und reguliert Liganden-gesteuerte Transkriptionsvorgänge im anabolen Spektrum des Fettsäuremetabolismus. Insbesondere die Isoform PPAR $\gamma$ 2, welche exklusiv von Adipozyten gebildet wird, gilt als dominanter und zugleich essentieller Transkriptionsfaktor der Adipogenese (Tontonoz et al., 1994; Rosen et al., 1999). In reifen Adipozyten reguliert er die Expression von Proteinen, wie LPL (Schoonjans et al., 1996), CD36 (Hummasti und Tontonoz, 2006) und FATP-1 (Frohnert et al., 1999), welche für die intravaskuläre Lipolyse und Fettsäureaufnahme relevant sind.

FABP4, notwendig für intraadipozytäre Transportvorgänge von Fettsäuren, weist an regulatorischen Regionen seines Gens ebenfalls Bindungsstellen für PPAR $\gamma$  auf (Hummasti und Tontonoz, 2006).

Über die direkte Induktion des PPAR $\gamma$ -selektiven Adipokins Adiponektin (Hummasti und Tontonoz, 2006) nimmt der Transkriptionsfaktor auf endokrinem Wege Einfluss auf die Energiehomöostase des Körpers: hohe Adiponektinspiegel in Adipozyt und Blut stehen in Zusammenhang mit einem physiologischen Körpergewicht, „guter“ Adipozytenfunktion und einer intakten Insulinsensitivität, wohingegen Adipositas, Insulinresistenz, und kardiovaskuläre Ereignisse mit einer verminderten Plasmakonzentration des Adipokins einhergehen (s.o.).

Im Jahre 2007 erschien eine Arbeit der Forschungsgruppe um Antonio Vidal-Puig, die sich mit der Bedeutung PPAR $\gamma$ 2s bezüglich der Entstehung Adipositas-bedingter Komorbiditäten widmete. Zugrunde lag die Beobachtung, dass eine starke Fettgewebsexpansion früher oder später zur Insulinresistenz des Organismus führt. Bisher dienen zwei Hypothesen der Erklärung dieses Phänomens: Zum einen wird vermutet, dass Adipositas eine chronische Entzündungssituation des Fettgewebes, charakterisiert durch eine vermehrte Produktion entzündlicher Zytokine seitens der Adipozyten und/ oder infiltrierender Makrophagen induziert (Wellen und Hotamisligil, 2005; Dandona et al., 2004). Zum anderen geht man davon aus, dass die Überladung des Metabolismus mit Lipiden zur Entstehung toxischer Metabolite führe, welche das *Insulin-signalling* beeinträchtigen (Lelliott und Vidal-Puig, 2004). Bezüglich der zweiten These identifiziert o.g. Arbeit PPAR $\gamma$ 2 als wichtigen Faktor in der Vermeidung derartiger Prozesse. Vor dem Hintergrund, dass die Aktivität PPAR $\gamma$ s durch die Energieaufnahme des Individuums reguliert wird und essentiell sowohl für die Entwicklung von Fettgewebe als auch für dessen Insulinsensitivität und die allgemeine Fettdistribution des Organismus ist, wurden sog. POKO-Mäuse (Akronym für PPAR $\gamma$ 2 *obesity*-Gen Knock Out) generiert. POKO-Mäuse weisen eine PPAR $\gamma$ 2 Ablation in einem ob/ob *background* auf (PPAR $\gamma$ 2<sup>-/-</sup>, Lep(ob)/Lep (ob)). Im Vergleich zu reinen ob/ob Mäusen zeigten sie bei Gabe einer hochkalorischen Diät eine geringere Fettmassenzunahme, einen stärkeren auf lipotoxische Effekte basierenden

Grad der Insulinresistenz und  $\beta$ -Zell-Störung sowie einen höheren Grad der Dyslipidämie. Eine durch PPAR $\gamma$ 2 regulierte Fettgewebsexpansion führte indes zu einer vermehrten ektopen Ablagerung (in Leber und Skelettmuskel) von Triacylglyceriden anstelle von für das *Insulin-signalling* schädlicheren Lipidspezies. Insgesamt war eine verbesserte  $\beta$ -Zell-Adaptation bei Insulinresistenz zu verzeichnen (Medina-Gomez et al., 2007b; Medina-Gomez et al., 2007a).

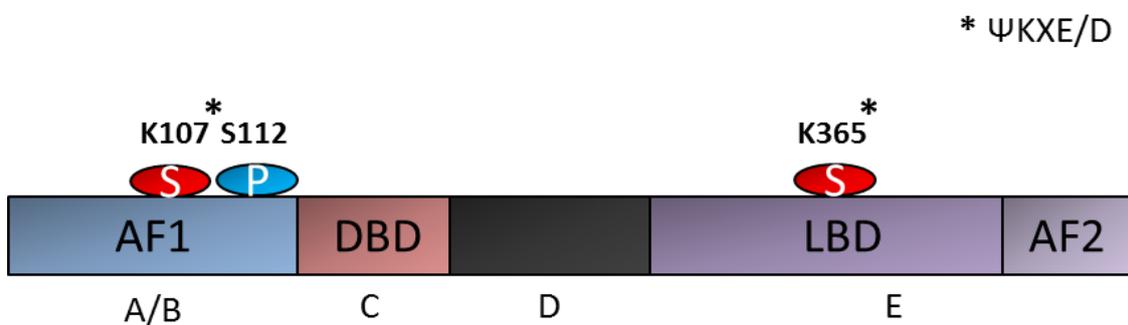
Bezüglich erster These ist bereits seit längerem bekannt, dass PPAR $\gamma$  in chronische Entzündungsprozesse durch die Repression von NF- $\kappa$ B und AP1-Zielgenen auf zumindest monozytärer Ebene eingreift (Pascual et al., 2005; Glass und Ogawa, 2006; Tontonoz und Spiegelman, 2008).

### 1.2.2 Struktur von PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  ist ein ca. 52 kDa großes Protein, dessen Gen PPARG sich auf Chromosom 3 an Position 3p25 des Menschen befindet. Der Genabschnitt umfasst mehr als 100 Kilobasen (kb) und codiert mittels unterschiedlicher Promotorbenutzung sowie alternativer Splicing-Prozesse die Isotypen PPAR $\gamma$  (Splice-Varianten) 1 und 2 (Zhu et al., 1995; Desvergne and Wahli, 1999).

PPAR $\gamma$ 1 kommt in diversen Zellentitäten, u.a. in Adipozyten, Makrophagen, Myozyten, Hepatozyten, Kolonepithel und Endothel, vor. Wohingegen PPAR $\gamma$ 2, gekennzeichnet durch einen dreißig Aminosäuren längeren N-Terminus, exklusiv von Adipozyten exprimiert wird. Grundsätzlich entspricht der molekulare Aufbau PPAR $\gamma$ s dem Muster der Kernrezeptor Superfamilie und lässt sich analog in vier funktionell differenzierbare Abschnitte, A/B, C, D und E, unterteilen. Region A/B birgt eine Liganden-unabhängige DNA-*activation-function* (AF1), welche durch eine nahegelegene Phosphorylierungs- (Ser112) (Hu et al., 1996) und eine SUMOylierungsstelle (K107) im Sinne einer posttranslationalen Modifikation und daraus resultierender inhibierter Ligandenbindung am Protein regulierbar ist (Yamashita et al., 2004a). Die C-Region enthält die DNA-Bindungsdomäne (DBD) bestehend aus einem Zinkfinger-Doppelmotiv, die im Zusammenwirken mit RXR, *direct repeats* (DR1) eines Hexanukleotid-Kernmotivs (AGGTCA), genannt *PPAR response element* (PPRE), in regulatorischen Abschnitten von Zielgenen spezifisch erkennt

(Desvergne und Wahli, 1999). Abschnitt D wird als Bindeglied zwischen C und E verstanden und soll eine Rolle für die Dimerisierung mit RXR haben. Region E beinhaltet die Liganden-Bindungsdomäne (LBD), eine ihr nahegelegene SUMOylierungsstelle (K365) (Pascual et al., 2005) sowie die transkriptionell entscheidende Liganden-abhängige *activation-function 2* (AF2), welche Koregulatoren als *Docking-Plattform* dient (Yamashita et al., 2004a). Die LBD besteht aus zwölf dreischichtig angeordneten Helices. In ihrem Zentrum befindet sich eine relativ große lipophile Liganden-Bindungstasche, die Ligandenspezifität herzustellen vermag (Nolte et al., 1998).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des humanen PPAR $\gamma$ 1 Gens (PPARG).** Berücksichtigt sind funktionell wichtige Strukturen. PPAR $\gamma$  ist ein Liganden-gesteuerter Transkriptionsfaktor. Er verfügt über funktionelle Einheiten, die DNA- und Ligandenbindung sowie posttranslationale Modifikationen im Sinne einer SUMOylierung bzw. Phosphorylierung ermöglichen. AF1= *activation function 1*, DBD= *DNA binding domaine*, LBD= *Ligand binding domaine*, AF2= *activation function 2*, S= SUMOylierungsstelle, P= Phosphorylierungsstelle. Die Abbildung wurde adaptiert nach Pascual Nature 2005, Tontonoz & Spiegelman Nature 2008 und Yamashita Genes to Cells 2004.

### 1.2.3 Posttranslationale Modifikationen von PPAR $\gamma$

Posttranslationale Modifikationen, im Sinne einer Phosphorylierung, SUMOylierung und deren Wechselwirkungen untereinander, haben für die Funktion PPAR $\gamma$ s entscheidenden Charakter. Prinzipiell führen diese Mechanismen zu strukturellen Veränderungen des Proteins, was Auswirkungen auf dessen Interaktionspotenzial mit Koregulatoren hat und auf diese Weise Einfluss auf die Aktivierung oder Repression transkriptorischer Prozesse nimmt (Glass und Ogawa, 2006).

Liganden-LBD Interaktionen sind verantwortlich für die Aktivierung PPAR $\gamma$ s. Sie verändern die Position der c-terminalen AF2 derart, dass LXXLL-Konsensusmotive, welche hoch affine Bindungen mit Koaktivatoren vermitteln, verstärkt exponiert werden (Kallenberger et al., 2003). Dies führt zur Rekrutierung von Koaktivatoren und zur Verdrängung fakultativ gebundener Korepressoren (Gampe, Jr. et al., 2000; Glass und Rosenfeld, 2000; Glass und Ogawa, 2006; Tontonoz und Spiegelman, 2008), was in der Induktion von Zielgenen resultiert.

Eine Phosphorylierung PPAR $\gamma$ s vermag es, dessen transkriptionelle Aktivität hingegen zu vermindern. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung eines Serin-Restes an Position 112 des N-Terminus durch Mitglieder der MAP-Kinasen-Familie (insbesondere ERK1 und 2 *extracellular-signal-regulated kinases* 1 und 2, sowie JNK) zur Reduzierung der Aktivität der AF1 und AF2 PPAR $\gamma$ s führt und dadurch dessen transkriptionelle Funktion negativ reguliert (Hu et al., 1996; Adams et al., 1997; Shao et al., 1998; Yamashita et al., 2004a). Der Gruppe um Bruce Spiegelman gelang vergangenes Jahr eine weitere Phosphorylierungsstelle PPAR $\gamma$ s zu identifizieren. Sie entdeckten, dass im Mausversuch eine durch Verabreichung hochkalorischer Nahrung erzielte Fettleibigkeit (engl. *high fat diet*, HFD) die Phosphorylierung PPAR $\gamma$ s an Stelle S273 durch die Proteinkinase Cdk5 (*cyclin-dependent kinase 5*) bewirkt. Diese Modifikation des nukleären Transkriptionsfaktors verändert bzw. supprimiert zwar nicht dessen generelle Transkriptionsaktivität, sie führt jedoch zu veränderten Expressionsmustern bestimmter Gene, wie zum Beispiel der Verminderung des Adipokins Adiponektin. Das antidiabetische Medikament und PPAR $\gamma$  Agonist Rosiglitazon konnte diese Form der posttranslationalen Modifikation inhibieren, was als neuer Hinweis auf die Wirkweise von TZD dient und einen Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit, Insulinresistenz und der Phosphorylierung PPAR $\gamma$ s als zugrundeliegenden Pathomechanismus herstellt (Choi et al., 2010).

SUMOylierungen sind eine Gangart der posttranslationalen Modifikation von PPAR $\gamma$  Proteinen, die sowohl mit einer Inhibierung als auch mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors vereinbar sind (Yamashita et al., 2004a). *Small ubiquitin-related modifier* (SUMO) bilden eine Gruppe von Peptiden, die

Zielproteine über Lysinreste, eingebettet in das SUMO Konsensus Motiv  $\Psi KxE/D$  ( $\Psi$ = aliphatische AS, x= jede AS), kovalent binden und auf deren subnukleäre Lokalisation oder transkriptorisches Verhalten Einfluss nehmen können. Das menschliche Genom kodiert vier unterschiedliche SUMO-Proteine (SUMO 1-4). Interessanter Weise konnte für SUMO-1, ein 11 kD großes Protein, demonstriert werden, dass es nach einer Reihe enzymatischer Konjugationsschritte, mithilfe der E3 Ligase PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT-1*), kovalente Bindungen eingeht (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). PPAR $\gamma$ 1 betreffend findet dies am Lysinrest der Stelle K107 (Yamashita et al., 2004a) und K365 (Pascual et al., 2005) des Proteins statt. Yamashita et al. konnten eine synergistische Beziehung zwischen der Ser112 Phosphorylierung und der K107 SUMOylierung beobachten: Phosphorylierungsdefiziente Mutanten (S112A) zeigten abgeschwächte SUMOylierung an K107. Der transaktivierende Effekt einer SUMOylierungsdefizienz an K107 übertraf den der Phosphorylierungsdefizienz an S112 jedoch bei weitem. Die Einzelmutation K107R war von der Doppelmutation K107R/S112A bezüglich des Geninduktionspotenzials dabei nicht zu unterscheiden. (Yamashita et al., 2004b)

Die Arbeitsgruppe um Christopher Glass lieferte wenig später Hinweise für ein Ineinandergreifen von Ligandenaktivierung und SUMOylierung an Position K365 im Bereich der LBD PPAR $\gamma$ s. Dieser Vorgang scheint zur indirekten Inhibition (Transrepression) von entzündlichen Genen zu führen (s.u.) (Pascual et al., 2005).

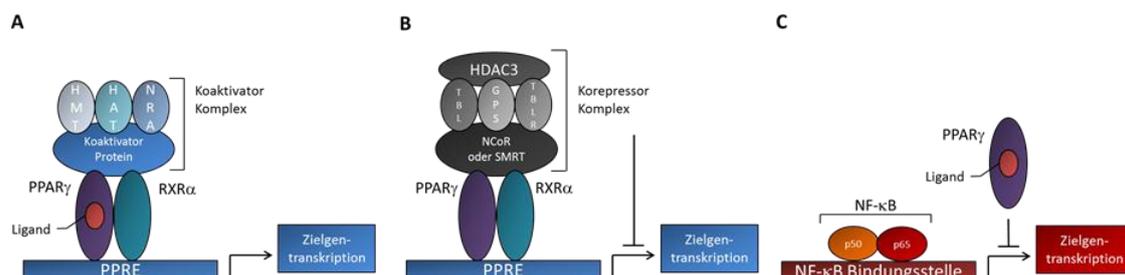
#### 1.2.4 Wirkmechanismen von PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$ /RXR Heterodimere benötigen keine Liganden, um an Promotoren von Zielgenen zu binden. In Abwesenheit eines Liganden rekrutieren sie Korepressor-Komplexe, mit deren Unterstützung sie die Expression von Genen direkt an deren Promotoren inhibieren können. Gängige Modelle für Korepressor-Komplexe umfassen NCoR (*nuclear receptor co-repressor*) (Kurokawa et al., 1995) oder SMRT (*silencing mediator for retinoid- and thyroid-hormone receptors*) (Chen and Evans, 1995) Proteine, in Verbindung mit HDAC3 (*histone deacetylase 3*), TBL1 (*transducin- $\beta$ -like protein 1*), TBLR1

(*transducin- $\beta$ -like-related protein 1*) und GPS2 (*G-protein-pathway suppressor 2*) (Rosenfeld et al., 2006; Glass und Ogawa, 2006).

Das Binden eines Liganden ist hingegen entscheidend für die Aktivierung von Zielgenen. Es führt zur Rekrutierung von Koaktivatoren und ggf. zur Verdrängung von zuvor gebundenen Korepressoren im Sinne eines UBCH5 (*ubiquitin conjugating enzyme H5*) vermittelten 19S-proteasomalen Abbaus (Derepression), was zur Induktion des Zielgens führt (Rosenfeld et al., 2006; Powell et al., 2007). Zwar wurden noch keine PPAR $\gamma$  spezifischen Koaktivatoren identifiziert, jedoch interagieren einige bereits bekannte, u.a. CBP/p300 (*CREB binding protein*) und TRAP220 (thyroid hormone receptor-associated proteins, subunit 220), mit PPAR $\gamma$  (Powell et al., 2007; Tontonoz and Spiegelman, 2008; Viswakarma et al., 2010).

Die Fähigkeit nukleärer Rezeptoren, Geninduktion zu unterdrücken, ohne direkt an den Promotor zu binden, wird als Transrepression bezeichnet. PPAR $\gamma$  soll diese Fähigkeit ebenfalls besitzen (Pascual et al., 2005).



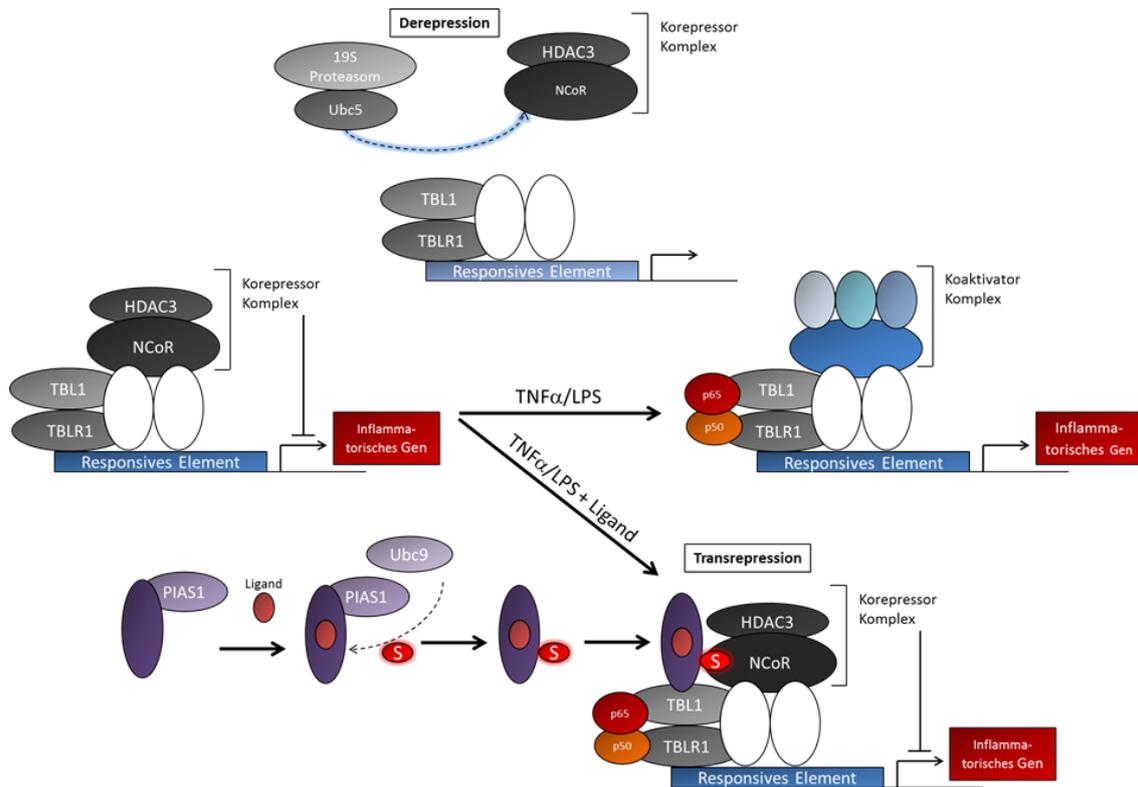
**Abbildung 1.4: Wirkmechanismen PPAR $\gamma$ s.** A) Geninduktion: Ligandenbindung führt zur Rekrutierung von Koaktivatoren. Es folgt die Transkription von Zielgenen. B) Genrepression: In Abwesenheit eines Liganden wird mit Hilfe von Korepressor-Komplexen Genexpression unterdrückt. Gängige Erklärungsmodelle verwenden HDAC3 (*histone deacetylase 3*) und NCoR (*nuclear receptor co-repressor*) oder SMRT (*silencing mediator of retinoic acid thyroid hormone receptor*, auch N-CoR2) Repressor-Komponenten. C) Transrepression: Liganden vermittelte Repression von Zielgenen, ohne direkte Bindung an den entsprechenden Promotor. NF- $\kappa$ B= *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*. Die Abbildung wurde adaptiert nach Glass & Ogawa Nature 2006.

### 1.2.5 Regulation der Adipogenese durch PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$ 2 ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor in der Regulation der Adipogenese. Bereits im frühen Stadium der Differenzierung exprimieren Präadipozyten beachtliche Mengen PPAR $\gamma$ 2s, was zur Induktion adipozytärer Genexpressionsmuster und ultimativ zur Ausprägung morphologischer Merkmale des reifen Adipozyten führt (s.o.). Bewiesen wurde dies anhand von PPAR $\gamma$ -null Fibroblasten, die in vitro nicht in der Lage sind, in reife Adipozyten zu differenzieren, jedoch durch ektope PPAR $\gamma$  Expression diese Fähigkeit zurückerlangten. Darüber hinaus konnte die ektope Expression PPAR $\gamma$ s in Zellen mit vorhandener Anlage zur adipozytären Differenzierung den adipogenetischen Prozess verstärken (Tontonoz et al., 1994). Später konnte anhand von PPAR $\gamma$ -null und PPAR $\gamma$  Wildtyp chimären Mäusen gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  auch in vivo für die Adipogenese essentiell ist (Rosen et al., 1999). Die Frage nach einer adipogenetisch unabdingbaren Untereinheit PPAR $\gamma$ s konnte bisher nicht ausreichend beantwortet werden. Zwar zeigten Hu et al. eine regulatorische Funktion des N-Terminus anhand MAP-Kinasen-vermittelter Phosphorylierung an S112, resultierend in der Inhibierung der Adipogenese (Hu et al., 1996). Und Yamashita et al. identifizierten die SUMOylierung PPAR $\gamma$ s an K107 des N-Terminus als einen sogar stärkeren inhibitorischen Impuls (Yamashita et al., 2004a). Doch konnten Tontonoz et al. 2006 in ihrer Arbeit demonstrieren, dass die Ablation des N-Terminus PPAR $\gamma$ s keineswegs zu einem *loss of function* führt, sondern dessen adipogenetisches Potenzial erhöht (Hummasi und Tontonoz, 2006). Nicht einmal eine funktionierende LBD erscheint notwendig für die Adipogenese (Walkey und Spiegelman, 2008).

### 1.2.6 Regulation von Entzündung durch PPAR $\gamma$ Transrepression

In Abwesenheit eines Liganden reprimiert PPAR $\gamma$  Zielgene mit Hilfe von Korepressoren. Umgekehrt führt die Bindung eines Liganden in der Regel zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors und zur Induktion von Zielgenen in Adipozyten. In Makrophagen bewirkt das für PPAR $\gamma$  hoch affine und spezifische Rosiglitazon (Thiazolidindion) jedoch eine Inhibierung von Genen des entzündlichen Spektrums, welche durch Mitglieder der NF- $\kappa$ B- bzw. AP-1-Familie induziert werden (Ricote et al., 1998; Jiang et al., 1998; Wellen und Hotamisligil, 2005). Ein Erklärungsmodell hierfür liefert die Liganden-vermittelte Aktivierung PPAR $\gamma$ s, die zu einer intranukleären Interaktion des Proteins mit o.g. entzündlichen Transkriptionsfaktoren bzw. deren Signalwegen im Sinne einer Transrepression führt. Pascual et al. entdeckten in diesem Zusammenhang einen Mechanismus, der durch das Konzept der Liganden-vermittelten SUMOylierung den Ablauf dieses Transrepressions-Prozesses zu erklären versucht: Im physiologischen Zustand der Zelle sind entzündliche Gene (z.B. MCP-1) durch Repressor-Komplexe, die NCoR oder SMRT sowie HDACs beinhalten, weitestgehend reprimiert. Extrazelluläre entzündliche Impulse initiieren intrazelluläre Signalkaskaden, die in der Translokation NF- $\kappa$ Bs in den Zellkern münden. Dort bewirkt NF- $\kappa$ B die Degradierung der NCoR-HDAC3-Komplexe an Promotoren entzündlicher Gene (ausgelöst durch UBCH5-abhängige Ubiquitinilierung) und induziert die Expression entsprechender Proteine. Die Liganden-vermittelte SUMOylierung PPAR $\gamma$ s an Stelle K365 leitet nach Beobachtungen Pascuals den Transkriptionsfaktor zu den entsprechenden NCoR-HDAC3-Komplexen und verhindert dort deren 19S proteasomalen Abbau, was die Genrepression aufrecht erhält und eine zelluläre Entzündungsreaktion unterdrückt (Pascual et al., 2005).



**Abbildung 1.5: Liganden-vermittelte Transrepression PPAR $\gamma$ s.** Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B Signalwegen durch Entzündungsmediatoren (TNF- $\alpha$ / LPS) führt zum Ubch5 vermittelten 19S proteasomalen Abbau von Repressor-Komplexen an entzündlichen Genen (Derepression). Die Liganden-abhängige SUMOylierung PPAR $\gamma$ s an K365 verhindert diesen Vorgang (Transrepression). Entzündliche Gene bleiben reprimiert. S= SUMO. Die Abbildung wurde adaptiert nach Glass & Ogawa Nature 2006.

### 1.3 Fragestellung

Die Inzidenz von Adipositas und damit verbundene Komorbiditäten nehmen weltweit stark zu. Adipositas, induziert durch eine erhöhte Energiezufuhr, ist charakterisiert durch die Hypertrophie und Entzündung des Fettgewebes. Eine daraus resultierende systemische Entzündung führt kausal zur Insulinresistenz, welche bei der Mehrheit der Patienten eine wesentliche Rolle für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 spielt. Die Differenzierung von Adipozyten (und damit die Entstehung von Fettgewebe) wird maßgeblich durch den nukleären Transkriptionsfaktor *Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) reguliert. Intrazellulären Entzündungsprozessen, wie sie bei metabolischer Entgleisung anzutreffen sind, scheint er zumindest in Makrophagen entgegenwirken zu können. Posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung und SUMOylierung haben nach heutigen Erkenntnissen bei diesen Vorgängen großen Einfluss auf die Aktivität des Proteins. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bisher nicht ausreichend erklärt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung der SUMOylierung PPAR $\gamma$ 2s in Bezug auf dessen Aktivität bei der Adipozytendifferenzierung und Entzündungsreaktionen zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp- und punktmutierte Plasmid-DNAs, die in unterschiedlicher Kombination funktionelle Deletionen für bekannte SUMOylierungsstellen und einer Phosphorylierungsstelle aufweisen, in HEK-Zellen und in einem humanen Adipozytenmodell (hMSC-TERT; Prawitt et al., 2008) transient transfiziert werden. Mittels Western Blot, konventioneller indirekter Immunfluoreszenz und Duolink-Immunfluoreszenz sollten dann die Expression, Lokalisation und SUMOylierung der PPAR $\gamma$ 2 Proteine untersucht werden. Im Anschluss sollte die Rolle der SUMOylierung PPAR $\gamma$ 2s hinsichtlich des adipogenetischen und immunmodulatorischen Potenzials in dem humanen Adipozytenmodell mithilfe der TaqMan *real time* PCR analysiert werden. Die Ergebnisse werden zeigen, ob die SUMOylierung PPAR $\gamma$ 2s Einfluss auf dessen adipogenetische bzw. immunmodulatorische Aktivität in hMSC-TERT nimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Abzug, nicht steril (Köttermann)

ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss)

Axiovert 200M Konfokales Laser-Mikroskop mit Bedienungssoftware (Carl Zeiss)

BioDoc Analyze Software (BD)

Biofuge pico Tischzentrifuge (Heraeus Instruments)

Biometra digital UV-Licht-Kammer (BDA) mit Powershot G3 Digitalkamera (Canon)

Biotrak II Plate Reader (Amersham Bioscience)

Brutschrank (Heraeus)

Casy Ton (Schärfe Systems)

Co2-Brutschrank (Binder)

Haerus Safe Sterilbank (Heraeus)

Milli-Q Water Purification System

NanoDrop (Thermo Scientific)

Olympus CKX31 Mikroskop (Olympus)

Power Pac 300 Spannungsgerät (Bio-Rad)

Rotant/TRC Zentrifuge (Hettich)

Sigma 6K15 Zentrifuge (Sigma)

Systemec D-65 Autoklavierschrank (Systemec)

Thermocycler (Biometra)

Thermomixer compact (Eppendorf)

Unitron temperierbarer Schüttelschrank (HT Infors)

Waage BP410S (Sartorius)

XCell Sure Lock Blotting Kammer (Invitrogen)

## 2.2 Chemikalien

Alle nicht extra benannten Chemikalien stammen von den Firmen Merck, Sigma und Roth in analytischer Qualität.

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc, Sarstedt und Falcon bezogen.

## 2.4 hPPAR $\gamma$ 2 Plasmid-DNA

### 2.4.1 hPPAR $\gamma$ 2 Wildtyp

Die PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp (Graves et al., 1992) Plasmid-DNA entstammt dem Bruce Spiegelman *Laboratory (Department of Cell Biology, Harvard University)*. Sie setzte sich aus einem pcDNA3.1 *Vector Backbone* von Addgene (5522 Basenpaare) und dem humanen PPAR $\gamma$ 2 Gen (1620 Basenpaare) zusammen.

### 2.4.2 hPPAR $\gamma$ 2 Mutanten

Die Herstellung der PPAR $\gamma$ 2 Mutanten Konstrukte erfolgte durch Dr. rer. nat. A. Bartelt, des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE), mittels *site-directed mutagenesis* PCR (Stratagene)

## 2.5 Zellkultur

### 2.5.1 Zelllinien

Es wurde mit der Telomerase-immortalisierten humanen mesenchymalen Stammzelllinie (hMSC-TERT T20) (Simonsen et al., 2002; Prawitt et al., 2008) und HEK 293T gearbeitet.

### 2.5.2 Allgemeine Zellkultur

Material:

Kulturmedium: DMEM *high glucose* (DMEM + Glutamax™ 4.5 g / L + Pyruvat, GIBCO) + 10% FCS (FBS, Bio Whittaker) + 1% Anti-Anti (Antibiotic-Antimycotic 100x, Invitrogen)

PBS: PBS-CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

Trypsin: 0.5% Trypsin-EDTA (Invitrogen)

Kryo-Medium: FCS (FBS, Bio Whittaker) + 10% DMSO (Merck)

Methode:

Die hMSC-TERT wurden in mit Kulturmedium befüllten T75 Flaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellinkubator gehalten und alle drei bis vier Tage wie folgt passagiert: Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärenen Zellen mit Trypsin (2 ml Trypsin-EDTA/ T75 Flasche) vom Boden der Flasche gelöst. Mit 4 ml Kulturmedium wurde der Trypsinierungsvorgang gestoppt. 1/6 des Volumens wurde dann in eine neue T75 Flasche überführt und mit 9 ml Kulturmedium aufgefüllt.

Mit der Zelllinie HEK 293T wurde analog verfahren.

### 2.5.3 Adipozytendifferenzierung

Material:

Kulturmedium: DMEM 4,5 g/L Glukose (GIBCO), 10% FCS, 1% PenStrep (GIBCO)

Standardmedium: DMEM 4,5 g/L Glukose (GIBCO), 5% FCS, 1% PenStrep (GIBCO)

Differenzierungsmedium: Standardmedium mit Differenzierungszusätzen

Differenzierungszusätze:

Dexamethason: 0,1 µM (Sigma)

Isobutylmethylxanthin (IBMX): 450 µM (Sigma)

Insulin: 2 µM (Sigma)

Rosiglitazon: 1 µM (Cayman)

MEK-Inhibitor (U0126): 1 µM (Calbiochem)

PBS: PBS-CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

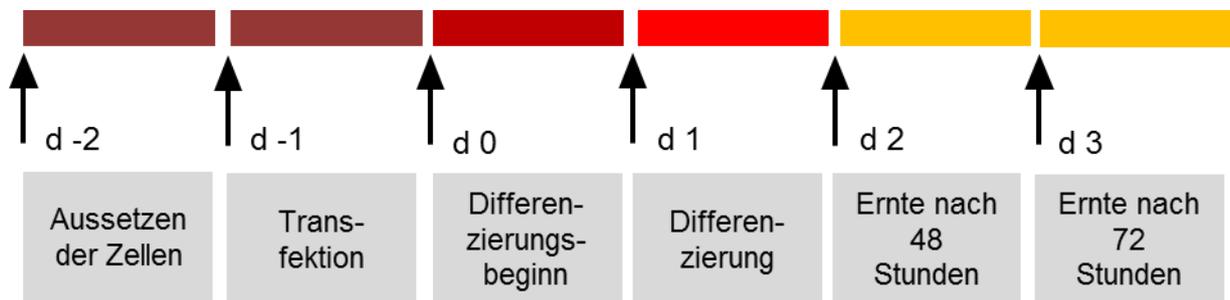
Hungermedium: DMEM *low glucose* (DMEM + Glutamax™ 1 g / L + Pyruvat, GIBCO) + 1% BSA, Fettsäure-frei (Sigma), + 1% PenStrep (GIBCO)

Methode:

Die Methode der adipozytären Differenzierung von hMSC-TERT war bereits im Labor etabliert (Prawitt et al., 2008). Das Protokoll von Prawitt et al. wurde zwecks Versuchsanpassung bezüglich der Differenzierungsdauer modifiziert.

Grundsätzlich wurden hMSC-TERT in 24-Well-Platten mit einer Konzentration von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ ml Kulturmediumlösung ausgesetzt. Die einzelnen Löcher wurden mit 0,5 ml Zelllösung befüllt (definiert als Tag -2).

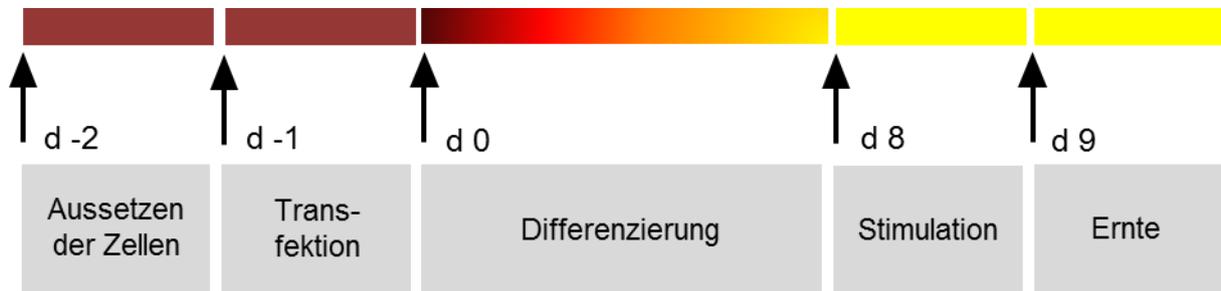
Einige Versuche verlangten lediglich eine 48- bzw. 72-stündige Differenzierung (Abb.: 2.1) der Zellen, um adipozytäre Genexpressionsmuster zu induzieren. Hierzu wurden die Zellen an Tag -1 transient mit PPAR $\gamma$ 2 Plasmid-DNA transfiziert (siehe 2.8). An Tag 0 wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und anschließend für 48 bzw. 72 Stunden mit Differenzierungsmedium plus Differenzierungszusätze (siehe Material) inkubiert. Nach Ablauf des Differenzierungsintervalls wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann die Expressionsprofile mit Hilfe von TaqMan real time PCR (ABI) analysiert (siehe 2.14).



**Abbildung 2.1: 72-stündige Differenzierung von hMSC-TERT.** Die Zellen wurden an Tag -2 in Kulturmedium ausgesetzt und an Tag 0 transient transfiziert. An Tag 2 bzw. 3 wurden die Zellen geerntet. d= Tag

Für eine 9-tägige Differenzierung (Abb.: 2.3) der Zellen, wurden diese analog zur 72-stündigen Differenzierung an Tag -2 ausgesetzt und mit Plasmid-DNA an Tag -1 transient transfiziert (Tag -2 bis Tag 0). An Tag 0 wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Differenzierungsmedium plus Differenzierungszusätze inkubiert. Am 2., 5. und 7. Tag wurde das Differenzierungsmedium der Zellen erneuert, wobei die Zusätze jedes Mal frisch angesetzt wurden. An Tag 8 wurde den Zellen der Differenzierungscocktail entzogen. Nach zweimaligem waschen mit PBS wurden die Zellen mit Hungermedium versehen

und mit den entsprechenden Zusätzen (Rosiglitazon u./o. GW9662, bzw. TNFa oder LPS) 20 Stunden inkubiert.



**Abbildung 2.2: 9-tägige Differenzierung von hMSC-TERT.** Die Zellen wurden an Tag -2 in Kulturmedium ausgesetzt und an Tag 0 transient transfiziert. An Tag 8 wurde das Kulturmedium gegen Hungermedium mit Stimulationszusätzen getauscht. 20 Stunden später wurden die Zellen geerntet. d= Tag

## 2.6 Transformation von XL10-Gold bzw. XL1-Blue

Material:

XL10-Gold bzw. XL1-Blue Zellen (Stratagene)

SOC-Medium (Stratgene)

LB-Agarplatten

10 g Trypton (Becton, Dickinson and Company)

5 g Bacto Yeast Extrakt (Fluka)

10 g NaCl

1 ml 1M NaOH

15 g Agar (Sigma)

1 L aqua dest.

Spatel zum Ausstreichen der Zellen

Heizblock

Methode:

Die Transformation der o.g. E. coli Stämme diente der Vervielfältigung von PPAR $\gamma$ 2 Plasmid-DNA. 20  $\mu$ L Zellen wurden hierfür auf Eis aufgetaut und anschließend in gekühlten Eppendorf-Tubes (2 mL) vorgelegt. Dann wurde 1  $\mu$ L der Plasmid-DNA hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Zell-DNA-Gemisch bei 42 °C im Heizblock für 30 sec erhitzt und im Anschluss erneut

für 2 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden 100 µL auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt, die Zellen 60 min im Brutschrank (37 °C, 220 rpm) inkubiert und zuletzt auf einer vorgewärmten mit Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen.

## 2.7 Plasmid-DNA Präparation

Material:

Terrific Broth:

12 g Trypton (Becton, Dickinson and Company)

24 g Bacto Yeast Extrakt (Fluka)

4 mL Glycerol

17,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dikaliumhydrogenphosphat)

1 L destilliertes Wasser

Ampicillin (100 µg/ mL)

Nucleobond EF 500 (Macherey-Nagel)

Zentrifuge (Sigma)

Methode:

Die Plasmid-DNA Präparation wurde gemäß beiliegender Anleitung des Nucleobond PC 500 EF (Endotoxin-frei) Kits durchgeführt. Zur Gewinnung des benötigten Zellmaterials wurden einzelne Klone transformierter XL-1 Blue bzw. XL-10 Gold Zellen isoliert und über Nacht in Terrific Broth Medium im Inkubator (37° C, 220 rpm) „hochgezogen“. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen pelletiert (13K, 20 min) und anschließend unter Verwendung des Kits aufbereitet. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20° C in Eppendorf-Tubes aufbewahrt.

## 2.8 Plasmid-DNA Restriktion und DNA-Gelelektrophorese

### Material:

#### Restriktion:

XbaI FD, NotI FD, Fast Digest Buffer, Aqua dest. (Fermentas)

#### DNA-Agarosegel:

TBE (Tris (Sigma) Borat (Merck) EDTA (Sigma)), Agarose 0,6% (Bethesda Research Laboratories), Etidiumbromid (Sigma)

### Methode:

Zur Analyse der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurde diese mit den Restriktionsendonukleasen XbaI FD (T/ CTAGA) und NotI FD (GC/ GGCCGC) an den enzyspezifischen Sequenzen restringiert und anschließend im DNA-Agarosegel aufgetrennt. Anhand der Markerbande wurde die Größe (bp) der beiden linearen Abschnitte (5500 bp und 1500 bp) ermittelt, addiert und mit der Größenangabe des Wildtyps verglichen.

Bei deckungsgleicher Basenpaarzahl wurden die Plasmide zur Transfektion freigegeben.

## 2.9 Transiente Transfektion von hMSC-TERT

### Material:

Plasmid-DNA

Fugene HD Transfektionsagenz (Roche)

TurboFect Transfektionsagenz (Fermentas)

Eppendorf Microtubes

### Methode:

Zur transienten Transfektion von PPAR $\gamma$ 2 Plasmid-DNA wurde das Transfektionsagens Fugene HD in hMSC-TERT Versuchen und Turbofect in HEK 293T Versuchen verwendet. Die entsprechenden Zellen wurden hierfür in 6-Well-Platten (300.000 Zellen/ Well) bzw. 24-Well-Platten (75.000 Zellen/ Well) unter sterilen Bedingungen ausgesetzt. Nachdem die Zellen 80% Konfluenz aufwiesen,

wurde die Transfektion mithilfe des jeweiligen Transfektionsagens durchgeführt. Es wurde gemäß beiliegender Anleitung verfahren, wobei das Agens und die aus der Plasmidpreparation gewonnene DNA in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt wurden.

## 2.10 Herstellung eines Gesamtzelllysats

Material:

- DPBS (GIBCO)

- Zelllysispuffer:

NaCl 150 mM

SDS 0.1 % (Serva)

Na.Deoxycholat 0.5 %

Triton X 100 1%

Proteaseinhibitor Cocktail (Roche)

Methode:

Die Zellen wurden mit vorgewärmten DPBS zweimal gewaschen und mit RIPA-Puffer lysiert. Die verwendete Puffermenge hing dabei von der Anzahl der ausgesetzten Zellen ab. In der Regel wurden 250 ml Lysepuffer pro 6-Well (entspricht  $3 \times 10^5$  ausgesetzte Zellen) oder 50 ml pro 24-Well ( $7,5 \times 10^4$  ausgesetzte Zellen) verwendet. Anschließend wurde das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und sonifiziert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurde das Lysat bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren.

## 2.11 Proteinbestimmung nach SDS-Lowry

### Material:

- 0,1 M NaOH
- Folin-Ciocalteus-Reagenz (Merck)
- BSA-Standardreihe 2 mg/mL (Pierce)
- Lösung A:
  - 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Mallinckrodt Baker)
  - 0,02% NaK-Tartrat
  - in 0,1 M NaOH
- Lösung B:
  - 0,5% CuSO<sub>4</sub> (Pentahydrat)
  - 5% SDS (Serva)
- in aqua dest.
- Lösung C: Lösung A + Lösung B (50:1)
- Mikrotiterplatte (Nunc)
- ELISAreader (Amersham)
- Biochrom Ltd. Software

### Methode:

Die Proteinbestimmung nach SDS-Lowry diente der Quantifizierung des Proteingehalts im Gesamtzelllysat. Für die Proteinbestimmung wurden 10 µL Probe (Gesamtzelllysat) mit 1 M NaOH im Verhältnis 1:5 verdünnt. Dann wurden 1 mL Lösung C pro Messwert hinzugefügt, das Gemisch „gevortext“ und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde Folin-Ciocalteus mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt und davon 100 µL zum Probengemisch hinzugegeben. Nach erneutem Vortexen und 15 minütiger Inkubation unter Lichtausschluss, wurden je 300 µL Probengemisch pro Loch in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und bei 760 nm im ELISA-Plate-Reader ausgelesen. Anhand des Lichtabsorptionsmaxima, in Relation zu einer mit der BSA-Standardreihe (Konzentration = 0,0635 bis 2mg/ dL) ermittelten Eichkurve, wurde die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

## 2.12 Western Blot

Als Ausgangsmaterial für den Western Blot wurde das Gesamtzelllysate transient transfizierter hMSC-TERT bzw. HEK 293T Zellen unter Berücksichtigung der jeweiligen durch die SDS-Lowry ermittelten Proteinkonzentration verwendet.

### 2.12.1 Gelelektrophorese

Material:

RPN800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare)

Loading Dye

25% Glycerol (Sigma) -Bromphenol Blau (Pharmacia Biotech)

25%  $\beta$ -Mercaptoethanol (Serva)

50% SDS (10%) (Serva)

NuPAGE Transfer Buffer (20X) (Invitrogen)

Aqua dest.

NuPAGE Elektrophoreseigel (Invitrogen)

Power Pac 300 Spannungsgerät (Bio-Rad)

Methode:

Mithilfe der Gelelektrophorese wurden die Proteine des Gesamtzelllysats entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurde das entsprechend des Proteingehalts verdünnte Gesamtzelllysate zunächst 10 Minuten bei 70 °C denaturiert und mit *loading dye* versetzt. Das Gel wurde in die XCell Sure Lock Blotting Kammer eingesetzt und die Kammer mit 25 ml NuPAGE Transfer Buffer (20X) sowie 475 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden die Gel-Slots mit dem Proteingemisch bzw. RPN 800E Marker beladen und die einzelnen Proteine bei einer Spannung 180 V ihrer spezifischen Größe nach aufgetrennt.

### 2.12.2 Blotting

Material:

Blotting Puffer

56,2 g 150 mM Glycin

12,1 g 20 mM Tris

ad 4 l Aqua dest.

1 l MeOH

Nitrocellulose Membran Porengröße 0,45 µm (Protran, Whatman)

Blotting-Papier (Whatman)

Blotting-Gehäuse (XCell Sure Lock, Invitrogen)

2301 Macrodrive 1 Spannungsgerät (LKB Bromma)

Methode:

Beim Blottingvorgang wurden die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Hierfür wurde gemäß des sog. „*Wet-Blot*“-Verfahrens ein „*Blotting-Sandwich*“, bestehend aus Gel und Membran (umschlossen von 2-mal drei Blättern Whatman Papier), hergestellt, welcher dann in einer mit Blottingpuffer gefüllten Blottingkammer einer konstanten Spannung von 400 mA für 4 Stunden ausgesetzt wurde.

### 2.12.3 Färbung nach Ponceau

Material:

Ponceau-Färbelösung 0,2% in 3% TCA (Serva)

PBS (GIBCO)

Methode:

Mittels Ponceau-Färbung wurde der Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Nitrocellulose Membran nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran 10 Minuten in Ponceau-Lösung inkubiert und nach anschließendem Waschen mittels Scanner dokumentiert. Abschließend wurde die Membran zur Immundetektion vollständig mit PBS entfärbt.

### 2.12.4 Immundetektion

Material:

10x TBS

400 g 1,4 M NaCl (J.T. Baker)

121 g 200 mM Tris

ad 5 l Aqua dest.

auf pH 7,6 eingestellt

auf 1x TBS verdünnt

TBS-Tween (0,1% Tween (Sigma) in 1x TBS)

Blocklösung (5% Milchpulve (Sigma) in TBS-Tween)

Antikörper 1 (in 5% BSA (Calbiochem) in TBS-Tween)

Antikörper 2 (in Blocklösung)

Lumineszenzreagenz (Amersham)

Fotopapier (Kodak)

Fotokassette ( Hypercassette, Amersham)

Fotoentwicklungsmaschine (Kodak)

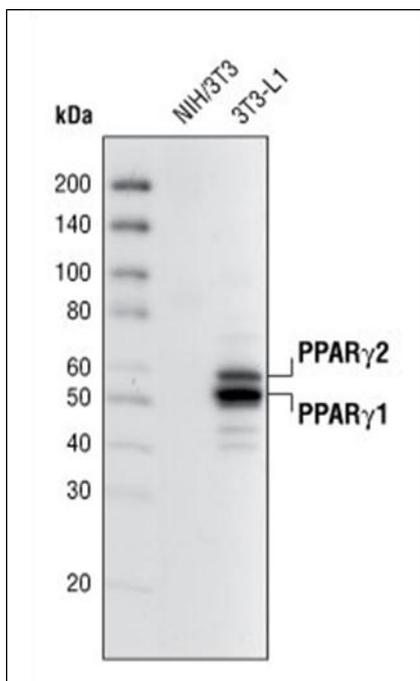
Methode:

In der hier durchgeführten Immundetektion wurden bestimmte Proteine durch spezifische monoklonale Primärantikörper detektiert und mittels nachfolgender Zweitantikörper-Interaktion und Lumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Hierzu wurde die Membran (siehe 2.11.2) zunächst 45 min in Blocklösung zwecks Absättigung freier unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-Tween gewaschen und über Nacht mit dem ersten Antikörper bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und anschließend 4 Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Zuletzt wurde die Membran erneut 3-mal mit TBS-Tween gewaschen, mit PBS gespült und dann nach Empfehlung des Herstellers mit dem Lumineszenzreagenz benetzt. Die Fotoentwicklung fand mithilfe einer Fotoentwicklungsmaschine statt.

**Tabelle 1: Im Western Blot verwendete Antikörper**

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller	Herkunft	Verdünnung
Primär	81B8	Cell Signalling	Rabbit	1:1000
Sekundär	GARPO	Jackson ImmunoResearch	Goat	1:5000

Zur Detektion von PPAR $\gamma$ 2 Protein wurde der primäre Antikörper PPAR $\gamma$  81B8 (rabbit) verwendet. Als Sekundärantikörper diente der speziesspezifische Sekundärantikörper GARPO (Goat Anti Rabbit Peroxidase).



**Abbildung 2.3: Darstellung von PPAR $\gamma$ 2 und PPAR $\gamma$ 1 in 3T3-L1 Fibroblasten mithilfe des Primärantikörpers 81B8 (Cell Signalling) im Western Blot.**

Quelle: Cell Signalling

[http://www.cellsignal.com/products/images/2443\\_wb\\_jp\\_070529.jpg](http://www.cellsignal.com/products/images/2443_wb_jp_070529.jpg)

## 2.13 Konventionelle Immunfluoreszenz-Färbung (IMF)

### Material:

PGS: 0,5% Glycin, 0,5% Saponin in PBS (GIBCO)

PGTS: 0,5% Glycin, 0,5% Saponin, 0,5% Tritron in PBS (GIBCO)

Blocklösung: 1% BSA (Calbiochem) in PGS

DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid): Stammlösung 0,2 mg/mL (Roche)

Paraformaldehyd (4%) (Fluka)

Mowiol / PPD 9:1 (Calbiochem)

### Methode:

Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung PPAR $\gamma$ 2-transfizierter Zellen diente der visuellen Analyse bezüglich intrazellulärer Lokalisation des exogenen Transkriptionsfaktors sowie diesbezüglicher Unterschiede zwischen den einzelnen PPAR $\gamma$ 2 Mutanten. Hierzu wurden hMSC-TERT auf Coverslips in einer 24-Well-Platte (75.000 Zellen / Well) für einen Zeitraum von 24h ausgesetzt. Danach erfolgte die transiente Transfektion der Zellen mit PPAR $\gamma$ 2 Mutanten DNA unter Verwendung des Transfektionsagens „Fugene HD“ (Roche) im Verhältnis 3:1 (Fugene HD : DNA) nach Angaben des Herstellers.

Am Tag der Färbung wurden die Zellen zunächst 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend 30 min in PFA-Lösung (4%) fixiert. Es folgte 3-maliges Waschen mit PGTS, sowie die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mithilfe der Blocklösung, bevor die Zellen 1h bei 37 °C in einer feuchten Kammer mit dem ersten Antikörper (spezifische Verdünnung in Blocklösung) inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen erneut gewaschen (3-mal PGS) und dann mit dem Fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper 45 min bei 37 °C (feuchte Kammer) inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte zeitgleich durch das Hinzufügen von DAPI (1:1000) zum Antikörper-Blocklösung-Gemisch. Abschließend wurden die Zellen 4-mal mit PBS gewaschen und mit Mowiol/ PPD zwischen dem Coverslip und einem Objektträger eingedeckelt. Die Bilder wurden am konfokalen Laser-Mikroskop (Zeiss) akquiriert.

**Tabelle 2: In der indirekten Immunfluoreszenz (IMF) verwendete Antikörper**

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller	Herkunft	Verdünnung
<b>Primär</b>	81B8	Cell Signalling	Rabbit	1:200
<b>Sekundär</b>	GARPO	Jackson ImmunoResearch	Goat	1:250

Zur Detektion von PPAR $\gamma$ 2 Protein wurde der primäre Antikörper PPAR $\gamma$  81B8 (rabbit) verwendet. Als Sekundärantikörper diente der speziesspezifische Sekundärantikörper Cy3 (Cyanine Dye).

## 2.14 Duolink Immunfluoreszenz-Färbung

Material:

Duolink Immunfluoreszenz-Kit (Olink)

Paraformaldehyd (4%) (Fluka)

PGS: 0,5% Glycin, 0,5% Saponin in PBS (GIBCO)

PGTS: 0,5% Glycin, 0,5% Saponin, 0,1% Tx100 in PBS (GIBCO)

Blocklösung: 1% BSA (Calbiochem) in PGS

TBS-Tween (4,4 g NaCl, 0,6 g Tris, 0,25 g Tween, ad 500 ml, ph 7,4)

Mowiol-PPD (1:10) (Calbiochem)

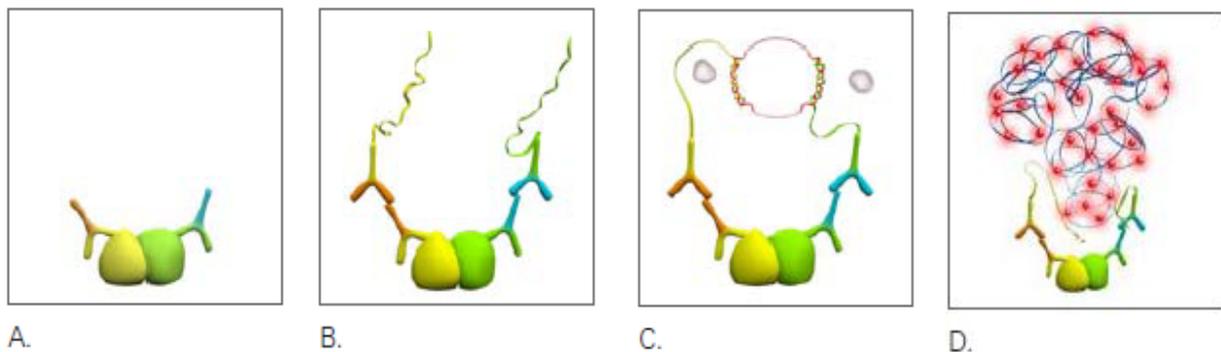
Antikörper 1a

Antikörper 1b

Methode:

Die Duolink-Methode (Olink) ermöglicht mittels sogenannter in situ PLAs (*Proximity Ligation Assays*) die Interaktion zweier Proteine, hier die kovalente Bindung zwischen SUMO und PPAR $\gamma$ 2, basierend auf einer Immunfluoreszenz-Färbung, sichtbar zu machen. Nachdem die gewünschten Zielproteine mithilfe spezifischer Primärantikörper unterschiedlicher Wirt-Spezies markiert sind, werden Duolinks Spezies-spezifische Sekundärantikörper appliziert. Sie sind mit bestimmten DNA-Strängen versehen, die im Kit enthaltene Oligonukleotide binden. Befinden sich die unterschiedlichen Oligonukleotid-Stränge in einem Abstand von < 40 nm, werden sie mittels einer Ligase ligiert. Anschließend wird das Produkt amplifiziert und zuletzt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und detektiert. Die Interaktion der beiden

Zielproteine werden durch eine fluoreszierende Kollokalisierung repräsentiert, die mithilfe des konfokalen Lasermikroskops analysiert und dokumentiert wurde. Zur Durchführung der Methode wurden hMSC-TERT analog zur konventionellen IMF (2.12) auf Coverslips in einer 24-Well Platte ausgesetzt und anschließend unter Anwendung von Fugene HD mit Plasmid-DNA transfiziert. Am Tag der Färbung wurde das Duolink in situ PLA Kit gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.



**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz nach der Duolink-Methode.**

A. Primärantikörper-Opsonierung, B. Sekundärantikörper-Opsonierung C. Ligation  
D. Amplifikation

Quelle: Duolink II Fluorescence User Manual

<http://www.eurogentec.com/EGT/files/Olink/Duolink-II-Fluorescence-User-Manual.pdf>

## 2.15 Molekulare Charakterisierung von Zellen

### 2.15.1 mRNA-Isolierung

Material:

TRIzol Reagent (Invitrogen)

Chloroform (Roth)

NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel)

Methode:

Zur Gewinnung von mRNA aus den Versuchszellen wurde das NucleoSpin RNA II Kit anleitungsgemäß verwendet. Um das hierfür benötigte Zellmaterial zu gewinnen, wurden zuvor ausgesetzte und transfizierte Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und

anschließend mit 500 µl TRIzol pro 24-Well denaturiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen in einen Eppendorf-Tube überführt und 100 µl Chloroform hinzugegeben. Das Gemisch wurde dann 10 sec „gevortext“ und anschließend 10 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert. Der dadurch entstandene klare Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt und 150 µl EtOH (96%) hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen durch Invertieren wurde das Produkt auf die Silica-Membran des NucleoSpin RNA II Kits übertragen und im weiteren Verlauf nach den Vorgaben der Anleitung verfahren. Abschließend wurde die isolierte RNA in 40 µl DNase-freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration im NanoDrop UV-Spektrometer (Peqlab) bestimmt.

### **2.15.2 cDNA-Synthese**

Material:

High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems)

RT Mastermix (Applied Biosystems, Roche)

5 µl Reverse Transcription Buffer (10x)

2 µl dNTP-Mix (25x)

5 µl *random primers* (10x)

2,5 µl MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U / µL)

2,5 µl RNase Inhibitor (10 U / µL)

8 µl Nuclease-freies (DEPC-) H<sub>2</sub>O

Thermocycler (Biometra)

Methode:

Die reverse Transkription der RNA (2.14.1) zu cDNA erfolgte unter der Verwendung des High Capacity cDNA Transcription Kits (Applied Biosystems) sowie nach Vorgaben beiliegender Anleitung. Hierzu wurden 1 µg RNA in 25 µl Nuclease-freiem (DEPC-) H<sub>2</sub>O gelöst und 25 µl RT Mastermix hinzugefügt. Die Synthese der cDNA erfolgte dann im Thermocycler nach folgendem Protokoll: Inkubation bei 25 °C für 10 min, bei 37 °C für 120 min, bei 70 °C für 10 min.

### 2.15.3 TaqMan *real-time* PCR

Material:

ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems)

TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Roche)

Master Mix:

- 15 µL TaqMan 2x Universal PCR Master Mix
- 5 µL cDNA 1:5 in RNase freiem Wasser verdünnt
- 1,5 µL des jeweiligen Assay on Demand (AoD) (20x)
- ad 30 µL Nuclease-free (DEPC-treated) H<sub>2</sub>O

Methode:

Die Quantifizierung der Expression einzelner Gene erfolgte mittels TaqMan *real-time* PCR (Applied Biosystems). Sie beruht auf der Messung eines Sonden-vermittelten Fluoreszenzsignals, das im Zuge der cDNA-Amplifikation proportional zur Produktmenge ansteigt. Die Sonden bestehen aus einer spezifischen Sequenz, die am einen Extrem einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Extrem einen kompensierenden Quencher-Fluoreszenzfarbstoff aufweist. Mittels Einsatz spezifischer Primer des *Assay on Demand* (AoD) wird die gewünschte Sequenz amplifiziert, jedoch der inhibitorische Effekt des Quencher-Fluoreszenzfarbstoffs durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aufgehoben. So korreliert die Signalstärke mit der Produktmenge eines bestimmten Zeitpunkts. Die Signalstärke wird mithilfe des ABI Prism 7900HT bezogen auf das hier verwendete *Housekeeping* -Gen TATA-box-binding protein (TBP) (Normierung auf 10<sup>4</sup> Kopien TBP) gemessen.

**Tabelle 3: TaqMan *real time* PCR Sonden**

Quantifiziertes Gen	Assay on Demand (AoD)	Assay ID
<b>ADIPOQ</b>	hADIPOQ	Hs00605917_m1
<b>CCL2</b>	hCCL2/ hMCP1	Hs00234140_m1
<b>FABP4</b>	hFABP4	Hs00609791_m1
<b>IL6</b>	hIL6	Hs00174131_m1
<b>PPARG</b>	hPPARG	Hs00234592_m1
<b>TBP</b>	hTbp	Hs00270322_m1

Zur Quantifizierung der Genexpression wurden genspezifische Sonden (AoD) verwendet.

## 3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse werden inhaltlich in drei Teile gegliedert. Anfangs wurden der PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp und die für diese Arbeit mittels gezielter Punktmutation erstellten PPAR $\gamma$ 2-Mutanten zwecks Überprüfung der Mutationsloci sequenziert. Anschließend wurde die Expressionsfähigkeit von PPAR $\gamma$ 2 in transient transfizierten Zellen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *real time* PCR (TaqMan) bzw. auf Proteinebene mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz (IMF) und des Western Blots analysiert (**3.1.**).

Im zweiten Abschnitt wurden PPAR $\gamma$ 2 und dessen Mutante  $\Delta$ 3 hinsichtlich ihrer Eigenschaften der posttranslationalen Modifizierung mithilfe von Western Blots und Duolink-Immunfluoreszenzen untersucht (**3.2.**).

Im letzten Abschnitt wurde das adipozytäre Differenzierungspotenzial von PPAR $\gamma$ 2 und dessen Mutante  $\Delta$ 3 sowie ihre Bedeutung für die Regulierung entzündlicher Signalwege geprüft. Dies geschah mittels Messung der Expression repräsentativer Adipozytenmarker und Adipozytokine unter bestimmten Bedingungen mit quantitativer *real time* PCR (**3.3.**).

### 3.1 Charakterisierung

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Plasmide, die das PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp-Gen bzw. dessen Mutanten mit Deletionen im Bereich bekannter SUMOylierungs- und/oder einer Phosphorylierungsstelle beinhalten. Mittels Sequenzanalyse, DNA-Gel-Elektrophorese, quantitativer *real time* PCR, Western Blots und Immunfluoreszenzen werden in diesem Abschnitt die oben genannten PPAR $\gamma$ 2-Mutanten hinsichtlich der Korrektheit der Punktmutationsloci sowie der Expressivität des Gens auf mRNA- und Proteinebene in hMSC-TERT analysiert.

#### 3.1.1 DNA-Sequenzierung

Das für den PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp kodierende Plasmid wurde freundlicher Weise von den „Bruce Spiegelman Laboratories“ (Harvard University, USA) zur Verfügung gestellt. Es setzte sich aus einem pcDNA3.1 *Vector Backbone* (5522 Basenpaare) und dem

humanen PPAR $\gamma$ 2 Gen (1620 Basenpaare) zusammen. Nachträglich wurden mittels Primer-basierter *site directed mutagenesis* an SUMO-Konsensus Motiven ( $\Psi$ KXE/D, wo  $\Psi$  einer aliphatischen Aminosäure entspricht und X eine beliebige Aminosäure repräsentiert) sowie an etwaigen benachbarten Phosphorylierungsstellen Basen des Gens ausgetauscht, um einen Funktionsverlust zu erzielen (Abb. 3.1). Der Erfolg der Mutagenese wurde mithilfe einer von Eurofins MWG Operon durchgeführten Primer-basierten DNA-Sequenzanalyse des Wildtyps und der Mutanten überprüft.

1	mgetlgsdspi	dpesdsftdt	lsanisqemt	mvdtempfwp	tnfgissvdl	svmedhshsf
61	dikpfttvdf	ssistphyed	ipftrtdpvv	adykydlklq	eyqsaikvep	asppyysekt
121	qlynkpheep	snslmaiecr	vgcdkasgfh	ygvhacegck	gffrrtirkl	liydrcdlnc
181	rihkksrnkc	qycrfqkla	vgmshnairf	grmpqaekek	llaeissdid	qlnpesadlr
241	alakhlydsy	iksfpltkak	arailtgktt	dkspfvdydm	nslmmgedki	kfkhitplqe
301	qskevairif	qgcqfrsvea	vqeiteyaks	ipgfvnldln	dqvtllkygv	heiytmlas
361	lmnkdgvlis	eggfmtref	lkslrkpfgd	fmepkfefav	kfnaleldss	dlaiaviiv
421	lsgdrpglln	vkpiedi qdn	llqalelqlk	lnhpessqlf	akllqkmtdl	rqivtehvql
482	lqviktetd	mslhpllqei	ykdly			
	SUMOylierungsstelle 1 SUMOylierungsstelle 2 Phosphorylierungsstelle					

**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des humanen PPAR $\gamma$ 2 (PPARG) Gens als Aminosäureabfolge.** SUMOylierungsmotive und eine Phosphorylierungsstelle sind farblich gekennzeichnet.

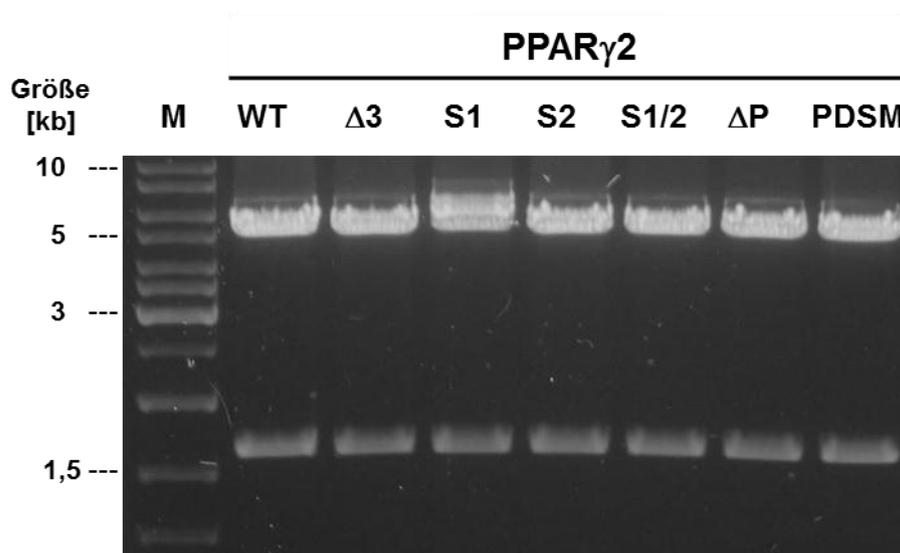
Die Sequenz des PPAR  $\gamma$  Wildtyps war deckungsgleich mit einer humanen PPAR $\gamma$ 2 cDNA. Die Mutanten wiesen aufgrund gezielter Punktmutationen die in Tabelle 4 aufgeführten Veränderungen auf.

**Tabelle 4: PPAR $\gamma$  Mutanten mit Erläuterung des jeweiligen Merkmals**

Mutante	Merkmal
<b>S1</b>	Basenaustausch an SUMOylierungsstelle 1 (K107R)
<b>S2</b>	Basenaustausch an SUMOylierungsstelle 2 (K395R)
<b>S1/2</b>	Kombination aus Mutante S1 und S2
<b><math>\Delta</math>P</b>	Basenaustausch im Bereich der Phosphorylierungsstelle (S112A)
<b>PDSM</b>	Kombination aus Mutante S1 und $\Delta$ P
<b><math>\Delta</math>3</b>	Kombination aus Mutante S1, S2 und $\Delta$ P

### 3.1.2 Darstellung der PPAR $\gamma$ Mutanten auf DNA-Ebene (Plasmidrestriktion)

Nach Transformation und Aufreinigung der Plasmide wurden diese mithilfe der Restriktionsendonukleasen XbaI und NotI restringiert und anschließend im DNA-Agarosegel aufgetrennt. Auf diese Weise wurden zwei lineare Fragmente von 5522 Basenpaaren (*Vector-Backbone*) bzw. 1620 Basenpaaren (PPARG) nachgewiesen, was als Beweis der Isolierung und Vervielfältigung der gesuchten Plasmide gewertet wurde (Abb. 3.2).

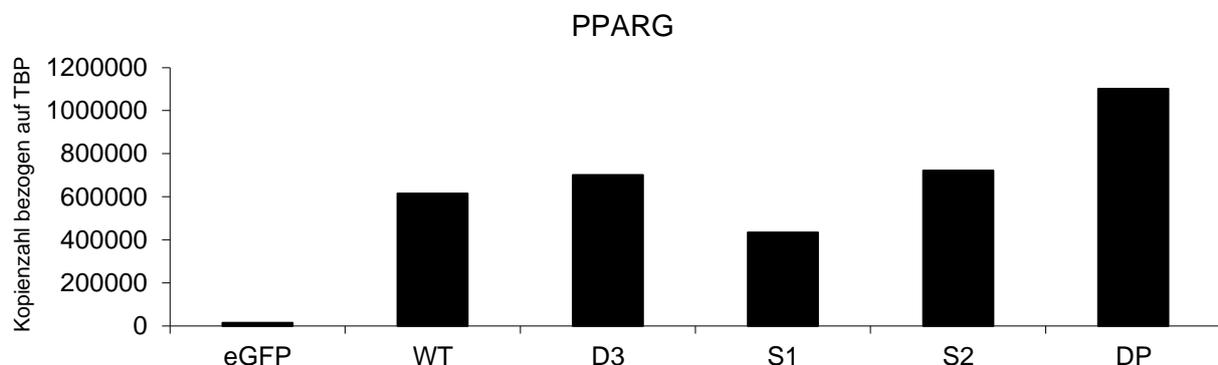


**Abbildung 3.2: Gelelektrophorese von restringierter PPAR $\gamma$ 2-Plasmid-DNA (Wildtyp und dessen Mutanten).** Plasmid-DNA, kodierend für den nukleären Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$ 2 und dessen Mutanten wurde mittels der Enzyme XbaI FD und NotI FD restringiert. Die entstanden Fragmente wurden anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. M=Marker, WT=Wildtyp

### 3.1.3 Messung der Expression von PPAR $\gamma$ mittels TaqMan *real time* PCR

Die TaqMan *real time* PCR stellt eine sensitive Methode zur Quantifizierung von mRNA-Expression dar. Mithilfe dieser Methode wurde die Expression des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps und dessen Mutanten auf mRNA-Ebene nach transienter Transfektion in hMSC-TERT nachgewiesen und quantifiziert. Hierzu wurde aus den transfizierten Zellen eine Gesamt-RNA isoliert und daraus nach mehreren Bearbeitungsschritten eine cDNA synthetisiert. Unter Verwendung einer spezifischen PPAR $\gamma$  Sonde konnte für den PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp und die Mutanten die mRNA-Menge repräsentativ quantifiziert werden (Abb. 3.3).

Nicht-transfizierte hMSC-TERT exprimierten bereits basal eine geringe Kopienzahl des für die Adipogenese essentiellen Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$ 2 (siehe eGFP Kontrolle). Die mit PPAR $\gamma$ 2 transfizierten hMSC-TERT wiesen jedoch mit Kopienzahlen zwischen  $6 \times 10^5$  und  $1,2 \times 10^6$  eine weit darüber hinausreichende Überexpression auf. Die Höhe der transfizierten mRNA-Menge ist zwischen den Mutanten sehr gut vergleichbar.

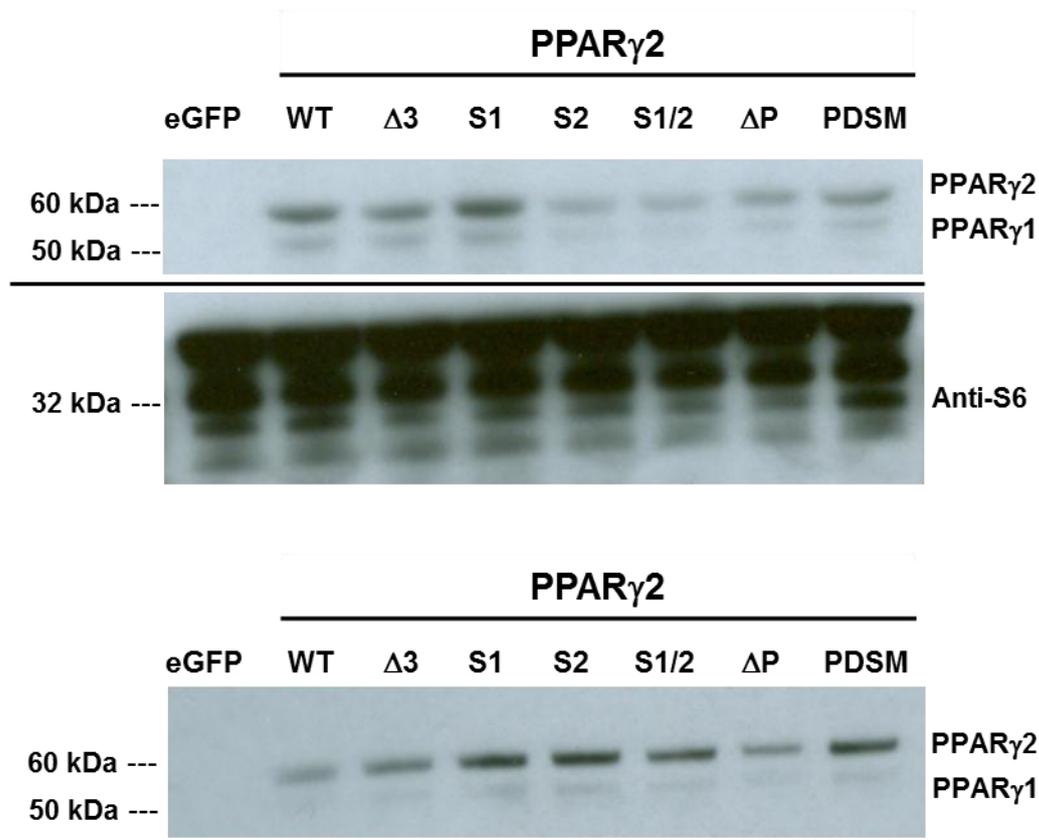


**Abbildung 3.3: Überexpression von PPAR $\gamma$  in PPAR $\gamma$ 2-transfizierten hMSC-TERT.** In nicht-differenzierten hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA transient transfiziert. Die mit der TaqMan *real time* PCR-Methode ermittelten Kopienzahlen von PPARG wurde auf das *Housekeeping*-Gen hTBP bezogen. Die Daten zeigen den Mittelwert eines repräsentativen Experiments (n=2, in Vierfachwerten gemessen). WT= Wildtyp, D3=  $\Delta$ 3, DP=  $\Delta$ P.

### 3.1.4 Darstellung von PPAR $\gamma$ auf Proteinebene mittels Western Blot

Hohe Konzentrationen transfizierter PPAR $\gamma$ 2 Plasmid DNA führten zu einer gesteigerten Translation von PPAR $\gamma$ 2 Protein in den Zellen. Im Western Blot ließ sich dies mithilfe des PPAR $\gamma$  spezifischen Primärantikörpers PPAR $\gamma$  81B8 anhand

spezifischer Banden bei etwa 60 kDa nachweisen (Abb. 3.4). Sowohl der PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp als auch die PPAR $\gamma$ 2-Mutanten  $\Delta$ 3, S1, S2, S1/2,  $\Delta$ P und PDSM zeigten entsprechende Banden. Die diskrete Bande bei ~50 kDa repräsentiert endogenes PPAR $\gamma$ 1 (Vgl. Abb. 2.3 und 3.8). In der eGFP Kontrolle war kein Protein von entsprechender Größe mittels o.g. Antikörper detektierbar. S6 wird als Teil der 40S ribosomalen Untereinheit in hMSC-TERT exprimiert (Prawitt et al., 2008). Als ribosomales Protein kommt ihm wahrscheinlich eine Funktion in der Translation von Proteinen zu. Hier dient seine Detektion der Ladekontrolle.



**Abbildung 3.4: Western Blot. Nachweis des transient transfizierten PPAR $\gamma$ 2 und dessen Mutanten in hMSC-TERT (A) und HEK 293T (B).** In hMSC-TERT und HEK 293T wurde PPAR $\gamma$ 2 kodierende Plasmid-DNA transient transfiziert. Es wurde in beiden Blots eine Proteinmenge von 12 $\mu$ g/ Probe eingesetzt. Das translatierte Protein wurde mit dem spezifischen Antikörper PPAR $\gamma$  81B8 detektiert. Das Protein PPAR $\gamma$ 2 ist durch eine Bande bei ca. 60 kDa repräsentiert. Darunter befindet sich eine schwache Bande für endogenes PPAR $\gamma$ 1. S6 diente als Ladekontrolle.

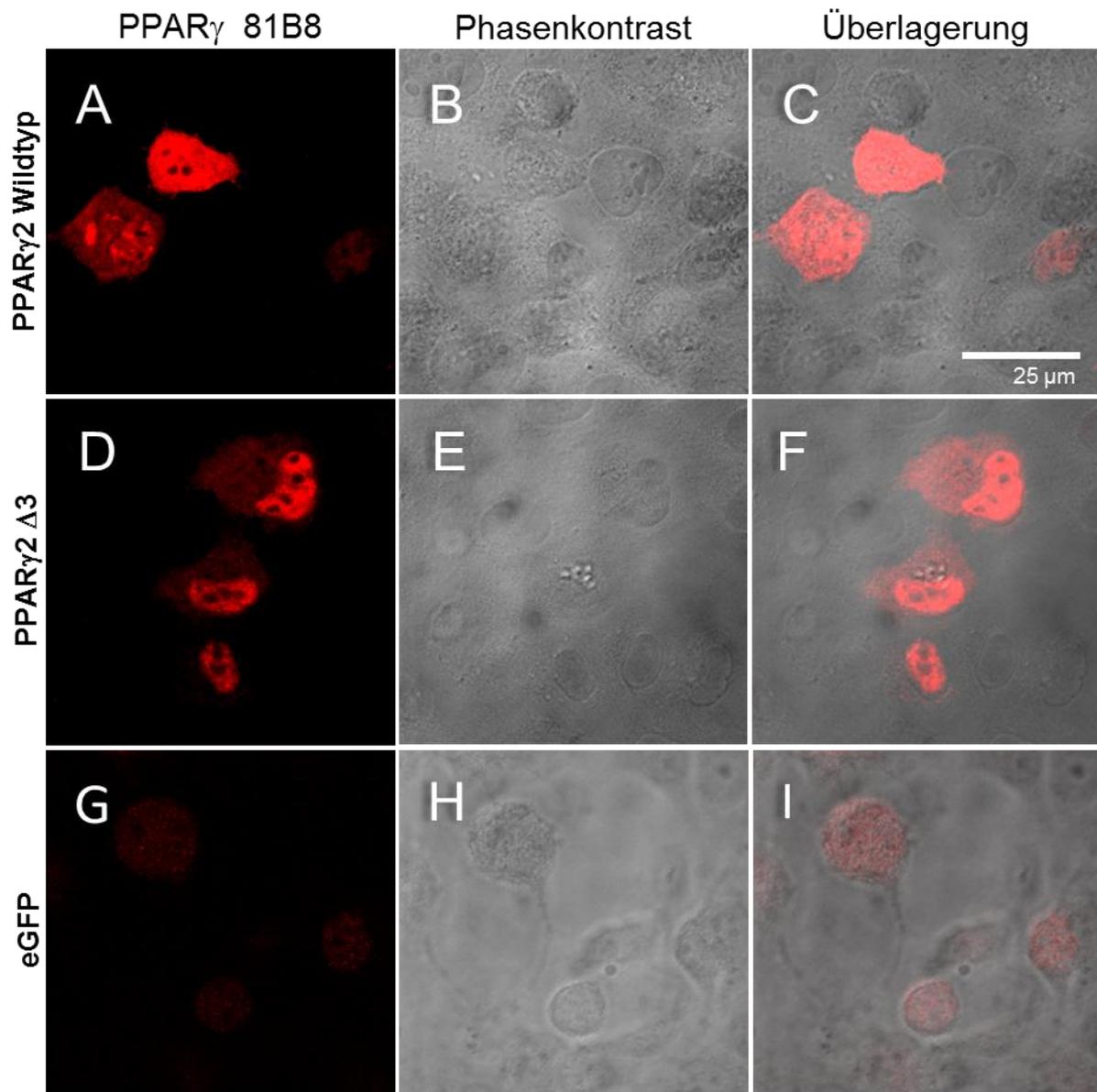
### 3.1.5 Darstellung von PPAR $\gamma$ auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz

Mithilfe der Immunfluoreszenz-Methode lässt sich nicht nur die Translation der transfizierten PPAR $\gamma$ 2 Plasmid DNA nachweisen, sondern auch eine Aussage über die Lokalisation des überexprimierten Proteins treffen.

In nicht-differenzierten hMSC-TERT wurde hierfür PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA transient transfiziert. Nach der Fixierung der Zellen in PFA wurden durch den PPAR $\gamma$  spezifischen Primärantikörper 81B8 PPAR $\gamma$  Proteine detektiert und anschließend mit dem entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Aufnahmen der Zellen wurden am konfokalen Lasermikroskop erstellt.

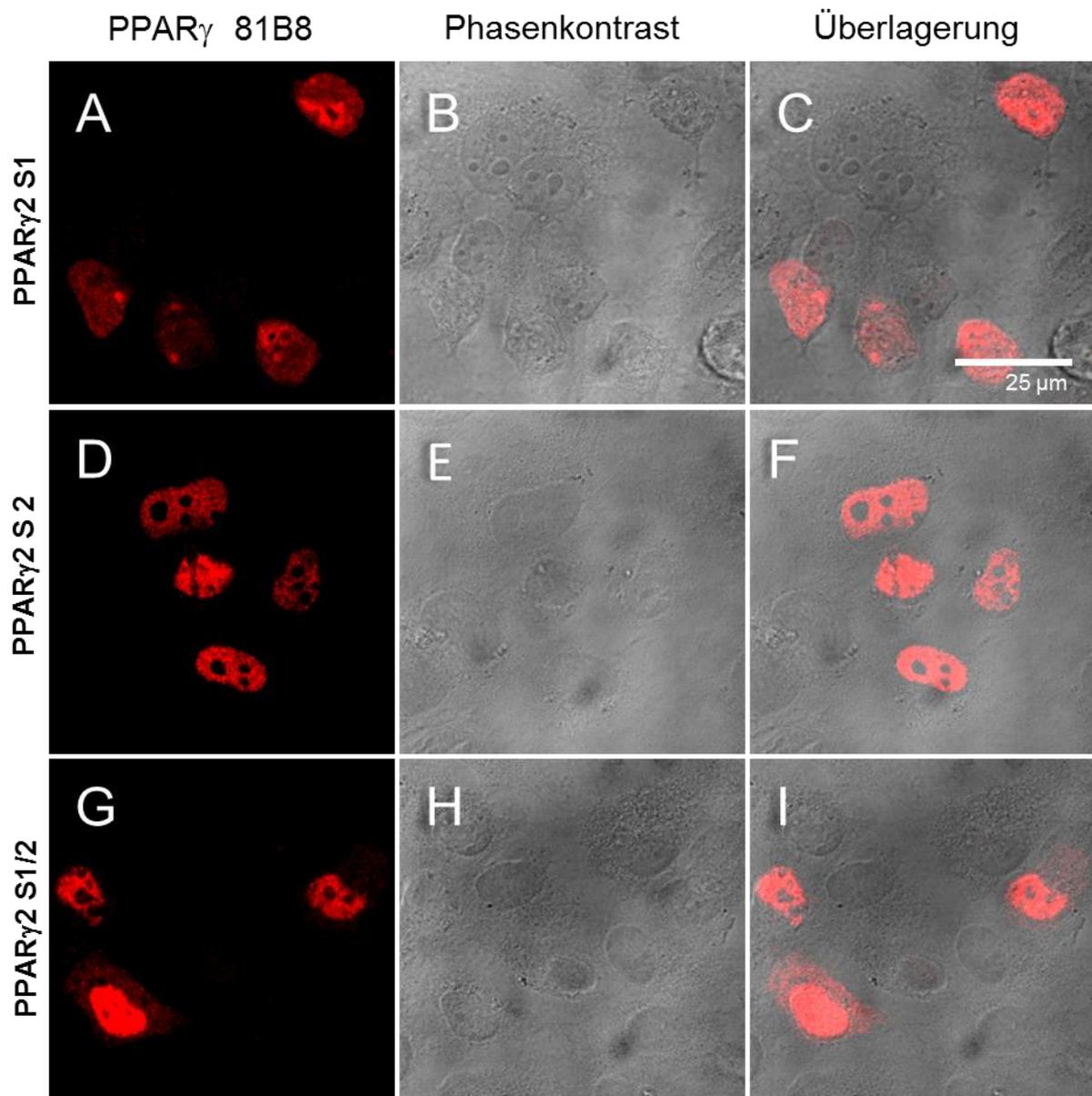
In Übereinstimmung mit der TaqMan *real time* PCR (3.1.3) und dem Western Blot (3.1.4) führte die Transfektion von hMSC-TERT mit PPAR $\gamma$ 2-Wildtyp und  $\Delta$ 3 DNA zur Überexpression von PPAR $\gamma$ 2. Der exogen eingebrachte nukleäre Transkriptionsfaktor fand sich als rote Fluoreszenz ausschließlich im Zellkern (Abb. 3.5 A-F).

Als Kontrolle wurden hMSC-TERT mit eGFP transfiziert. Hierbei waren geringe Mengen von PPAR $\gamma$  im Nukleus mithilfe des Antikörpers PPAR $\gamma$  81B8 zu detektieren (Abb. 3.5 G-I).



**Abbildung 3.5: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Nachweis des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps und der Mutante  $\Delta$ 3 nach transienter Transfektion in nicht-differenzierte hMSC-TERT.** In nicht-differenzierte hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2 kodierende Plasmid-DNA transient transfiziert. Das translatierte Protein wurde mit dem spezifischen primären Antikörper PPAR $\gamma$  81B8 detektiert. Aufgrund des verwendeten sekundären Antikörpers erscheint PPAR $\gamma$  im konfokalen Lasermikroskop als rote Fluoreszenz im Kern der Zellen. eGFP-transfizierte Zellen dienten der Kontrolle.

Die PPAR $\gamma$ 2-Mutanten S1, S2, S1/2,  $\Delta$ P und PDSM wurden nach Transfektion in hMSC-TERT ebenfalls translatiert und im Zellkern überexprimiert (Abb. 3.6 a und b). Es bestand kein Unterschied bezüglich der Expression und Lokalisation gegenüber dem PPAR $\gamma$ 2-Wildtyp.



**Abbildung 3.6a: Immunfluoreszenzfärbung. Nachweis der PPAR $\gamma$ 2 Mutanten S1, S2, S1/2, nach transienter Transfektion in nicht-differenzierte hMSC-TERT.** In nicht-differenzierte hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA der Mutanten transient transfiziert. Das translatierte Protein wurde mit dem spezifischen Antikörper PPAR $\gamma$  81B8 detektiert. Aufgrund des verwendeten sekundären Antikörpers erscheint PPAR $\gamma$ 2 im konfokalen Lasermikroskop als kernständige rote Fluoreszenz. Es ist für alle Mutanten in einzelnen Zellen eine Überexpression nachweisbar.

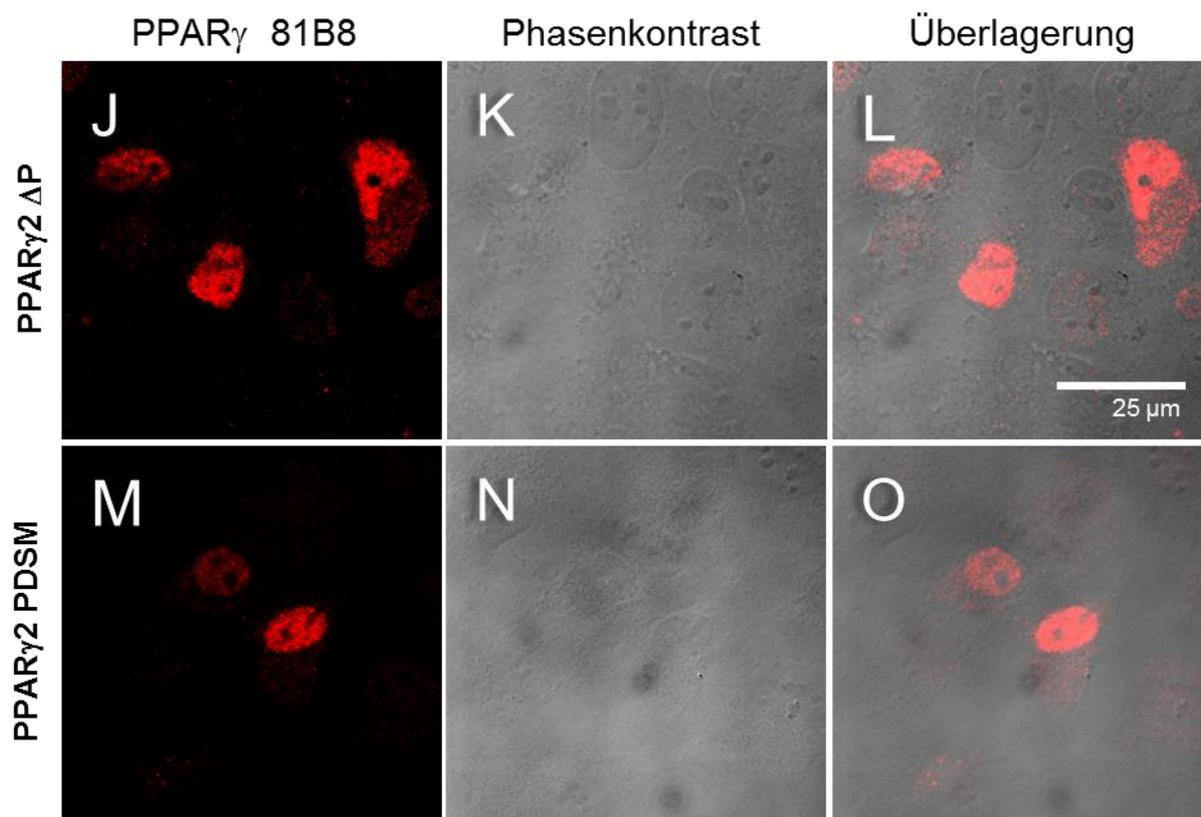


Abbildung 3.6b: Immunfluoreszenzfärbung. Nachweis der PPAR $\gamma$ 2 Mutanten  $\Delta$ P, PDSM nach transienter Transfektion in nicht-differenzierte hMSC-TERT.

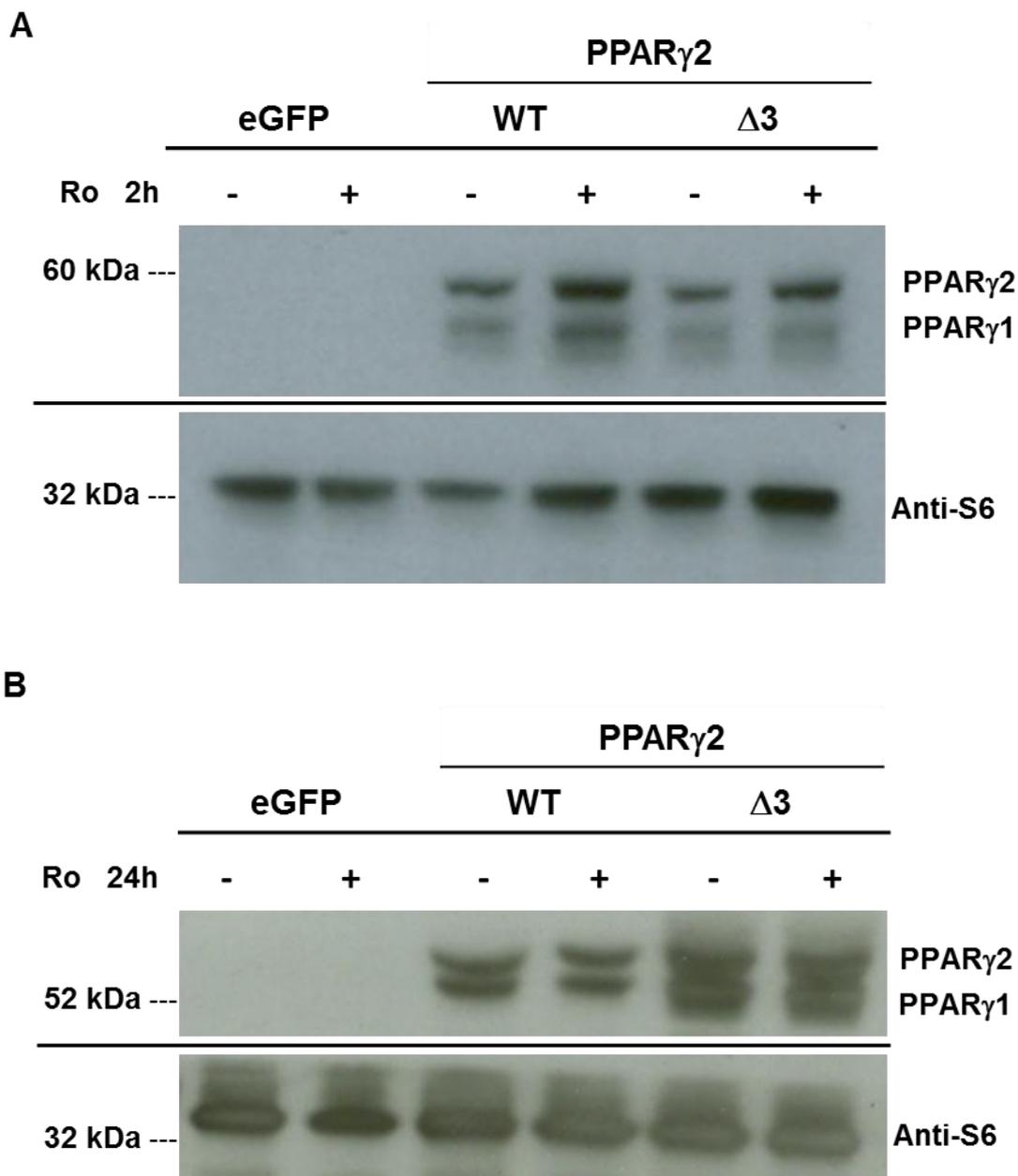
## 3.2 SUMOylierung des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps und der Mutante $\Delta$ 3

Besonderes Interesse gilt der Bedeutung posttranslationaler Modifikationen für die Funktion von PPAR $\gamma$ 2. Für diese Arbeit wurden PPAR $\gamma$ 2 Mutanten erstellt, die Deletionen im Bereich bekannter SUMOylierungsstellen PPAR $\gamma$ 2s sowie für die Phosphorylierungsstelle S112 aufweisen (siehe Abb. 3.1 und Tabelle 4). Im Folgenden sollen mittels Western Blot und Duolink-Immunfluoreszenz-Methode (Olink) die SUMOylierungseigenschaften der PPAR $\gamma$ 2 Mutante  $\Delta$ 3 untersucht und dem PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp gegenübergestellt werden.

### 3.2.1 SUMOylierung von PPAR $\gamma$ im Western Blot

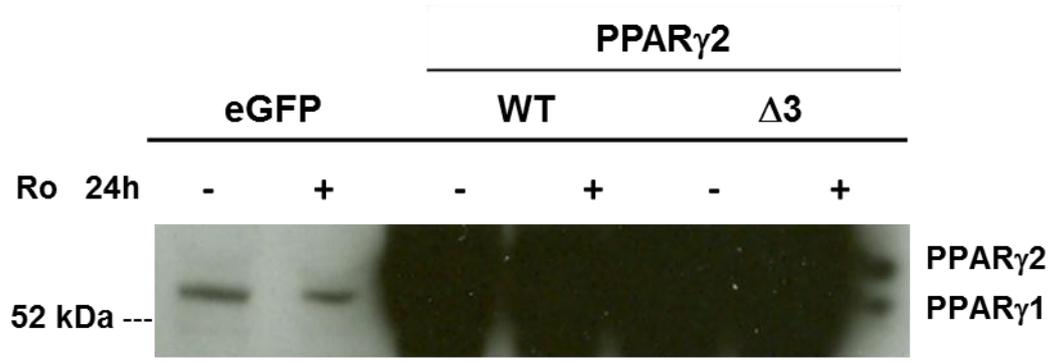
Der SUMO-1 (*small ubiquitin modifier-1*) besitzt laut Literatur ein molekulares Gewicht (mW) von ca. 11 kDa. In den vorangegangenen Western Blots ließ sich PPAR $\gamma$ 2 mithilfe des Antikörpers PPAR $\gamma$  81B8 als Bande bei ca. 60 kDa detektieren (siehe 3.1.4). Für die Darstellung von sumoyliertem PPAR $\gamma$  im Western Blot gingen wir daher bei Interaktion beider Proteine (kovalente Bindung) von einer Bande mit einem molekularen Gewicht von ca. 70 kDa, ebenfalls detektierbar durch PPAR $\gamma$  81B8, aus. Im Rahmen der Versuche wurden HEK 293T und später hMSC-TERT mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp und  $\Delta$ 3 Plasmid DNA transient transfiziert und vor der Ernte mit dem spezifischen hochpotenten PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon (Ro) 2 Stunden (h) bzw. 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde ein Gesamtzelllysate erstellt, welches nach Bestimmung des Proteingehalts durch SDS-Lowry (siehe 2.10) Verwendung als Versuchsprobe fand.

Wie zuvor konnte in transfizierten HEK 293T die Überexpression PPAR $\gamma$ 2s nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Die 2-stündige Stimulation mit Rosiglitazon führte zu geringfügig stärkeren Banden bei ca. 60 kDa. Bei einer 24-stündigen Stimulation ließ sich diese Beobachtung nicht bestätigen. Eine Bande von höherem molekularem Gewicht (sumoyliertes PPAR $\gamma$ 2) stellte sich unter keiner der beiden Bedingungen dar.



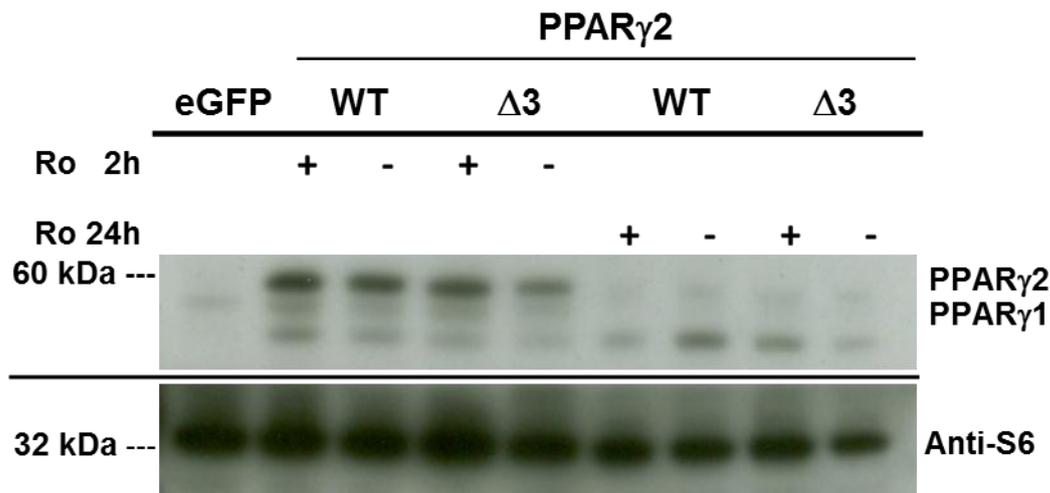
**Abbildung 3.7: Western Blot. HEK 293T Zellen, transfiziert mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp (WT) und der Mutante PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3, stimuliert mit Rosiglitazon für 2 (A) bzw. 24 (B) Stunden.** In HEK 293T wurde PPAR $\gamma$ 2 kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp und Mutante  $\Delta$ 3) transient transfiziert. Die Zellen wurden vor der Ernte 2 bzw. 24 Stunden (h) mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon stimuliert, um eine Aktivierung und in dessen Folge gesteigerte SUMOylierung PPAR $\gamma$ s zu erreichen und nachzuweisen. In Blot A wurde eine Proteinmenge von 30 $\mu$ g/ Probe in Blot B von 20 $\mu$ g/ Probe eingesetzt. Das translatierte Protein PPAR $\gamma$ 2 wurde mit dem spezifischen Antikörper PPAR $\gamma$  81B8 im Western Blot detektiert. PPAR $\gamma$ 2 zeigt sich als Bande bei ca. 60 kDa. SUMOyliertes PPAR $\gamma$  konnte nicht dargestellt werden. S6 diente als Ladekontrolle.

Bei längerer Belichtung des in Abbildung 3.7 dargestellten Blots zeigte sich eine Bande bei ca. 55 kDa in der mit eGFP-transfizierten Kontrolle (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8: PPAR $\gamma$ 1 Bande in der eGFP Kontrolle in HEK 293T.** Diese Abbildung zeigt den Blot aus Abb. 3.7 bei verlängerter Belichtungszeit. Es ist PPAR $\gamma$ 1 als Bande bei ca. 55 kDa in der eGFP Kontrolle sichtbar.

Aufgrund mangelnder Darstellbarkeit sumoylierten PPAR $\gamma$ s in der Zelllinie HEK 293T wurde der Versuch in hMSC-TERT transferiert. hMSC-TERT ist eine immortalisierte präadipozytäre Zelllinie, die bereits basal geringe Mengen endogenen PPAR $\gamma$ s exprimiert (Abb. 3.3). SUMOylierungsvorgänge sollten physiologischer Weise ablaufen und somit darzustellen sein. Der Versuchsaufbau erfolgte analog zu den SUMOylierungsversuchen in HEK 293T. hMSC-TERT wurden mit PPAR $\gamma$ -Wildtyp und PPAR $\gamma$   $\Delta$ 3 Plasmid-DNA transient transfiziert und 2 bzw. 24 Stunden mit Rosiglitazon stimuliert (Abb. 3.9). Nach 2-stündiger Stimulation war PPAR $\gamma$ 2 bei ca. 60 kDa darstellbar. Nach 24-stündiger Inkubation mit Rosiglitazon ist diese Bande nahezu verschwunden. Es zeigen sich jedoch verstärkte Banden bei einem geringeren molekularen Gewicht, was für eine Degradation des Proteins spricht. Eine SUMOylierung PPAR $\gamma$ s war auch unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachzuweisen. Die Kontrolle zeigt vermutlich eine schwache Bande von endogenem PPAR $\gamma$ 1.



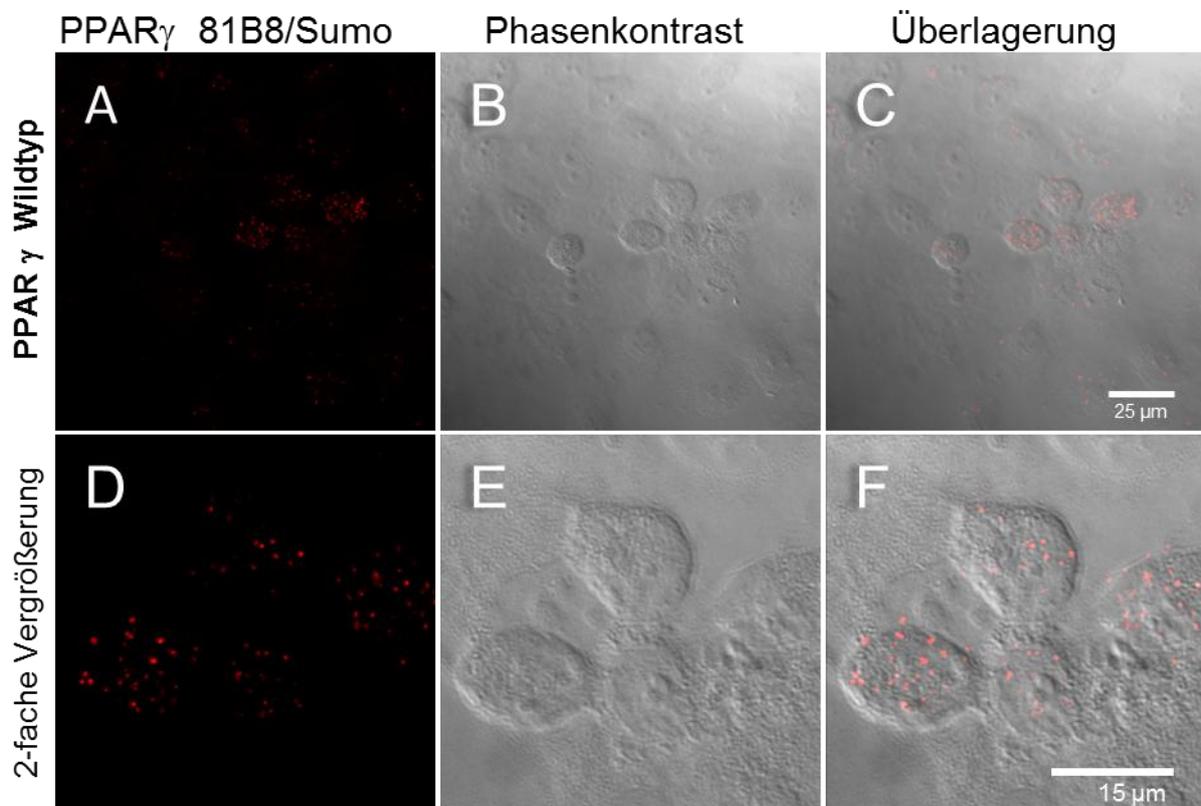
**Abbildung 3.9: Western Blot. Nicht-differenzierte hMSC-TERT, transfiziert mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp (WT) und PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3, stimuliert mit Rosiglitazon für 2 bzw. 24 Stunden (h).** In nicht-differenzierte hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2 kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp und  $\Delta$ 3) transient transfiziert. Die Zellen wurden vor der Ernte 2 Stunden bzw. 24 Stunden mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon stimuliert, um eine gesteigerte SUMOylierung PPAR $\gamma$ s zu erreichen und nachzuweisen. Im Blot wurde eine Proteinmenge von 30 $\mu$ g/ Probe eingesetzt. Das translatierte Protein PPAR $\gamma$ 2 wurde mit dem spezifischen Antikörper PPAR $\gamma$  81B8 im Western Blot detektiert. PPAR $\gamma$ 2 zeigt sich als Bande bei ca. 60 kDa. SUMOyliertes PPAR $\gamma$  konnte nicht dargestellt werden. S6 diente als Ladekontrolle.

### 3.2.2 SUMOylierung von PPAR $\gamma$ in der Duolink-Immunfluoreszenz

Die Duolink Immunfluoreszenz-Methode ermöglicht es mittels sogenannter in situ PLAs (*Proximity Ligation Assays*) die Interaktion zweier Proteine im Rahmen einer Immunfluoreszenz-Färbung sichtbar zu machen (siehe 2.12). Hier soll die kovalente Bindung zwischen SUMO-Proteinen und PPAR $\gamma$ 2 nachgewiesen werden. Im Vorfeld wurden nicht-differenzierte hMSC-TERT mit PPAR $\gamma$  Wildtyp,  $\Delta$ 3 oder eGFP Plasmid-DNA transient transfiziert. Nach Fixierung der Zellen in PFA wurden PPAR $\gamma$  und SUMO-1 mithilfe des PPAR $\gamma$  spezifischen Primärantikörpers PPAR $\gamma$  81B8 und dem Sumo-1-spezifischen Primärantikörper SUMO-1 D-11 detektiert. Im weiteren Verlauf wurde das Duolink-Kit gemäß Angaben des Herstellers verwendet. Schließlich wurden Aufnahmen der Zellen mit dem konfokalen Lasermikroskop erstellt.

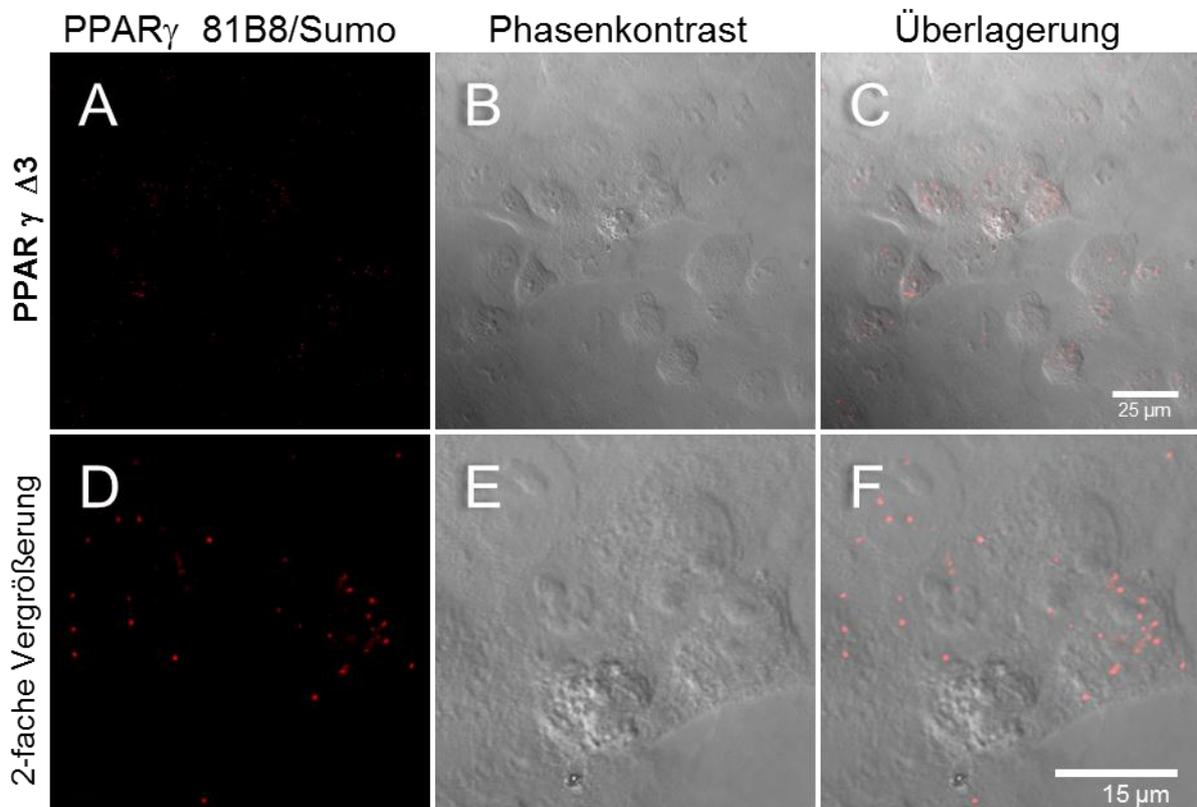
Mittels Duolink Immunfluoreszenz lässt sich die SUMOylierung PPAR $\gamma$ s in mit PPAR $\gamma$  Wildtyp transfizierten Zellen nachweisen. Es waren rote punktförmige Fluoreszenzen in den Zellkernen zu erkennen (Abb. 3.10F). Sie repräsentieren die Interaktion

zwischen dem nukleären Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  und dem Protein SUMO-1 im Sinne einer SUMOylierung.



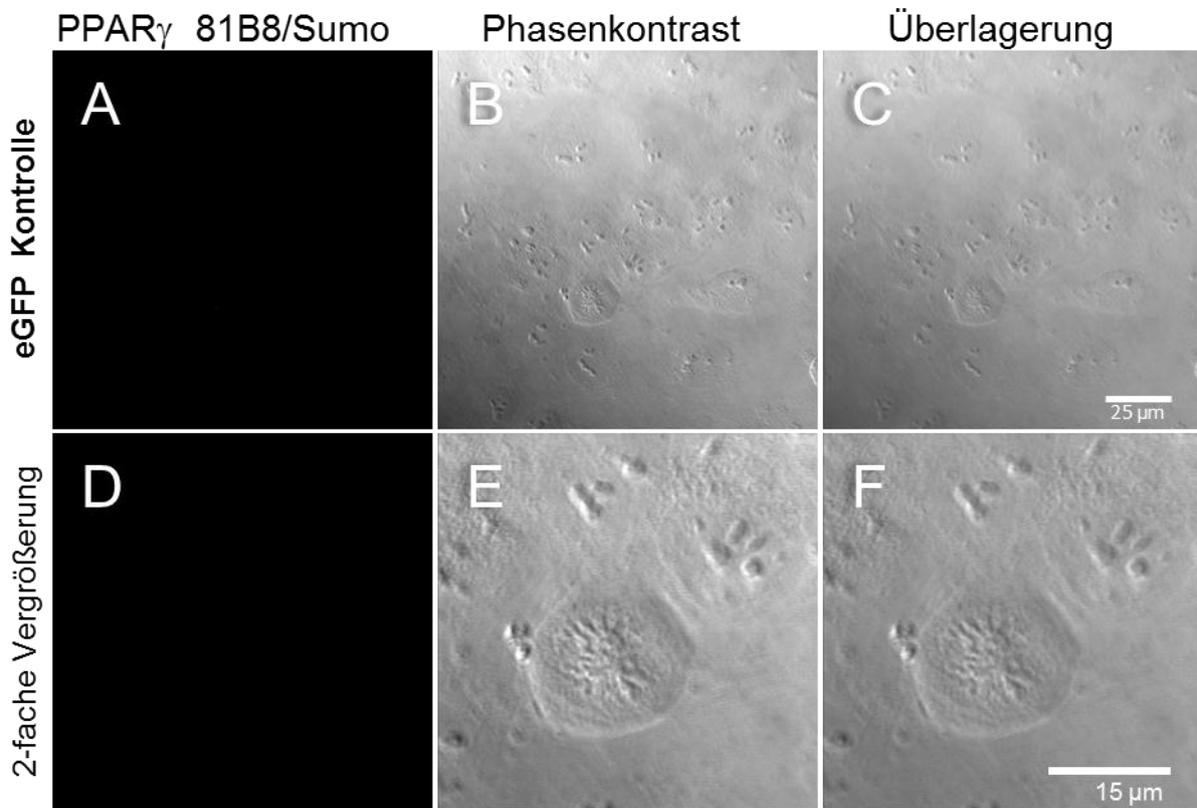
**Abbildung 3.10: Duolink-Immunfluoreszenzfärbung (Olink). Darstellung der SUMOylierung des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$ 2 (Wildtyp) in transient transfizierten nicht-differenzierten hMSC-TERT.** In nicht-differenzierte hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2 kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp) transient transfiziert. Die SUMOylierung des translatierten Proteins wurde mittels Duolink Methode (Olink) unter Verwendung der beiden Primäantikörper PPAR $\gamma$  81B8 und SUMO-1 D-11 detektiert. Aufgrund des verwendeten sekundären Antikörpers (enthalten im Duolink Kit) erscheint sumoyliertes PPAR $\gamma$ 2 im konfokalen Lasermikroskop als kernständige punktförmige rote Fluoreszenz.

In PPAR $\gamma$   $\Delta$ 3 transfizierten hMSC-TERT bildeten sich ebenfalls entsprechende Kolokalisationen ab (3.11F). Es waren jedoch weniger als bei den mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp transfizierten Zellen.



**Abbildung 3.11: Duolink-Immunfluoreszenzfärbung (Olink). Darstellung der SUMOylierung der PPAR $\gamma$ 2 Mutante  $\Delta$ 3 in transient transfizierten nicht-differenzierten hMSC-TERT.** In nicht-differenzierte hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2 kodierende Plasmid-DNA ( $\Delta$ 3) transient transfiziert. Die SUMOylierung des translatierten Proteins wurde mittels Duolink Methode (Olink) unter Verwendung der beiden Primärantikörper PPAR $\gamma$  81B8 und SUMO-1 D-11 detektiert. Aufgrund des verwendeten sekundären Antikörpers (enthalten im Duolink Kit) erscheint sumoyliertes PPAR $\gamma$ 2 im konfokalen Lasermikroskop als kernständige punktförmige rote Fluoreszenz.

In der eGFP Kontrolle ließen sich keine Kolokalisationen in den Zellkernen erkennen (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12: Duolink-Immunfluoreszenzfärbung (Olink) eGFP- transfizierter, nicht-differenzierter hMSC-TERT zur Kontrolle.** In nicht-differenzierte hMSC-TERT wurde eGFP kodierende Plasmid-DNA transient transfiziert. Nach PFA-Fixierung der Zellen wurde mit ihnen nach der Duolink Methode (Olink) unter Verwendung der beiden Primäantikörper PPAR $\gamma$  81B8 und SUMO-1 D-11 verfahren. Es ist kein endogenes sumoyliertes PPAR $\gamma$ 2 detektierbar.

### 3.3 Funktionelle Analysen

PPAR $\gamma$  gilt als essentieller Transkriptionsfaktor der Adipogenese und als möglicher Regulator intrazellulärer entzündlicher Prozesse. Posttranslationale Modifikationen PPAR $\gamma$ s in Form von SUMOylierung und Phosphorylierung nehmen nach neueren Erkenntnissen (Yamashita et al., 2004b; Pascual et al., 2005; Hu et al., 1996) Einfluss auf solche Abläufe. Die für diese Arbeit hergestellte Mutante PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3, welche funktionelle Deletionen an den SUMOylierungsstellen K107 und K395 sowie an der Phosphorylierungsstelle S112 aufweist (siehe 3.1.1), soll im Folgenden auf Effekte dieser Veränderungen bezüglich ihres adipogenetischen und anti-entzündlichen Potenzials im adipozytären Zellmodell (hMSC-TERT) untersucht und mit dem PPAR $\gamma$  Wildtyp sowie einer Kontrolle verglichen werden.

#### 3.3.1 Adipogenetisches Potenzial des PPAR $\gamma$ Wildtyps und $\Delta$ 3

In diesen Experimenten wurde untersucht, ob die forcierte Überexpression des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps und der Mutante  $\Delta$ 3 in nicht-differenzierten hMSC-TERT die Adipogenese induziert, oder ob nach vorausgegangener Differenzierung (48 bzw. 72 Stunden) der Zellen zwischen dem PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp und der Mutante  $\Delta$ 3 sowie im Vergleich mit der Kontrolle voneinander abweichende Differenzierungsfortschritte zu beobachten sind. Darüber hinaus wurden transfizierte hMSC-TERT 7 Tage nach etabliertem Protokoll differenziert und für einen definierten Zeitraum mit PPAR $\gamma$ -Agonisten und/ oder -Antagonisten inkubiert. In diesem Setting sollten funktionelle Effekte PPAR $\gamma$ s im Sinne von veränderter Adipozytokinexpression in nahezu reifen Adipozyten getestet werden.

Zur Quantifizierung des allgemeinen Differenzierungsfortschritts der Zellen wurden mittels TaqMan *real time* PCR repräsentativ die Adipozytenmarker FABP4 und Adiponektin (ADIPOQ) zu einem definierten Zeitpunkt gemessen.

In der Versuchsdurchführung fanden ausschließlich hMSC-TERT, die sich nach einem im Labor etablierten Protokoll innerhalb von 14 Tagen zu reifen Adipozyten ausdifferenzieren lassen, Verwendung.

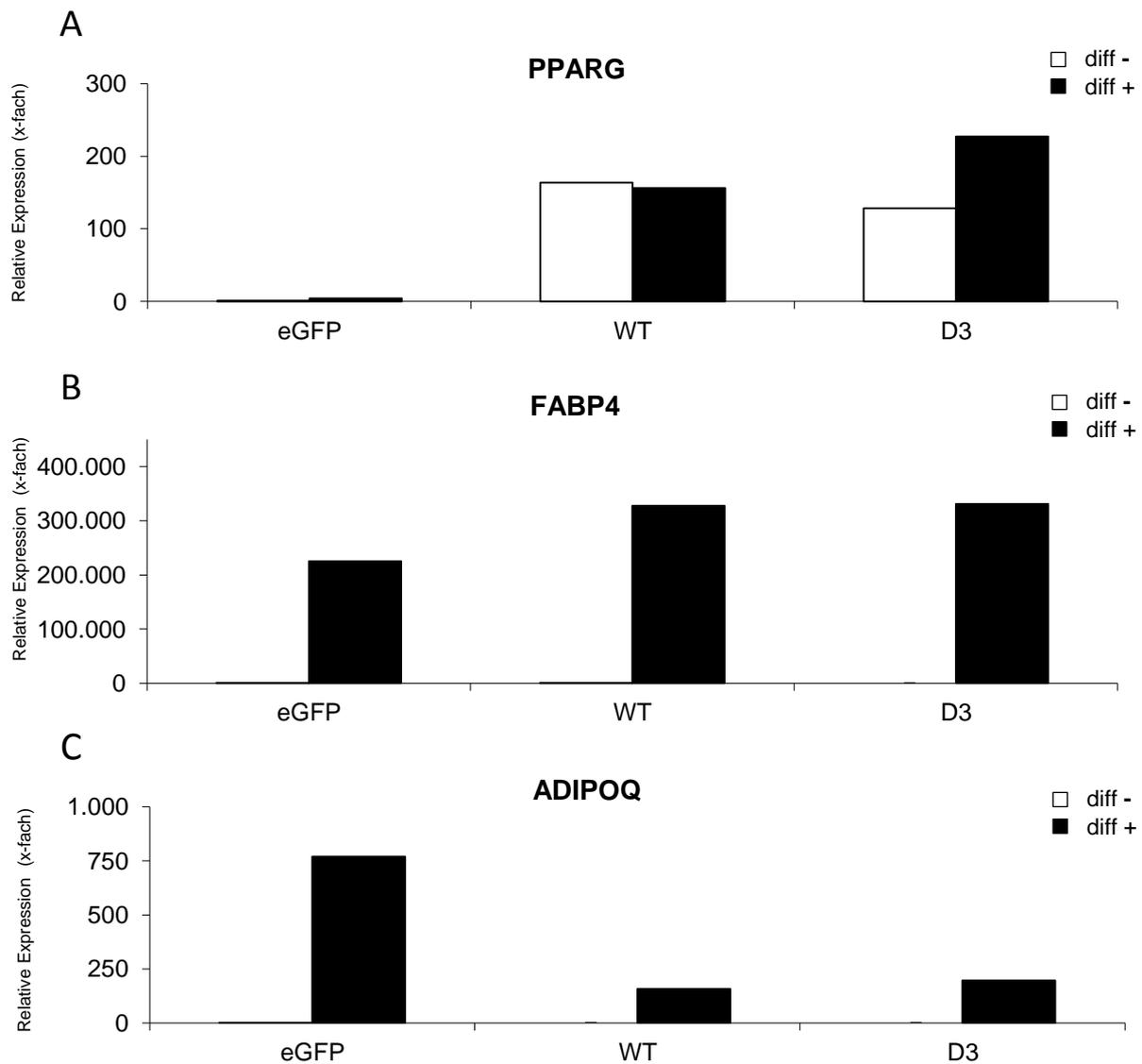
### PPARG-, FABP4- und ADIPOQ-Expression 48 Stunden nach Transfektion

Für die Messung wurden hMSC-TERT mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp oder  $\Delta$ 3 Plasmid DNA transient transfiziert. Ihnen wurde eine eGFP Kontrolle gegenübergestellt. Zwecks Untersuchung einer möglichen spontanen Differenzierung, verursacht durch die forcierte Überexpression des Transkriptionsfaktors, wurden die Zellen in „Kulturmedium“ kultiviert. Zur Messung möglicher Differenzierungsunterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante  $\Delta$ 3 im Zuge begünstigender Differenzierungsbedingungen wurden die hMSC-TERT in Standardmedium mit Differenzierungszusätzen kultiviert. Die Messung erfolgte mittels TaqMan *real time* PCR.

Als Parameter der Differenzierung dienten die Adipozytenmarker FABP4 und ADIPOQ (Adiponektin). FABP4 hat den Vorteil, dass es schon zu einem frühen Zeitpunkt der Adipogenese von mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird. ADIPOQ ist ein Zielgen PPAR $\gamma$ s und gilt als echtes Adipozytokin. Darüber hinaus ist es von medizinischem Interesse, da hohe Adiponektin-Spiegel mit „guter“ Adipozytenfunktion in Zusammenhang stehen und ihnen eine protektive Wirkung in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen zugeschrieben wird.

Die Expressionsanalyse der hMSC-TERT, deren Medium keine Differenzierungszusätze enthielt, zeigte für PPAR $\gamma$ 2 transfizierte Zellen eine Überexpression des Transkriptionsfaktors (Abb. 3.13). Die eGFP-transfizierte Kontrolle wies lediglich eine minimale Konzentration PPAR $\gamma$ s auf. Die Adipozytenmarker FABP4 und ADIPOQ wurden in keiner der Proben in nennenswertem Maße exprimiert. Es gab keine Anzeichen für einen Differenzierungsbeginn der Zellen.

Bei Betrachtung der Proben, deren Medium Differenzierungszusätze enthielt, zeigte sich nach 48 Stunden Inkubation in allen Proben ein deutlicher Anstieg FABP4s und ADIPOQs (Abb. 3.13). Die eGFP Kontrolle wies einen diskreten Anstieg der PPARG-Expression auf. Bei dem Vergleich der FABP4- und ADIPOQ-Werte innerhalb der Proben ließen sich jedoch keine Differenzierungsvorteile für die PPAR $\gamma$ 2-transfizierten Zellen erkennen. Grundsätzliche Differenzierungsunterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante  $\Delta$ 3 bestanden ebenfalls nicht.



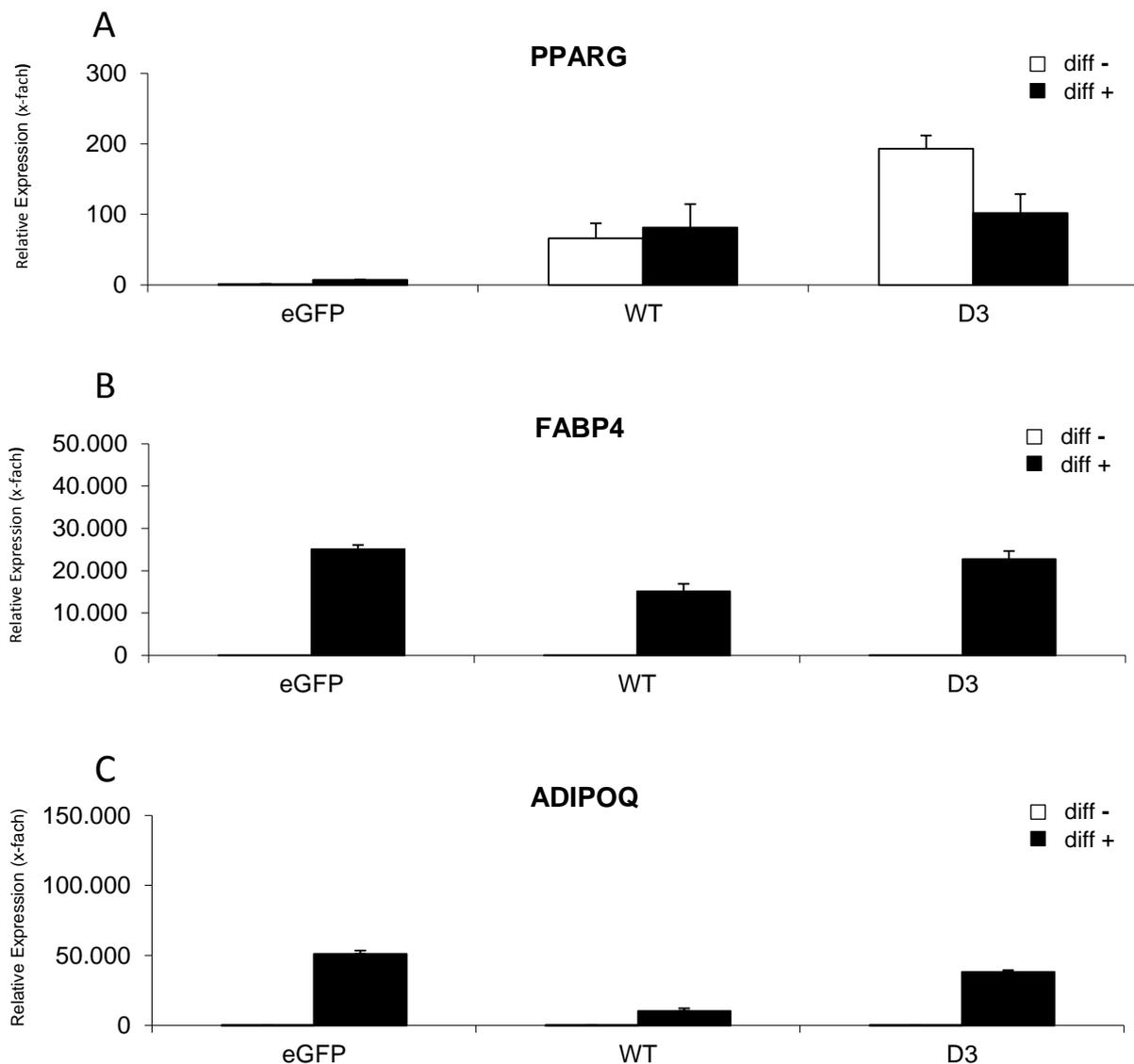
**Abbildung 3.13: Expression der Adipozytenmarker Adiponektin (ADIPOQ) und FABP4 in PPAR $\gamma$ 2-transfizierten hMSC-TERT-Zellen nach 48-stündiger Differenzierung.** In nicht-differenzierten hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp und Mutante  $\Delta$ 3) transient transfiziert. Ein Teil der Zellen wurden anschließend 48 Stunden differenziert. Die mit der TaqMan *real time* PCR-Methode ermittelten Kopienzahlen von PPARG (A), FABP4 (B) und ADIPOQ (C) wurden auf das *Housekeeping*-Gen hTBP normiert und als relative Expression, bezogen auf die jeweilige eGFP Kontrolle in undifferenziertem Zustand, dargestellt. Ohne Differenzierungszusätze wurden die Gene FABP4 und ADIPOQ nicht induziert. Eine Überexpression PPAR $\gamma$ s führte zu keiner gesteigerten Induktion von FABP4 und ADIPOQ gegenüber der Kontrolle. Die Daten zeigen den Mittelwert eines repräsentativen Experiments (n=2, in Vierfachwerten gemessen). WT= Wildtyp, D3=  $\Delta$ 3

PPARG-, FABP4- und ADIPOQ-Expression 72 Stunden nach Transfektion

Um einen Zeitpunkt für die Messung der Parameter FABP4 und ADIPOQ zu finden, an dem etwaige Unterschiede bezüglich des adipogenetischen Fortschritts, hervorgerufen durch die forcierte Überexpression PPAR $\gamma$ 2, nachweisbar werden, wurde das Differenzierungsintervall auf 72 Stunden verlängert. Ferner blieben die Bedingungen in Analogie zum vorangegangenen Versuch bestehen.

Die Expressionsanalyse (Abb. 3.14) zeichnete für die Proben, bei denen keine Differenzierungszusätze eingesetzt wurden, folgendes Bild: PPAR $\gamma$ 2-transfizierte Zellen wiesen eine Überexpression des Transkriptionsfaktors auf. In der Kontrolle war dessen Konzentration vernachlässigbar gering. FABP4 und ADIPOQ war in keiner der Proben in nennenswerten Mengen detektierbar. Demzufolge führte die forcierte Überexpression PPAR $\gamma$ s nicht zur Induktion der Adipogenese.

Die Verwendung von Differenzierungszusätzen im Kulturmedium führte zu einem Anstieg der FABP4 -und ADIPOQ-Werte in allen Proben. Die eGFP Kontrolle verzeichnete einen leichten Anstieg von gemessener PPAR $\gamma$  mRNA, passend zu einer beginnenden Adipogenese. Ein Differenzierungsvorteil von PPAR $\gamma$ 2-transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle bestand nach 72 Stunden Differenzierungszeit nicht. Es gab keinen grundsätzlichen Unterschied bezüglich des Differenzierungsfortschritts zwischen dem Wildtyp und der Mutante  $\Delta$ 3.



**Abbildung 3.14: Expression der Adipozytenmarker Adiponektin (ADIPOQ) und FABP4 in PPAR $\gamma$ 2-transfizierten hMSC-TERT nach 72-stündiger Differenzierung.**

In nicht-differenzierten hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp und Mutante  $\Delta$ 3) transient transfiziert. Ein der Teil Zellen wurden anschließend 72 Stunden differenziert. Die mit der TaqMan real time PCR-Methode ermittelten Kopienzahlen von PPARG (A), FABP4 (B) und ADIPOQ (C) wurden auf das *Housekeeping*-Gen hTBP normiert und als relative Expression, bezogen auf die jeweilige eGFP Kontrolle in undifferenziertem Zustand, dargestellt. Ohne Differenzierungszusätze werden die Gene FABP4 und ADIPOQ nicht induziert. Eine Überexpression PPAR $\gamma$ s führt zu keiner gesteigerten Induktion von FABP4 und ADIPOQ gegenüber der Kontrolle. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten (mit je n=2, in Vierfachwerten gemessen). WT= Wildtyp, D3=  $\Delta$ 3

PPARG-, FABP4- und ADIPOQ-Expression nach TZD-Stimulation

Hierfür wurden transient transfizierte hMSC-TERT (PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp,  $\Delta$ 3 oder eGFP) 7 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert und anschließend für 20 Stunden mit Rosiglitazon und/ oder GW9662 stimuliert (siehe 2.5.3). Rosiglitazon ist ein exogener, hochpotenter und bemerkenswerterweise spezifischer PPAR $\gamma$  Agonist. Der Einsatz von Rosiglitazon ermöglicht es, die Effekte PPAR $\gamma$  zu verstärken und zugleich einen möglichen spezifischen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor und der Expression der Adipozytenmarker FABP4 und ADIPOQ darzustellen. GW9662 ist ein PPAR $\gamma$  Antagonist und dient der Kontrolle.

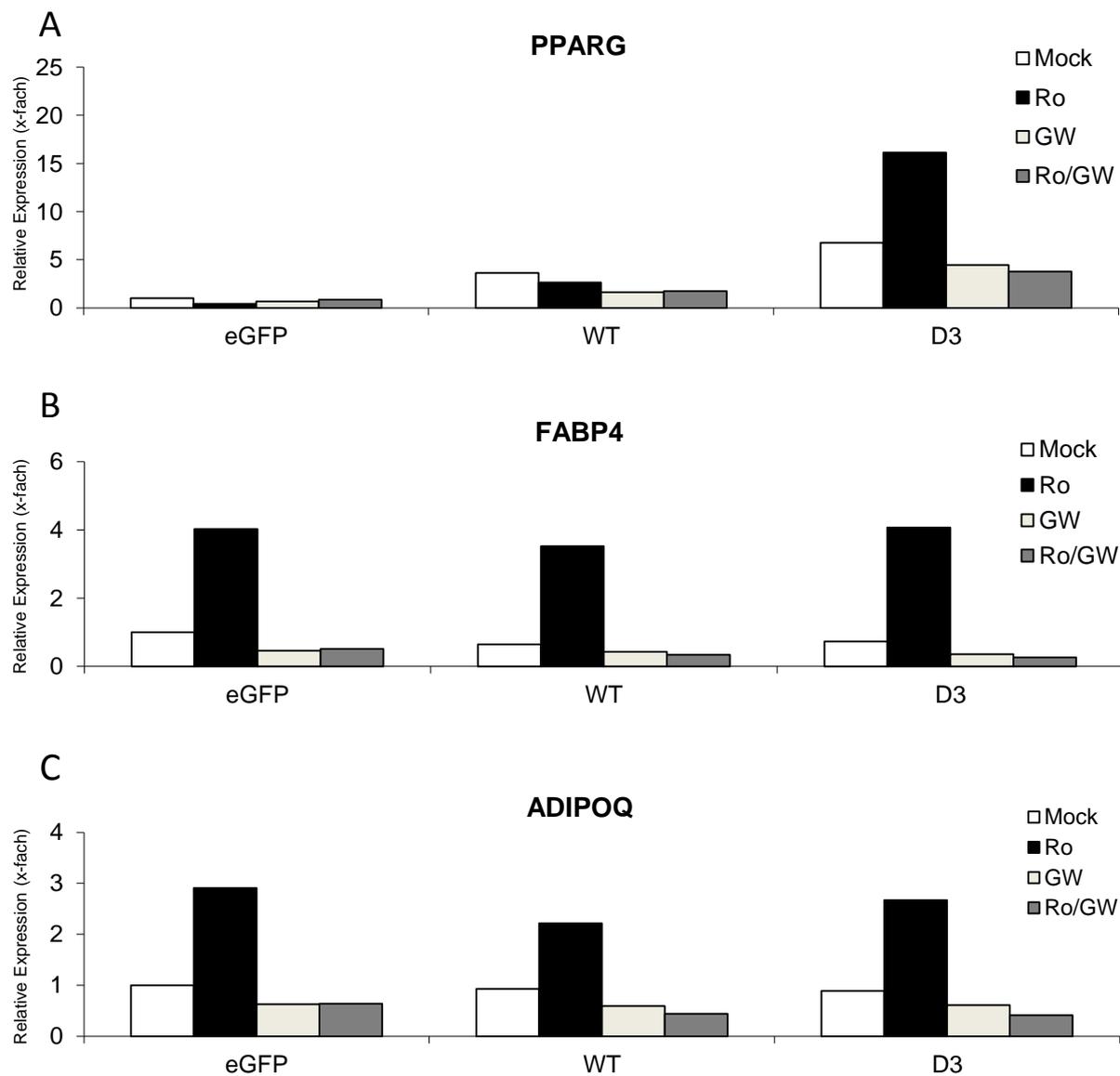
Die quantitative *real time* PCR Analyse der Expressionsprofile von PPAR $\gamma$ , FABP4 und Adiponektin (ADIPOQ) erbrachte nach 8-tägiger Behandlung folgende Ergebnisse (Abb. 3.15):

PPAR $\gamma$  wurde in der Kontrolle bereits basal exprimiert. Die Stimulation durch Rosiglitazon führte zu keiner gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors. In den transient transfizierten Zellen wurde PPAR $\gamma$  überexprimiert. Die Stimulation mit Rosiglitazon schien den Transkriptionsfaktor in  $\Delta$ 3-transfizierten Zellen stark zu induzieren. Die Gabe von GW9662 oder der Kombination von Rosiglitazon/ GW9662 verminderte dessen Expression.

FABP4 wurde nach Differenzierung in allen Proben basal exprimiert und wurde durch Rosiglitazonapplikation stark induziert. Dabei bestand kaum ein Unterschied zwischen den einzelnen Proben. Der Gabe von GW9662 bzw. von Rosiglitazon/ GW9662 folgte eine Verminderung der FABP4 Expression unterhalb des Wertes der Kontrolle.

Alle „Mock“-Proben wiesen eine untereinander vergleichbare basale Adiponektin-Expression (ADIPOQ) auf. Exogenes PPAR $\gamma$ 2 hatte für dessen basale Expression scheinbar keine Relevanz. Die Stimulation der Zellen mit Rosiglitazon führte zu einer stark erhöhten Adiponektin-Expression. Trotz der hohen PPAR $\gamma$ -Kopienzahl in transfizierten Zellen, befand sich die Expression des Adiponektins jedoch in allen Proben auf einem ähnlichen Niveau.

Es waren keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante  $\Delta$ 3 zu erkennen.



**Abbildung 3.15: Expression der Adipozytenmarker Adiponektin (ADIPOQ) und FABP4 in PPAR $\gamma$ -transfizierten hMSC-TERT-Adipozyten unter Stimulation mit Rosiglitazon bzw. GW9662.** In nicht-differenzierten hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp und Mutante  $\Delta$ 3) transient transfiziert. Die Zellen wurden anschließend 7 Tage differenziert. Die so entstandenen hMSC-TERT-“Adipozyten“ wurden vor ihrer Ernte 20 Stunden mit 2 ng/mL Rosiglitazon, 1  $\mu$ g/mL GW9662 bzw. Rosiglitazon/GW9662 stimuliert. Die mit der TaqMan *real time* PCR-Methode ermittelten Kopienzahlen von PPARG (A), FABP4 (B) und ADIPOQ (C) wurden auf das *Housekeeping*-Gen hTBP normiert und als relative Expression, bezogen auf die jeweilige eGFP Kontrolle im nicht-stimulierten Zustand, dargestellt. Die Überexpression PPAR $\gamma$ s führt zu keinem Differenzierungsvorteil gegenüber der Kontrolle. Die Daten zeigen den Mittelwert eines repräsentativen Experiments (n=2, in Vierfachwerten gemessen). WT= Wildtyp, D3=  $\Delta$ 3

### 3.3.2 Anti-entzündliches Potenzial des PPAR $\gamma$ Wildtyps und $\Delta 3$

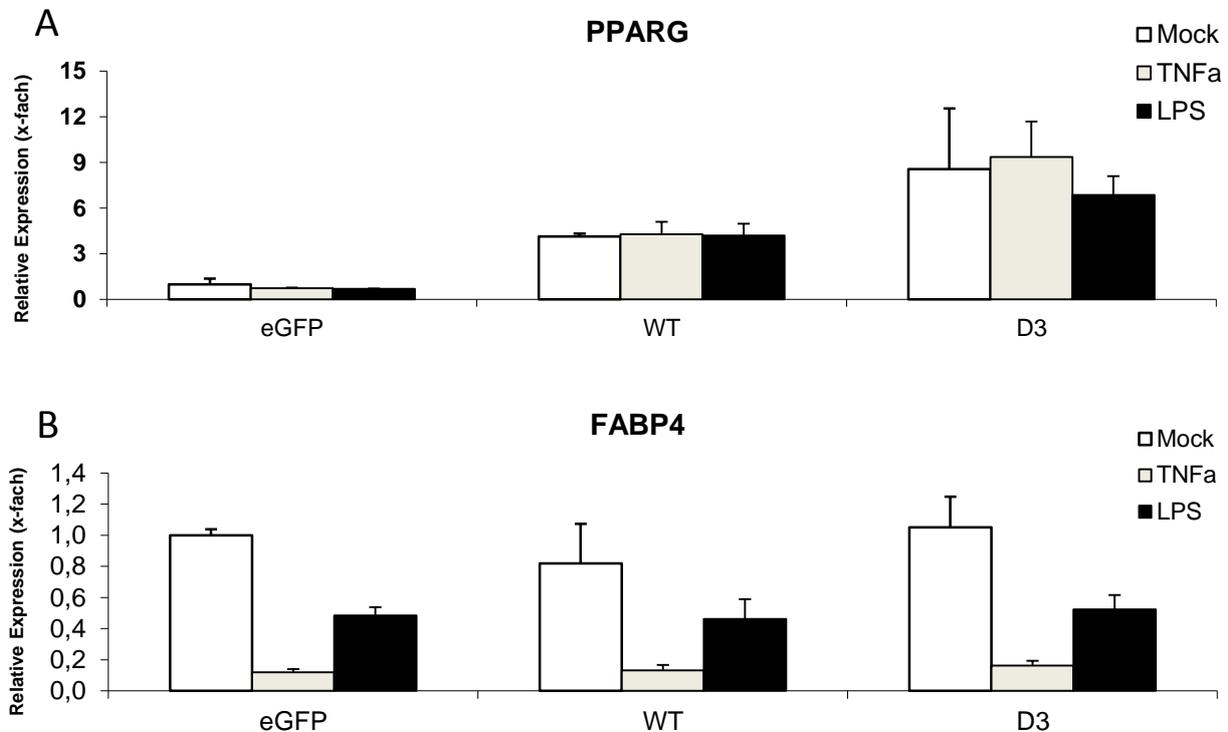
Adipozyten sind zentrale Figuren des Energiemetabolismus. Sie speichern Energie und greifen in ihrer Gesamtheit als endokrines Organ mittels Sezernierung von Zytokinen in den Stoffwechsel des Organismus maßgeblich ein. Auf Zustände metabolischer Dysregulation reagieren sie empfindlich mit der Initiation intrazellulärer entzündlicher Prozesse, welche mit eingeschränkter Adipozytenfunktion assoziiert sind und langfristig zur Insulinresistenz führen können. PPAR $\gamma$  scheint in der Lage zu sein, derartigen Prozessen entgegenzuwirken und somit protektiven Nutzen zu haben. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Rolle posttranslationaler Modifizierungen des Transkriptionsfaktors.

In diesem Teil der Arbeit wurde die Expression zweier pro-entzündlicher Gene, IL-6 und MCP-1, in 7 Tage differenzierten hMSC-TERT in Abhängigkeit vom Vorhandensein exogenen PPAR $\gamma$ s (Wildtyp und Mutante  $\Delta 3$ ) untersucht. Zur Simulation einer Entzündungssituation wurden die Zellen mit dem allgemeinen Stresszytokin TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) und LPS (Lipopolysaccherid), einer Entzündungsauslösenden Substanz bakteriellen Ursprungs und Surrogatstimulus für TLR4-Rezeptoren (Medzhitov and Horng, 2009a), für einen Zeitraum von 20 Stunden stimuliert. TLR4-Rezeptoren gehören zur TLR-Rezeptorfamilie, denen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem zukommt. Sie werden von Adipozyten exprimiert und können direkt durch freie Fettsäuren aktiviert werden (Hotamisligil, 2006). Dies führt zu einer Induktion des NF- $\kappa$ B Weges (Medzhitov and Horng, 2009b). Der Adipozytenmarker FABP4 wurde als Parameter für die adipozytäre Funktion der Versuchszellen parallel gemessen.

Die Analyse der Expressionsprofile mittels quantitativer *real time* PCR erbrachte folgende Ergebnisse: Endogenes PPAR $\gamma$  wurde in der Kontrollzelllinie auf niedrigem Niveau basal exprimiert. Die transient transfizierten Zellen wiesen nach 8 Tagen Behandlung nach wie vor eine Überexpression PPAR $\gamma$ s auf, wobei die Mutante  $\Delta 3$  gegenüber dem Wildtyp in etwa doppelt so stark exprimiert wurde. In allen drei Zelllinien führte weder die Stimulation mit TNF- $\alpha$  noch mit LPS zu nennenswerten Veränderungen im PPAR $\gamma$  Expressionsmuster (Abb. 3.16a).

Hinsichtlich der FABP4 Expression wiesen alle drei nicht-stimulierten Proben vergleichbare Werte auf. Die Stimulation der Zellen mit o.g. pro-entzündlichen

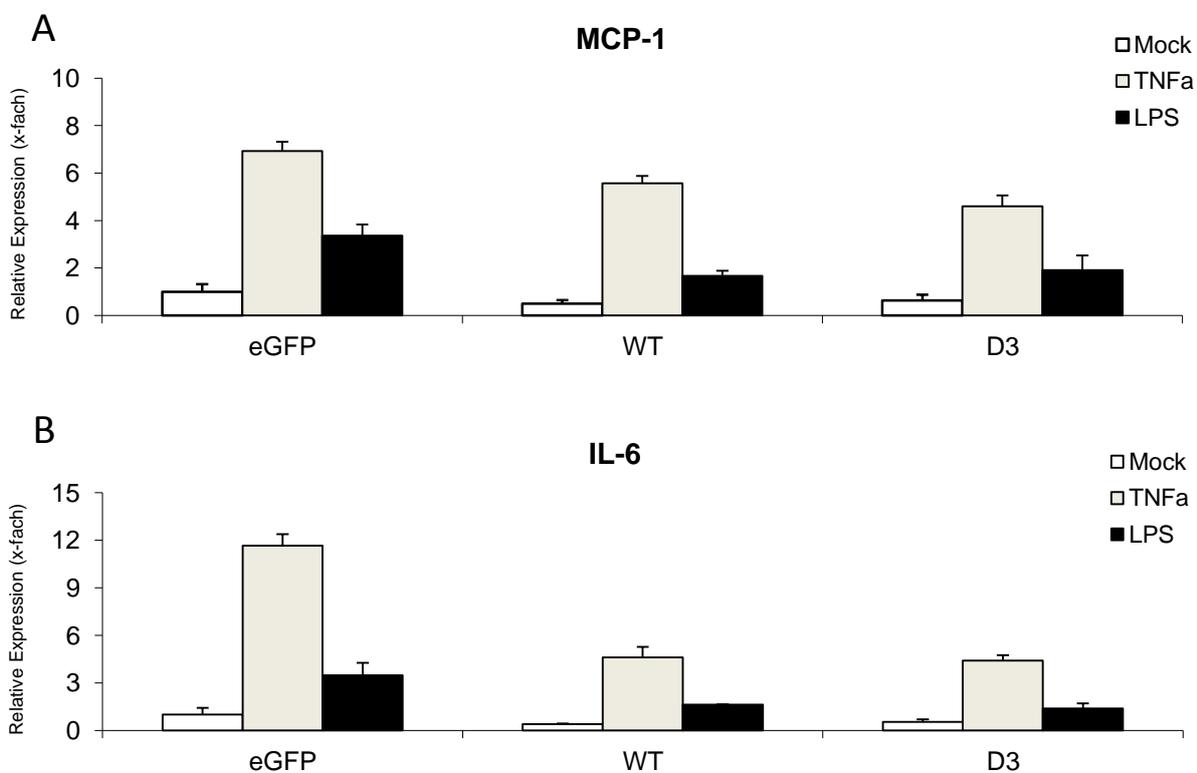
Zytokinen führte zu einer starken Reduktion der FABP4-Expression. TNF- $\alpha$  rief diesen Effekt ca. 2-mal stärker als LPS hervor (Abb. 3.16a).



**Abbildung 3.16a: Expression von PPAR $\gamma$  und FABP4 in PPAR $\gamma$ -transfizierten hMSC-TERT-Adipozyten nach Stimulation mit LPS bzw. TNF- $\alpha$ .** In nicht-differenzierten hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp und Mutante  $\Delta$ 3) transient transfiziert. Die Zellen wurden anschließend 7 Tage differenziert. Zuletzt wurden sie 20 Stunden mit 2 ng/mL TNF- $\alpha$  bzw. 1  $\mu$ g/mL LPS stimuliert. Die mit der TaqMan *real time* PCR-Methode ermittelten Kopienzahlen von PPAR $\gamma$  (A) und FABP4 (B) wurden auf das *Housekeeping*-Gen hTBP normiert und als relative Expression, bezogen auf die jeweilige eGFP Kontrolle im nicht-stimulierten Zustand, dargestellt. Die TNF- $\alpha$  bzw. LPS Exposition wirkt kompromittierend auf die FABP4 Expression. PPAR $\gamma$  zeigt diesbezüglich keinen protektiven Effekt. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten (mit je n=2, in Vierfachwerten gemessen). WT= Wildtyp, D3=  $\Delta$ 3

MCP-1 (CCL2) wurde in allen Zelllinien bereits in nicht-stimuliertem Zustand geringfügig exprimiert. Das Vorhandensein exogenen PPAR $\gamma$ s reduzierte die basale Expression des pro-entzündlichen Zytokins gegenüber dem Wert der Kontrolle um ca. 50 %. Durch die Stimulation der Zellen stieg die Expression von MCP-1 an. Die Präsenz größerer Mengen exogenen PPAR $\gamma$ s konnte diesen Anstieg abschwächen. Hierbei schien die Mutante  $\Delta$ 3 dem PPAR $\gamma$  Wildtyp überlegen (Abb. 3.16b).

Die Analyse der Expressionsprofile für das Zytokin IL-6 in stimulierten und nicht-stimulierten Zellen bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse. Alle nicht-stimulierten Proben wiesen bereits eine niedrige basale Expression von IL-6 auf. PPAR $\gamma$ 2 transfizierte Zellen wiesen dabei in etwa halb so hohe Messwerte wie die Kontrolle auf. V.a. durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  stieg die Expression des Zytokins stark an. Die Anwesenheit von exogenem PPAR $\gamma$  zeigte auch in dieser Situation in der Tendenz einen mindernden Effekt (Abb. 3.16b).



**Abbildung 3.16b: Expression von MCP-1 und IL-6 in PPAR $\gamma$ -transfizierten hMSC-TERT-„Adipozyten“ nach Stimulation mit LPS bzw. TNF- $\alpha$ .** In nicht-differenzierten hMSC-TERT wurde PPAR $\gamma$ 2-kodierende Plasmid-DNA (Wildtyp und Mutante  $\Delta$ 3) transient transfiziert. Die Zellen wurden anschließend 7 Tage differenziert. Zuletzt wurden sie 20 Stunden mit 2 ng/mL TNF- $\alpha$  bzw. 1  $\mu$ g/mL LPS stimuliert. Die mit der TaqMan *real time* PCR-Methode ermittelten Kopienzahlen von MCP-1 (A) und IL-6 (B) wurden auf das *Housekeeping*-Gen hTBP normiert und als relative Expression, bezogen auf die jeweilige eGFP Kontrolle im nicht-stimulierten Zustand, dargestellt. Die Überexpression PPAR $\gamma$ s bewirkt eine Reduktion der MCP-1 und IL-6 Genexpression. Die Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD von zwei repräsentativen Experimenten (mit je n=2, in Vierfachwerten gemessen). WT= Wildtyp, D3=  $\Delta$ 3

## 4 Diskussion

Das Fettgewebe spielt für die Homöostase des Organismus eine entscheidende Rolle. Indem es Energie in Form von Triglyzeriden speichert und diese dem Körper bei Bedarf als freie Fettsäuren bereitstellt sowie bioaktive Peptide para- und endokrin sekretiert, nimmt es aktiv an der Regulation des Metabolismus teil. Adipozyten stehen im Zentrum dieser Vorgänge. Sie reagieren empfindlich auf Veränderungen des Energiehaushalts mit der Anpassung ihrer Genexpression. Der nukleäre Rezeptor PPAR $\gamma$ 2 dient dem Adipozyten als wichtiger metabolischer Sensor und integriert in seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor die adipozytäre Genexpression mit der vorherrschenden Stoffwechselsituation. PPAR $\gamma$  ist der Schlüsselfaktor der Adipozytendifferenzierung und für die Entstehung von Adipozyten essentiell (Tontonoz et al., 1994). Seiner Kontrolle untersteht eine Vielzahl für die Adipozytenfunktion wichtiger Gene (Hummasti und Tontonoz, 2006). Darüber hinaus scheint er inhibitorisch in intrazelluläre Entzündungsprozesse, wie sie bei Zuständen metabolischer Dysregulation in Adipozyten anzutreffen sind, einzugreifen (Ricote et al., 1998; Pascual et al., 2005; Ricote und Glass, 2007). In jüngerer Vergangenheit hat sich gezeigt, dass posttranslationale Modifikationen PPAR $\gamma$ s wie SUMO- und Phosphorylierungen erheblichen Einfluss auf die PPAR $\gamma$ -Funktion haben (Hu et al., 1996; Yamashita et al., 2004a; Pascual et al., 2005; Choi et al., 2010).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung posttranslationaler Modifikationen für die Funktion PPAR $\gamma$ s hinsichtlich seines adipogenetischen Potenzials und der Fähigkeit der Immunmodulation im humanen adipozytären Modell zu untersuchen. Ausgangspunkt der Arbeit war eine für PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp kodierende Plasmid-DNA. Mittels *site-directed mutagenesis* waren aus ihr Mutanten mit funktionellen Deletionen im Bereich von zwei bekannten SUMOylierungs- bzw. einer Phosphorylierungsstelle in verschiedener Kombination erstellt worden.

Der erste Teil der Arbeit bestand in der Charakterisierung der verschiedenen PPAR $\gamma$ 2 Plasmide bezüglich ihrer Originalität, Mutationsloci und

Expressionsfähigkeit. Im zweiten Teil wurde das SUMOylierungspotenzial der Mutante  $\Delta 3$  untersucht und dem des Wildtyps gegenübergestellt.

Im dritten Teil wurde die Funktionalität der PPAR $\gamma$  Konstrukte getestet. Hierbei wurde zunächst das adipogenetische Potenzial des Wildtyps analysiert und mit der SUMOylierungs- und phosphorylierungsdefizienten Mutante  $\Delta 3$  verglichen. Abschließend wurde das immunmodulatorische Potenzial beider Protein-Varianten untersucht.

## 4.1 Charakterisierung

Für diese Arbeit standen PPAR $\gamma 2$  Wildtyp Plasmid-DNA und daraus erstellte Mutanten zur Verfügung. Bevor das Material für Funktionsanalysen im adipozytären Zellmodell zum Einsatz kam, wurde es auf Originalität, Mutationen und Expressivität untersucht.

### 4.1.1 DNA-Sequenzierung

Die für humane PPAR $\gamma 2$  Wildtyp kodierende Plasmid-DNA sowie die daraus erstellten mutierten Plasmid-DNAs (S1, S2, S1/2,  $\Delta P$ , PDSM und  $\Delta 3$ ) wurden eingangs sequenziert. Die ausgelesene Aminosäuresequenz der PPAR $\gamma 2$  Wildtyp Plasmid DNA (siehe Abbildung 3.1) des *Alignment Reports* deckte sich mit der Abfolge der entsprechenden Abschnitte des humanen PPAR $\gamma 2$  Gens (PPARG) (Mukherjee et al., 1997; Fajas et al., 1997). Die unter 3.1.1 beschriebenen Mutanten zeichneten sich, wie erwünscht, durch einzelne bzw. einer Kombination gezielter Punktmutationen in bekannten *SUMO-acceptor sites* (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Ohshima et al., 2004; Yamashita et al., 2004b; Pascual et al., 2005) und einer bekannten Phosphorylierungstelle PPAR $\gamma$ s (Hu et al., 1996) aus.

### 4.1.2 DNA-Restriktion

Die PPAR $\gamma 2$ -tragenden Plasmid-DNAs wurden in XL-GOLD bzw. -BLUE Zellen transformiert und vervielfältigt. Die Originalität der durch Plasmid-DNA-Präparation gewonnenen PPAR $\gamma$ -Plasmide konnte mittels Plasmidrestriktion und anschließender Gelelektrophorese (Abb. 3.2) bestätigt werden.

#### 4.1.3 Expression auf mRNA-Ebene

Es wurde ein mRNA-Expressionsprofil für den PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp sowie für die übrigen Mutanten nach transienter Transfektion in hMSC-TERT mittels quantitativer PCR erstellt.

Die Expressionsanalyse zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Überexpression des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps und der übrigen PPAR $\gamma$  Mutanten gegenüber den mit eGFP-transfizierten Kontrollzellen. Dabei wurden absolute Kopienzahlen von ca. 600.000 bis 1 Mio Kopien gemessen, was einer ca. 40- bis 75-fachen Expression bezogen auf die Kontrolle (14.638 Kopien) entspricht.

#### 4.1.4 Expression auf Proteinebene

Die Expression der PPAR $\gamma$ 2 Plasmide auf Proteinebene wurde mittels Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz untersucht.

Für den Nachweis der Expression des PPAR $\gamma$ 2-Proteins im Western Blot wurden die Plasmide sowohl in HEK 293T als auch hMSC-TERT transient transfiziert. In beiden Zellmodellen konnte eine starke Expression von exogenem PPAR $\gamma$ 2 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.4). Interessanterweise zeigte sich darüber hinaus sowohl in transfizierten HEK 293T als auch in hMSC-TERT eine zusätzliche schwache Bande bei ca. 50 kDA. Es ist davon auszugehen, dass es sich dabei in beiden Zelllinien um endogenes PPAR $\gamma$ 1 handelt, dessen Expression durch die Anwesenheit exogenen PPAR $\gamma$ 2s verstärkt induziert wurde. Prinzipiell können SREBP1c, C/EBP $\beta$  und C/EBP $\alpha$  die Expression von PPAR $\gamma$  induzieren (Fajas et al., 1999; Wu et al., 1996; Rosen et al., 2002). PPAR $\gamma$ 2 und C/EBP $\alpha$  verbindet jedoch ein positiver Feedbackzyklus (Rosen et al., 2002), der möglicherweise durch die forcierte Expression exogenen PPAR $\gamma$ 2s in Gang gesetzt wurde und im Verlauf die Isoform PPAR $\gamma$ 1 mit-induziert hat. Die Induktion endogenen PPAR $\gamma$ 2s ist vermutlich durch die exogene Fraktion maskiert. Darüber hinaus ist anzumerken, dass sogar in der eGFP Kontrolle der HEK 293T eine diskrete PPAR $\gamma$ 1 zuzuordnende Bande sichtbar war (siehe Abbildung 3.8). Dies spricht für das zwar geringgradige, jedoch prinzipielle Vorhandensein von endogenem PPAR $\gamma$  in dieser Zelllinie (Fajas et al., 1997).

Die Analyse der Protein-Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz in hMSC-TERT zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Akkumulation PPAR $\gamma$ s in den transfizierten Zellen. Das Signal war unabhängig von der transfizierten PPAR $\gamma$  Mutante ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Eine Aussage darüber zu treffen, ob die funktionelle Ablation der SUMOylierungsstellen auf die subnukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors Einfluss nimmt, ist aufgrund des anzunehmend geringen Anteils sumoylierten PPAR $\gamma$ s nicht möglich. Die eGFP Kontrolle zeigte ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal, was vereinbar mit der niedrigen basalen PPAR $\gamma$  Expression in der quantitativen PCR und den Erkenntnissen aus o.g. Western Blots ist.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die verwendete PPAR $\gamma$ 2 Plasmid DNA der originalen hPPAR $\gamma$ 2 DNA Sequenz entspricht. Aus ihr wurden Mutanten, die Punktmutationen an gewünschter Stelle aufweisen, erfolgreich erstellt. Durch transiente Transfektion dieser PPAR $\gamma$ 2 Plasmide wurde eine Überexpression PPAR $\gamma$ 2s bzw. seiner Mutanten erreicht. Dies konnte auf mRNA-Ebene mittels TaqMan *real time* PCR gezeigt werden. Im Western Blot und der indirekten Immunfluoreszenz ließ sich das translatierte Produkt nachweisen. Parallel durchgeführte Kontrollen belegen, dass in nicht-transfizierten Zellen lediglich geringe Mengen PPAR $\gamma$ s vorhanden sind. Dies zusammen zeigte, dass sich die verwendeten Plasmide und Zelllinien zur Untersuchung des SUMOylierungspotenzials und der funktionellen Eigenschaften des Transkriptionsfaktors bezüglich des adipogenetischen Potenzials und der Immunmodulation eignen.

## 4.2 SUMOylierungseigenschaften von PPAR $\gamma$ 2

Die SUMOylierung exogenen PPAR $\gamma$ s wurde mittels Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz nach der Duolink Methode von Olink untersucht. Hierbei wurden repräsentativ der PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp und die Mutante PPAR $\gamma$   $\Delta$ 3, welche Punktmutationen in beiden bekannten PPAR $\gamma$  *SUMO-acceptor sites* aufweist, getestet.

Für die Analyse mittels Western Blot wurden die Plasmide zunächst in HEK 293T und später in hMSC-TERT transient transfiziert, sowie mit dem PPAR $\gamma$  Agonisten Rosiglitazon 2 bzw. 24 Stunden stimuliert. Letztendlich konnte mit dieser Untersuchungsmethode wider Erwarten in keinem der Zellmodelle, sowie unter keinem der Stimuli (Vgl. Pascual et al., 2005) die SUMOylierung des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps oder der Mutante  $\Delta$ 3 nachgewiesen werden. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass generell nur ein geringer Teil des in einer Zelle vorliegenden PPAR $\gamma$ 2s sumoyliert wird, um Gentranskription zu modulieren. Da in den Versuchen kein exogenes SUMO-1 in die Zelle transfiziert wurde, könnte im Versuch lediglich eine Subfraktion des PPAR $\gamma$ 2 sumoyliert worden sein, deren Quantität zu gering für die Detektion mittels Western Blot war. Vergleichbares wurde bereits von Yamashita et al. beobachtet (Yamashita et al., 2004b). Eine unter den Ergebnissen nicht angeführte Immunpräzipitation vermochte die SUMOylierung PPAR $\gamma$ s ebenfalls nicht darzustellen.

Für Immunfluoreszenzen nach Olinks Duolink-Methode wurden ausschließlich hMSC-TERT verwendet. Es wurden der PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp und die Mutante  $\Delta$ 3 stellvertretend für alle weiteren zur Verfügung stehenden Mutanten transfiziert und mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops untersucht. Der Nachweis der SUMOylierung transfizierten PPAR $\gamma$ s gelang unter Verwendung dieser Methode. Sowohl in den mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp DNA als auch in den mit PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3 transfizierten Zellen stellte sich die Protein-Protein Interaktion als rote punktförmige Fluoreszenz dar. Indes wiesen die mit PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3 transfizierten Zellen zumindest subjektiv insgesamt weniger Signale auf. In der mit eGFP-transfizierten Kontrolle ließen sich keine Signale finden. Offensichtlich laufen in nicht-differenzierten hMSC-TERT prinzipiell SUMOylierungen ab. Da keine Fluoreszenzsignale in der Kontrolle zu finden sind, handelt es sich vermutlich

bei den SUMOylierungen PPAR $\gamma$ s um einen Effekt, der mit der Transfektion im Zusammenhang steht. Interessant ist dabei die Beobachtung, dass auch in den mit PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3 transfizierten Zellen SUMOylierungen abliefen. Einerseits könnte dies auf weitere, bisher unbekannte SUMOylierungsstellen PPAR $\gamma$ s hinweisen. Andererseits ist es möglich, dass es sich bei dem sumoylierten PPAR $\gamma$  um die Isoform PPAR $\gamma$ 1 handelt. Die vorangegangenen Western Blots liefern Hinweise, dass transfiziertes PPAR $\gamma$ 2 die Isoform PPAR $\gamma$ 1 induziert, was zu dessen vermehrter Expression führt. Als zugrundeliegender Mechanismus könnte der autostimulatorische Feedback-Mechanismus zwischen PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  wirksam sein (Rosen et al., 2002). Auf die hier vorliegende Situation angewandt würde PPAR $\gamma$ 2 C/EBP $\alpha$  induzieren, was wiederum zu einer undifferenzierten Induktion von sowohl PPAR $\gamma$ 2 als auch von PPAR $\gamma$ 1 führen könnte. Möglicherweise sind darüber hinaus in den PPAR $\gamma$ 2-transfizierten Zellen weitere Mitglieder der C/EBP-Familie ( $\beta$  und  $\delta$ ) (Wu et al., 1996) sowie SREBP1c (Fajas et al., 1999) aktiviert, sodass PPAR $\gamma$ 1 ihrerseits induziert würde. Des Weiteren könnten Artefakte für die Existenz der Kollokationen in den PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3- transfizierten Zellen verantwortlich sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Western Blot Verfahren keine geeignete Methode zum Nachweis der SUMOylierung von PPAR $\gamma$  durch endogenes SUMO darstellt. Da mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz SUMOylierungen zwar dargestellt werden konnten, jedoch stets einzelne Zellklone betrachtet werden, können die Ergebnisse von der individuellen Situation des Klons oder Faktoren wie Transfektionseffizienz beeinflusst sein. Letztendlich erscheint es zumindest für den Western Blot notwendig, nicht nur exogenes PPAR $\gamma$  zu transfizieren, sondern auch SUMO-Protein in die Versuchszelle zwecks Überexpression einzubringen (Yamashita et al., 2004a; Pascual et al., 2005). Die Verwendung eines Proteasomeninhibitors könnte zudem eine Degradierung von SUMOylierten PPAR $\gamma$  verhindern und somit die Menge des zu detektieren Materials erhöhen. Darüber hinaus sollte PPAR $\gamma$  mit einem *tag* versehen sein, was die Diskrimination von endogenem und exogenem PPAR $\gamma$  erleichtern könnte.

### 4.3 Funktionsanalysen: Adipogenese und Immunmodulation

Im Rahmen der Funktionsanalysen sollte das adipogenetische und das immunmodulatorische Potenzial PPAR $\gamma$ s in Abhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen, insbesondere der SUMOylierung untersucht werden. Die Versuche fanden ausschließlich in hMSC-TERT statt. Zur Unterstützung der Adipogenese sowie zur Aktivierung PPAR $\gamma$ s wurde ein im Labor etablierter Differenzierungscocktail verwendet, welcher unter anderem den synthetisch hergestellten und hoch affinen ( $K_d \sim 40\text{nM}$ ) PPAR $\gamma$  Agonisten Rosiglitazon (auch BRL49653 genannt) aus der Gruppe der Thiazolidindione (TZD) beinhaltet. TZD sind sog. *Insulin-Sensitizer* und wirken anti-diabetisch (Sohda et al., 1982). Ihre Wirkung erzielen sie v.a. durch die Aktivierung PPAR $\gamma$ s (Lehmann et al., 1995). Die genauen Mechanismen sind nicht abschließend erklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Gabe von TZD einerseits zur Senkung von TNF- $\alpha$ -vermittelter systemischer Entzündung (Katsuki et al., 2000; Hofmann et al., 1994; Wellen et al., 2004), welche in der Pathogenese der Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielt, führt (Hotamisligil, 2006). Und sie andererseits durch eine Steigerung der Adipogeneserate eine hyperplastische Fettgewebsexpansion (Hallakou et al., 1997), die im Vergleich zur Adipozytenhypertrophie mit verbesserter adipozytärer Insulinsensitivität, verminderten Plasmakonzentrationen freier Fettsäuren sowie einer geringeren ektopen Ablagerung toxischer Lipidspezies in Verbindung gebracht wird, fördert. Darüber hinaus soll eine Aktivierung PPAR $\gamma$ s in Muskel, Leber und Pankreas ebenfalls zu einer Verminderung lipotoxischer Effekte führen (Medina-Gomez et al., 2007b; Medina-Gomez et al., 2007a; Virtue und Vidal-Puig, 2010). Inzwischen ist die Zulassung für Rosiglitazon-haltige anti-diabetische Medikamente (Avandia®, Avandamet® und Avandaryl®) aufgrund eines möglicherweise erhöhten Risikos für ischämische Herzerkrankungen bei Einnahme von Rosiglitazon in Europa ausgesetzt (European Medicines Agency, 2010). In den USA kann die Indikation zur Gabe Rosiglitazon-haltiger Medikamente unter strengen Auflagen nach wie vor gestellt werden (U.S. Food and Drug Administration, 2010).

### 4.3.1 Adipogenese

In den Versuchen bezüglich des adipogenetischen Potenzials PPAR $\gamma$ s in Abhängigkeit von dessen SUMOylierungsstatus, wurden PPAR $\gamma$  Wildtyp und  $\Delta 3$  Plasmide in hMSC-TERT transient transfiziert. Dies führte zu einer Überexpression des Transkriptionsfaktors. Peter Tontonoz et al. zeigten für die fibroblastäre, PPAR $\gamma$ -defiziente Zelllinie NIH-3T3, dass im Rahmen eines *gain of function* Versuchs, die ektope Expression PPAR $\gamma$ s zur Differenzierung in Adipozyten führte. Dabei galt: je ausgeprägter die Expression des Transkriptionsfaktors, desto stärker die Induktion adipozytärer Gene. Die Gabe eines PPAR $\gamma$  Agonisten förderte diesen Effekt (Tontonoz et al., 1994). In Analogie hierzu sollte im Rahmen dieser Arbeit in der adipozytären Zelllinie hMSC-TERT durch die Überexpression von exogenem PPAR $\gamma$  das Programm der Adipogenese initiiert werden. Dabei sollte anhand der Mutante PPAR $\gamma$   $\Delta 3$  die Rolle der SUMOylierung bezüglich des Vorgangs charakterisiert werden. Zum Monitoring einer beginnenden Differenzierung bzw. einer präadipozytären Determination der Versuchszellen wurden die durch PPAR $\gamma$  induzierten Gene FABP4 und ADIPOQ (PPAR $\gamma$  spezifisch) als molekulare Marker definiert und nach 48 bzw. 72 Stunden in voneinander getrennten Versuchen gemessen.

Die Analyse der Versuchsergebnisse zeigte zwar sehr hohe PPAR $\gamma$  Konzentrationen in den transfizierten Zellen. Jedoch vermochte der ektope exprimierte Transkriptionsfaktor wider Erwarten nicht die Genexpression der hMSC-TERT derart zu regulieren, dass ein Beginn der Adipogenese in Form eines deutlich Anstiegs der molekularen Marker FABP4 oder ADIPOQ zu beobachten gewesen wäre.

Um zu begründen, weshalb die forcierte Expression ektope PPAR $\gamma$ s nicht zum erwarteten Ergebnis führte, werden im Folgenden die grundlegenden Abläufe der Determination mesenchymaler Stammzellen auf die adipozytäre Linie betrachtet und anhand dessen mögliche Ursachen im Versuchsablauf erörtert.

Mesenchymale Stammzellen sind pluripotent und besitzen die Fähigkeit, in Myozyten, Chondrozyten, Osteozyten und Adipozyten zu differenzieren. Was die Zellen zum Einschlagen der adipozytären Laufbahn bewegt bzw. zur Initiation der Adipogenese führt, ist bisher nicht geklärt. Es ist anzunehmen, dass Stimuli des extrazellulären Milieus und das nachfolgende konzertierte

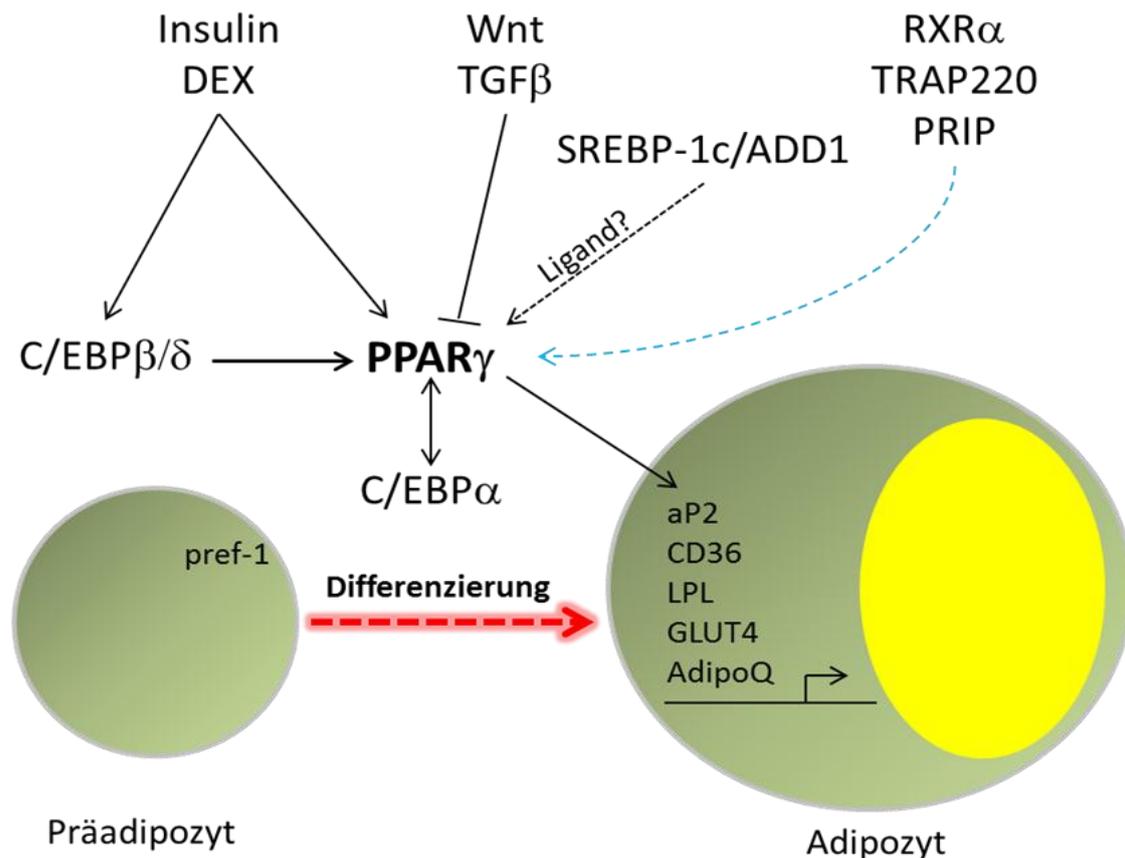
Zusammenwirken von intranukleären Transkriptionsfaktoren Verantwortung tragen. Der derzeitigen Datenlage zufolge sind zwei Entwicklungsphasen der mesenchymalen Stammzelle im Rahmen der Adipogenese zu unterscheiden. Die erste Phase, genannt Determination, beginnt mit der Festlegung der Stammzelle auf die adipozytäre Linie und mündet in der Konversion zu einem PPAR $\gamma$  exprimierenden Präadipozyten. Die zweite Phase wird als terminale Differenzierung bezeichnet und beschreibt die Entwicklung des Präadipozyten zum reifen Adipozyten (Rosen und MacDougald, 2006). Essentieller Transkriptionsfaktor ist PPAR $\gamma$  (Rosen et al., 1999), für dessen Expression das Zusammenwirken einer Fülle von intra- und extrazellulären Einflüssen vorab erforderlich ist. Eine durch transiente Transfektion hervorgerufene Expression PPAR $\gamma$ s in den Versuchszellen stellt folglich ein massives Vorgehen in der Chronologie der physiologischen Abläufe der Adipogenese dar. Möglicherweise waren aus diesem Grund wichtige Voraussetzungen für die Initiation der Differenzierung, die außerhalb des Einflussbereichs des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  liegen, nicht geschaffen. Anhand einiger Faktoren soll diese Hypothese kurz präzisiert werden. Nach heutiger Meinung liefert das perizelluläre Milieu Impulse für die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden, welche ultimativ zur sequenziellen Expression adipogenetischer Genmuster führen. Dabei wird *downstream* die Synthese pro-adipogenetischer Faktoren gefördert und die Synthese anti-adipogenetischer Faktoren, welche häufig positiv-Regulatoren für andere Zellentitäten sind, gehemmt. Insulin stellt einen äußerst wichtigen extrazellulären pro-adipogenetischen Impuls dar (Rubin et al., 1977). Es wirkt durch den IGF-1-R (*insulin-like growth factor receptor*) (Cinti et al., 1998) über das *insulin-receptor substrate* (IRS) (Fasshauer et al., 2001) mit nachfolgender Aktivierung des PI3K/Akt1(PKB) Weges (Sakaue et al., 1998; Magun et al., 1996) induzierend auf CEBP/ $\alpha$  und PPAR $\gamma$ . Dabei werden intrazelluläre Proteine, wie z.B. Necdin (Tseng et al., 2005), FOXO1 (*forkhead-box-protein*) (Nakae et al., 2003) und bestimmte Faktoren (GATA 2/3) der GATA-Familie (Tong et al., 2000; Menghini et al., 2005), welche allesamt antiadipogenetische Impulse darstellen, inhibiert. Das Wnt-signalling und TGF $\beta$  (*transforming growth factor beta*) hingegen sind bedeutende Vertreter extrazellulärer anti-adipogenetischer Faktoren. Insbesondere das Wnt-signalling (hier Wnt-10b) gilt

wegen seiner reprimierenden Wirkung auf PPAR $\gamma$  und CEBP/ $\alpha$  als wichtiger Regulator der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (Ross et al., 2000). TGF $\beta$  reguliert die Transkription von Zielgenen u.a. durch die Phosphorylierung sogenannter SMADs. Es inhibiert die Differenzierung von Präadipozyten im Rahmen von in vitro Versuchen und seine transgene Überexpression beeinflusst die Entstehung von Fettgewebe negativ (Choy et al., 2000). Im vergangenen Jahr gelang es der Gruppe Gupta, Spiegelman et al. das Zinkfinger-Protein Zfp423 als Regulator der Pparg Expression und weiteren wichtigen Determinationsfaktor der Adipogenese zu identifizieren. Die ektopische Expression von Zfp423 in NIH3T3 Fibroblasten aktivierte die Pparg Expression undifferenzierter Zellen, was zur Differenzierung der Zellen unter begünstigenden Umständen (Hormonzusätze im Kulturmedium) führte. Eine Reduktion von Zfp423 in 3T3-L1 Zellen verringerte auch deren Pparg Expression und schwächte infolgedessen ihr Differenzierungsvermögen ab (Gupta et al., 2010). Ferner ist Pref-1 (*preadipocyte factor 1*, auch DLK-1) als potenter Regulator der Adipogenese zu nennen. Pref-1 ist ein Plasmamembranprotein und etablierter Präadipozytenmarker, unter dessen Expression die Entwicklung des Präadipozyten stagniert (Smas und Sul, 1993; Villena et al., 2002). Im Rahmen der Adipogenese wird er herunter reguliert, was in vitro durch die Gabe von Kortikosteroiden erreicht werden kann (Sul et al., 2000; Wu et al., 1996).

Zwar scheinen sich Insulin, das Wnt-signalling und TGF- $\beta$  nach heutigen Erkenntnissen hauptsächlich mithilfe von DNA-bindenden *downstream*-Proteinen auf eine Expression PPAR $\gamma$ s auszuwirken (in dieser Arbeit nachweislich überexprimiert). Es könnte ihnen jedoch darüber hinaus eine Rolle bezüglich der Regulierung eines Adipogenese-ermöglichenden Gesamtmilieus im Nukleus beschieden sein, in dem Protein-Protein Interaktionen von Bedeutung sind. PPAR $\gamma$  ist als Liganden-gesteuerter Transkriptionsfaktor auf eine Liganden-vermittelte Aktivierung angewiesen. Es konnte für PPAR $\gamma$  zwar noch kein endogener spezifischer Ligand identifiziert werden, jedoch kommt SREBP1 (auch ADD1) in diesem Zusammenhang als potentieller „Ligandendonator“ PPAR $\gamma$ s in Frage (Kim et al., 1998). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass RxR $\alpha$ , sowie einige Kofaktoren für Funktion PPAR $\gamma$ s unerlässlich

sind. RxR $\alpha$  ist obligater Heterodimerisierungspartner PPAR $\gamma$ s, ohne dessen Anwesenheit keine Transkription PPAR $\gamma$  regulierter Gene stattfindet (Kliwer et al., 1992; Issemann et al., 1993). TRAP220 (auch PPAR-*binding protein*, PBP) (Ge et al., 2002) und PRIP (PPAR-*interacting protein*) (Qi et al., 2003) sind Kofaktoren, die für die adipogenetische Funktion PPAR $\gamma$ s ebenfalls unabdingbar sind. HATs (Histonacetyltransferasen, z.B. CBP, CREB-*binding protein* oder p300) sind freilich keine direkten Interaktionspartner PPAR $\gamma$ s, sie ermöglichen aber als Chromatinmodifikatoren, die Transkription adipogenetisch relevanter Gene. Ihre Ablation führt in 3T3-L1 Zellen zu einer abgeschwächten Adipogenese (Yamauchi et al., 2002).

Die Adipogenese, dessen zentrale Figur zweifelsfrei PPAR $\gamma$  ist, beschreibt ein multifaktorielles Geschehen, das von einem konzertierten Zusammenwirken vieler Mitspieler geprägt ist. Perizelluläres *Signalling* induziert intrazelluläre Abläufe, an denen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und putativer Liganden beteiligt ist. Für die Funktion PPAR $\gamma$ s sind einige von ihnen essentiell. Es erscheint hier nicht möglich, ohne die Verwendung von Adipogenese-induzierenden Agenzien (wie Insulin oder Kortikosteroiden) eine Konversion der mesenchymalen Stammzelle zum Präadipozyten zu erreichen.



**Abbildung 4.1: Relevante Faktoren der Adipogenese.** Extrazelluläre Stimuli entscheiden über das Differenzierungsschicksal von mesenchymalen Stammzellen. Insulin und Kortikosteroide stellen pro-adipogenetische, Wnt Signalling und TGF $\beta$  anti-adipogenetische Impulse dar. Im Inneren der Zelle führt das konzertierte Zusammenwirken von Transkriptionsfaktoren zur sequenziellen Expression adipozytärer Gene. Im Mittelpunkt steht PPAR $\gamma$ . Seine Expression ist vor allem abhängig von C/EBPs (*CAAT Enhancer binding proteins*). Für seine Funktion sind Kofaktoren (TRAP220, PRIP), Liganden und der Heterodimerisierungspartner RXR $\alpha$  wichtig. DEX= Dexamethason. Die Abbildung wurde Adaptiert nach Tontonoz & Spiegelman Nature 2008.

Um in den Versuchszellen etwaiges anti-adipogenetisches Signalling auszuschalten und einen möglichen Mangel an obligaten Bindungspartnern PPAR $\gamma$ s entgegenzuwirken sowie für dessen Funktion essentielle Proteine bereitzustellen, behandelten wir die Zellen mit einem für hMSC-TERT etablierten, die Adipogenese induzierenden Differenzierungscocktail. Er beinhaltet die oben angesprochenen Hormone Insulin und das Kortikosteroid Dexamethason sowie den PPAR $\gamma$  Agonisten Rosiglitazon, welcher die Aktivierung des Transkriptionsfaktors sicherstellen und dessen Wirkung

verstärken sollte. Nach 48 bzw. 72 Stunden Inkubationszeit waren die Zellen „andifferenziert“ und auf die adipozytäre Linie determiniert, was sich in der Expression der Gene FABP4 und ADIPOQ widerspiegelte. Der Vergleich der PPAR $\gamma$  überexprimierenden Zellen mit der Kontrolle ergab, dass eine stark erhöhte Konzentration (ca. 100- bis 200-fach) des Transkriptionsfaktors nicht zu einem Differenzierungsvorteil bzw. einer vermehrten Expression der Marker führte. Indes galt für die Kontrollzellen, dass die PPAR $\gamma$  Konzentrationen positiv mit FABP4-Werten korrelierten. Insgesamt war die Expression von FABP4 und ADIPOQ dennoch in allen Proben vergleichbar hoch. Demzufolge ist die Adipogenese in hMSC-TERT wie erwartet durch die Applikation eines Differenzierungscocktails induzierbar. Der Anstieg der gemessenen Parameter scheint jedoch allein mit dem endogenen PPAR $\gamma$  in Zusammenhang zu stehen. Eine 8-tägige Behandlung der Versuchszellen führte lichtmikroskopisch zur Ausbildung multilokulärer Fetttröpfchen im Zytosol und molekular zur Expression PPAR $\gamma$ s, FABP4s und ADIPOQs. Die PPAR $\gamma$  Konzentration in transfizierten Zellen war im Laufe der Differenzierung im Vergleich mit der Kontrolle relativ (4- bis 5-fach) gesunken. Die absoluten Werte waren ebenfalls rückläufig. Ein Hinweis darauf, dass das Kollektiv der Zellen möglicherweise im Laufe der Zeit das transfizierte PPAR $\gamma$  entweder abbaute, nicht an die folgende Generation weitergab oder nicht-transfizierte Zellen einen Teilungsvorteil hatten, was in der Summe ein klassisches zellbiologisches Phänomen der transienten Transfektion darstellen würde. Das Aktivieren PPAR $\gamma$ s mit Rosiglitazon führte zu einer starken Induktion von FABP4 und Adiponektin in allen Proben. Die Messwerte der transfizierten Proben überstiegen jedoch nicht die der stimulierten Kontrolle. Eine Inkubation der Zellen mit GW9662 hatte den entgegengesetzten Effekt. Aufgrund der Verwendung eines PPAR $\gamma$  spezifischen Aktivators bzw. Inhibitors und der darauf folgenden veränderten Expression FABP4s und des Adiponektins lässt sich eine Regulierung beider durch PPAR $\gamma$  festmachen. Auch hier scheinen die Effekte auf das Potenzial des endogenen PPAR $\gamma$ s zurückzuführen zu sein.

Die Hypothese, dass anti-adipogenetische Impulse die Aktivität PPAR $\gamma$ s hemmen oder ein Mangel an für die Funktion PPAR $\gamma$ s essentieller Bindungspartner vorläge, wird durch den letzten Versuch weitestgehend

entkräftet. Vielmehr scheint es, als läge das Problem in der Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor und dem zu transkribierenden Genabschnitt oder im Vorgang der Transkription von mRNA selbst. Beides wäre angesichts der in Abschnitt 3.1 durchgeführten Charakterisierung, welche die korrekte PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp Sequenz abbildet und sowohl ein Transkriptat als auch Translatat des Transkriptionsfaktors zeigt, zwar verwunderlich, jedoch im Rahmen der Adipogeneseversuche generierten Daten denkbar.

#### 4.3.2 Immunmodulation

Der Untersuchung des immunmodulatorischen Potenzials PPAR $\gamma$ s lag eine Publikation der Gruppe Pascual et al. aus dem Jahr 2005 zugrunde. In ihr wird ein Modell vorgestellt, in dem PPAR $\gamma$ 2 mittels Transrepression die Expression entzündlicher Gene in Maus-Makrophagen reprimiert. Hiernach leitet eine Liganden-abhängige SUMOylierung innerhalb der Liganden Bindungs Domäne (LBD) den Transkriptionsfaktor zu Kernrezeptor-Korepressorkomplexen an Promotoren entzündlicher Gene, um dort ihre Entfernung durch 19S Proteasomen zu verhindern (siehe 1.2.7) (Pascual et al., 2005). In dieser Arbeit wurde in Analogie zu der Entdeckung von Pascual et al. das anti-entzündliche Potenzial PPAR $\gamma$ 2s und die Frage nach der diesbezüglichen Rolle von SUMOylierungen im humanen Adipozytenmodell untersucht. Zu diesem Zweck wurden PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp und  $\Delta$ 3-Konstrukte in hMSC-TERT transient transfiziert und diese sieben Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen, um einen entzündlichen Status, wie er in Situationen metabolischer Dysregulation, besteht zu simulieren, mit TNF- $\alpha$  oder LPS stimuliert. TNF- $\alpha$  und LPS sind in der Lage entzündliche Prozesse einzuleiten und aufrecht zu erhalten. Hierauf basierende geringgradige und chronische Entzündungssituationen werden für die Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich gemacht (Hotamisligil, 2006). TNF- $\alpha$  bewirkt über seine im menschlichen Organismus ubiquitär exprimierten Rezeptoren (TNF-R1 und 2) unter anderem die Translokation von AP1 und NF- $\kappa$ B in den Zellkern, was letztendlich in der Expression entzündlicher Gene resultiert. LPS führt über den u.a. von Adipozyten exprimierten und von freien Fettsäuren aktivierbaren TLR4 (*Toll-like Receptor 4*) ebenfalls zu einer

Induktion des NF- $\kappa$ B Signalweges und agiert somit als Surrogat-Stimulus für die Fettsäure-vermittelte Aktivierung von TLR4 (Medzhitov und Horng, 2009b; Hotamisligil, 2006). Mittels quantitativer PCR wurde die IL-6 und MCP-1 Expression (siehe 1.1.3) als Parameter zur Quantifizierung der situativen entzündlichen Genexpression gemessen. FABP4 diente als molekularer Marker der Adipozytenfunktion.

#### PPAR $\gamma$ - und FABP4-Expression

In den Versuchen zeigten die Proben transfizierter Zellen gegenüber der Kontrolle eine deutlich höhere Konzentration des Transkriptionsfaktors. Dabei wiesen die mit PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3 transfizierten Zellen eine 8,5-fache Expression, die mit dem PPAR $\gamma$  Wildtyp transfizierten Zellen noch eine 4-fache Expression auf. Unter der Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder LPS blieben diese Werte nahezu unbeeinträchtigt.

Die Messung der FABP4 Expression ergab für nicht-stimulierte Proben weitestgehend einheitliche Werte. Die Stimulation der Zellen mit pro-entzündlichen Zytokinen führte jedoch zu einer drastischen Reduktion der Expression von FABP4, was mit der Beobachtung, dass entzündliche Prozesse die Funktion des Adipozyten beeinträchtigen, zu vereinbaren ist. Im Fall von LPS bedeutete dies im Allgemeinen eine Halbierung der FABP4-Expression. Bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  sank sie in allen Zellkollektiven sogar um beinahe 90 Prozent. TNF- $\alpha$  scheint demnach bei der Induktion entzündlicher Situationen in hMSC-TERT einen potenteren Stimulus als LPS darzustellen. Das Vorhandensein einer erhöhten Konzentration PPAR $\gamma$ s hat offenbar keinen protektiven Wert bezüglich der Expression FABP4s.

#### MCP-1- und IL-6-Expression

Die Expressionsanalysen zeigten, dass MCP-1 unter den oben beschriebenen Bedingungen von hMSC-TERT bereits basal exprimiert wird. PPAR $\gamma$ 2 transfizierte Zellen wiesen bemerkenswerter Weise eine ca. 50 Prozent geringere basale MCP-1 Expression als die Kontrolle auf. Die Stimulation der Zellen mit o.g. entzündlichen Mediatoren führte erwartungsgemäß zu einem Anstieg der Expression des MCP-1 Gens. Durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$

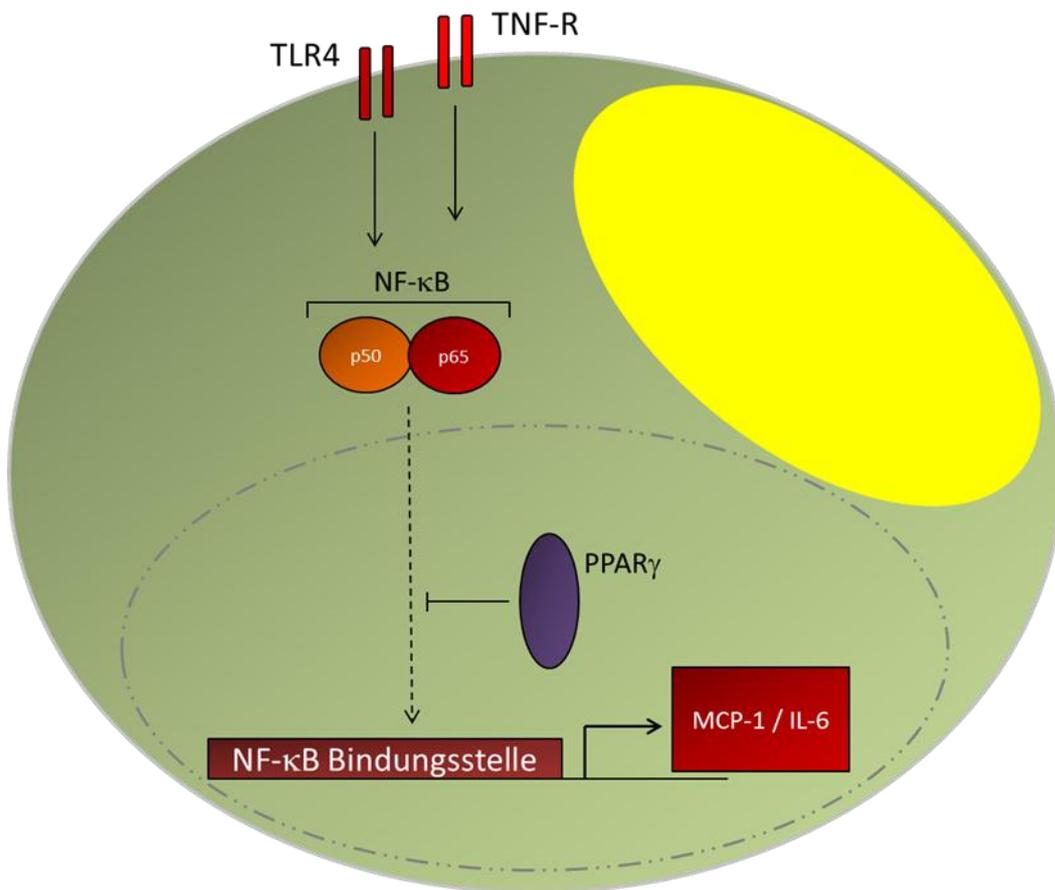
stieg dieser Wert in nicht-transfizierten Zellen auf das 6,9-fache des basalen Expressionsniveaus der Kontrolle an. Mit dem PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp transfizierte Zellen wiesen eine ca. 5,6-fache und die mit PPAR $\gamma$ 2  $\Delta$ 3 transfizierten Zellen eine in etwa 4,6-fache Steigerung gegenüber dem basalen Expressionsniveau der Kontrolle auf. LPS führte insgesamt zu einer schwächeren Induktion des entzündunglichen Gens im Vergleich zur TNF- $\alpha$ -Stimulation. Nicht-transfizierte Zellen zeigten infolge der Stimulation mit LPS eine ca. drei-fache Erhöhung der MCP-1 Expression. Die transfizierten Zellen wiesen einen in etwa nur halb so hohen Anstieg des Expressionsniveaus auf.

Die Messungen bezüglich der Expression des entzündlichen Gens IL 6 konnten in der Tendenz den Eindruck einer immunmodulatorischen Aktivität PPAR $\gamma$ s bestärken. Supraphysiologische Konzentrationen PPAR $\gamma$ s sorgten für eine um ca. 50 Prozent gesenkte basale Expression von IL-6 in hMSC-TERT. Bei der Stimulation der Zellen mit LPS stieg zwar in allen Proben die Expression des IL-6 Gens an. Jedoch konnten die transfizierten Zellen mit einer Halbierung des Expressionsniveaus gegenüber der Kontrolle aufwarten.

Zusammengenommen legen die Daten eine immunmodulatorische Rolle PPAR $\gamma$ s für das humane adipozytäre Modell nahe (siehe Abb. 4.2). MCP-1 und IL-6 sind im menschlichen Adipozyten real existierende entzündliche Zytokine, deren Expression über den NF- $\kappa$ B Signalweg induziert werden kann. Eine erhöhte MCP-1 Konzentration bewirkt die Akkumulation von Makrophagen im Fettgewebe (Kanda et al., 2006; Kamei et al., 2006), welche ihrerseits entzündliche Zytokine sezernieren und somit sowohl die lokale als auch systemische entzündliche Situation unterhalten können. Gesteigerte IL-6 Spiegel stehen ebenfalls über die chronische systemische *low grade* Entzündung in Zusammenhang mit Insulinresistenz und kardiovaskulären Ereignissen eines Individuums (Fernandez-Real und Ricart, 2003; Ridker et al., 2000). Die PPAR $\gamma$ -vermittelte Unterdrückung der Expression dieser Zytokine im Adipozyten würde nicht zuletzt aufgrund einer verminderten Makrophagenchemotaxis einen Mechanismus darstellen, der an der Wurzel systementzündlicher Prozesse interveniert. Die protektive Wirkung bzgl. der Insulinresistenz von TZD (Di Gregorio et al., 2005), welche die Aktivierung

PPAR $\gamma$ s bewirken, ist möglicherweise u.a. hierin begründet. Anhand von *in vivo* Experimenten könnte dies weiterführend untersucht werden, indem die Expression von entzündlichen Zytokinen in Adipozyten des Fettgewebes von den in der Einleitung beschriebenen POKO- und Obese-Mäusen unter der Gabe von TZD verglichen würde.

Wie eingangs erwähnt ordneten Pascual et al. die transrepressive immunmodulatorische Wirkung PPAR $\gamma$ s in Mausmakrophagen der Ligandengesteuerten SUMOylierung des Transkriptionsfaktors an Stelle K365 zu. In dem hier durchgeführten Versuch wurde zwar nicht mit TNF- $\alpha$  bzw. LPS und Rosiglitazon simultan stimuliert. Die Zellen waren aber durch die vorausgegangene Differenzierung mithilfe des Rosiglitazon-haltigen Differenzierungscocktails entsprechend vorbehandelt. In Anbetracht der funktionellen Deletion dieser SUMOylierungsstelle lässt sich das Zugrundeliegen eines wie von Pascual postulierten Mechanismus im adipozytären Modell anhand dieser Arbeit jedoch nicht bestätigen. Möglicherweise sind andere transrepressorische Mechanismen wie die Liganden-vermittelte Induktion des anti-entzündlichen I $\kappa$ B, die direkte Interaktion PPARs mit der p65 Untereinheit des NF- $\kappa$ B-Komplexes oder das Konkurrieren um gemeinsame Koaktivatoren (Ricote und Glass, 2007) für die in dieser Arbeit beobachtete anti-entzündliche Modulation durch erhöhte PPAR $\gamma$ 2-Konzentrationen verantwortlich.



**Abbildung 4.2: Repression von MCP-1 und IL-6 durch PPAR $\gamma$ 2 im adipozytären Zellmodell hMSC-TERT.** TNF- $\alpha$  und LPS sind in der Lage über den TNF-R bzw. den TLR4 die entzündlichen Gene MCP-1 und IL-6 in differenzierten hMSC-TERT zu induzieren. Der exogen exprimierte nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$ 2 vermag es diese Induktion abzuschwächen.

## 5 Zusammenfassung

Die Prävalenz der Adipositas und die mit ihr verbundenen Komorbiditäten stellen eines der größten gesundheitlichen Probleme der heutigen Zeit dar, weshalb der Entwicklung von Therapieansätzen großes Interesse gilt.

Adipozyten sind zwar „Spezialisten“ der Energiespeicherung, reagieren aber auf Situationen metabolischer Entgleisung u.a. mit der Synthese entzündlicher Zytokine, welche para- und endokrin wirksam sind und eine milde, aber chronische und systemische Entzündungsreaktion in Fettgewebe, Leber und Muskel hervorrufen. Diese chronische Entzündung gilt als direkt kausal für die Entstehung der Insulinresistenz und damit auch für Diabetes mellitus Typ 2. Der nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor in der Entstehung von Fettgewebe, wird aber auch mit der Modulation entzündlicher Genexpression in Verbindung gebracht. Die Aktivität PPAR $\gamma$ s ist maßgeblich durch posttranslationale Modifikationen bestimmt. Insbesondere die Modifizierung mit SUMO, einem kleinen Ubiquitin-ähnlichen Protein, scheint die immunmodulatorische Aktivität des Transkriptionsfaktors in Makrophagen zu beeinflussen. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen und, ob ein ähnlicher Prozess auch in Adipozyten stattfinden kann, nicht abschließend erklärt.

Das Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung der SUMOylierung PPAR $\gamma$ s in einem humanen Adipozyten-Modell hMSC-TERT zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden mittels *site-directed mutagenesis* PPAR $\gamma$ 2 Mutanten erstellt, die in unterschiedlicher Kombination funktionelle Deletionen im Bereich der beiden bekannten SUMOylierungsstellen und einer Phosphorylierungsstelle aufwiesen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Plasmide charakterisiert: Ihre Sequenzierung bestätigte sowohl die Originalität des Wildtyps als auch die korrekte Lokalisation entsprechender Mutationen. Nach transienter Transfektion in HEK 293T und hMSC-TERT wurde die Überexpression des PPAR $\gamma$  Proteins im Western Blot Verfahren und in der indirekten Immunfluoreszenz visualisiert. Exogenes PPAR $\gamma$ 2 schien endogenes PPAR $\gamma$ 1 zu induzieren. Eine TaqMan *real time* PCR bestätigte die Überexpression PPAR $\gamma$ s auf mRNA-Ebene.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das SUMOylierungspotenzial der Mutante  $\Delta 3$  mit dem des PPAR $\gamma 2$  Wildtyps in hMSC-TERT verglichen. Im Western Blot war es nicht möglich die SUMOylierung des Proteins darzustellen. Mittels Duolink-Immunfluoreszenz waren in Wildtyp- und  $\Delta 3$ -transfizierten Zellen SUMOylierungen PPAR $\gamma$ s darstellbar. In Relation zur PPAR $\gamma 2$ -Expression war die Rate jedoch gering, was für die SUMOylierung lediglich einer Subfraktion des Proteins spricht. Kolokalisationen in  $\Delta 3$ -transfizierten Zellen waren vermutlich auf die Induktion endogenen PPAR $\gamma$ s zurückzuführen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung der SUMOylierung für die adipogenetische und immunmodulatorische Aktivität PPAR $\gamma$ s mithilfe der TaqMan *real time* PCR untersucht. Ein pro-adipogenetischer Effekt konnte unter verschiedenen Bedingungen weder für den transfizierten PPAR $\gamma 2$  Wildtyp noch für die Mutante  $\Delta 3$  nachgewiesen werden. Im immunmodulatorischen Versuch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen intraadipozytärer Entzündung und verminderter Adipozytenfunktion. Die Inkubation der Zellen mit den Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$  und dem TLR4-aktivierenden LPS führte zu einer Induktion der pro-entzündlichen Gene Interleukin 6 (IL-6) und dem *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) sowie zu einer Repression des *fatty acid transport protein 4* (FABP4). PPAR $\gamma 2$  Wildtyp- und  $\Delta 3$ -transfizierte Zellen zeichnete untereinander eine vergleichbare, bemerkenswerterweise gegenüber der Kontrolle aber verringerte Expression der beiden entzündlichen Gene aus. Über die Expression des *monocyte chemotactic protein-1* und erhöhten IL-6 Plasma-Konzentrationen lässt sich die Brücke von der lokalen zur milden systemischen Entzündung schlagen, welche mit der Entstehung von Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist. Durch die Repression dieser Gene wäre adipozytäres PPAR $\gamma$  im Stande, eine Instanz vor der Monozyten-vermittelten systemischen Entzündung mit der Initiation entzündlicher Prozesse zu intervenieren. Dies könnte nicht zuletzt einen Wirkmechanismus der PPAR $\gamma$ -aktivierenden TZD darstellen.

Die Bedeutung der SUMOylierung von PPAR $\gamma 2$  für die Adipogenese konnte im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht gezeigt werden. Die Repression entzündlicher Gene im Adipozyten durch PPAR $\gamma 2$  stellt jedoch eine interessante Beobachtung dar.

In einem zukünftigen Projekt sollte dieser Aspekt im Maus-Modell weiter verfolgt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams,M., Reginato,M.J., Shao,D., Lazar,M.A., and Chatterjee,V.K. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J. Biol. Chem.* 272, 5128-5132.
- Ahmadian,M., Wang,Y., and Sul,H.S. (2010). Lipolysis in adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 555-559.
- Aquila,H., Link,T.A., and Klingenberg,M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* 4, 2369-2376.
- Arita,Y., Kihara,S., Ouchi,N., Takahashi,M., Maeda,K., Miyagawa,J., Hotta,K., Shimomura,I., Nakamura,T., Miyaoka,K., Kuriyama,H., Nishida,M., Yamashita,S., Okubo,K., Matsubara,K., Muraguchi,M., Ohmoto,Y., Funahashi,T., and Matsuzawa,Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 79-83.
- Biswas,S.K. and Sodhi,A. (2002). Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1095-1107.
- Brasaemle,D.L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48, 2547-2559.
- Brasaemle,D.L., Rubin,B., Harten,I.A., Gruia-Gray,J., Kimmel,A.R., and Londos,C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 275, 38486-38493.
- Cambien,B., Pomeranz,M., Millet,M.A., Rossi,B., and Schmid-Alliana,A. (2001). Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. *Blood* 97, 359-366.
- Carey,A.L., Steinberg,G.R., Macaulay,S.L., Thomas,W.G., Holmes,A.G., Ramm,G., Prelovsek,O., Hohnen-Behrens,C., Watt,M.J., James,D.E., Kemp,B.E., Pedersen,B.K., and Febbraio,M.A. (2006). Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55, 2688-2697.
- Castrillo,A. and Tontonoz,P. (2004). Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 455-480.

Chandran,M., Phillips,S.A., Ciaraldi,T., and Henry,R.R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26, 2442-2450.

Chen,J.D. and Evans,R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.

Choi,J.H., Banks,A.S., Estall,J.L., Kajimura,S., Bostrom,P., Laznik,D., Ruas,J.L., Chalmers,M.J., Kamenecka,T.M., Bluher,M., Griffin,P.R., and Spiegelman,B.M. (2010). Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature* 466, 451-456.

Choy,L., Skillington,J., and Derynck,R. (2000). Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 149, 667-682.

Cinti,S., Eberbach,S., Castellucci,M., and Accili,D. (1998). Lack of insulin receptors affects the formation of white adipose tissue in mice. A morphometric and ultrastructural analysis. *Diabetologia* 41, 171-177.

Dandona,P., Aljada,A., and Bandyopadhyay,A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 25, 4-7.

Desvergne,B. and Wahli,W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649-688.

Di Gregorio,G.B., Yao-Borengasser,A., Rasouli,N., Varma,V., Lu,T., Miles,L.M., Ranganathan,G., Peterson,C.A., McGehee,R.E., and Kern,P.A. (2005). Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* 54, 2305-2313.

Dietze-Schroeder,D., Sell,H., Uhlig,M., Koenen,M., and Eckel,J. (2005). Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes* 54, 2003-2011.

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

European Medicines Agency. European Medicines Agency recommends suspension of Avandia, Avandamet and Avaglim. 2010.

Ref Type: Online Source

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

Fajas,L., Schoonjans,K., Gelman,L., Kim,J.B., Najib,J., Martin,G., Fruchart,J.C., Briggs,M., Spiegelman,B.M., and Auwerx,J. (1999). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell Biol.* 19, 5495-5503.

- Farmer,S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4, 263-273.
- Fasshauer,M., Klein,J., Kriauciunas,K.M., Ueki,K., Benito,M., and Kahn,C.R. (2001). Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol. Cell Biol.* 21, 319-329.
- Fernandez-Real,J.M. and Ricart,W. (2003). Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr. Rev.* 24, 278-301.
- Frayn,K.N., Karpe,F., Fielding,B.A., Macdonald,I.A., and Coppack,S.W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 27, 875-888.
- Frederich,R.C., Hamann,A., Anderson,S., Lollmann,B., Lowell,B.B., and Flier,J.S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* 1, 1311-1314.
- Frohnert,B.I., Hui,T.Y., and Bernlohr,D.A. (1999). Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J. Biol. Chem.* 274, 3970-3977.
- Gampe,R.T., Jr., Montana,V.G., Lambert,M.H., Miller,A.B., Bledsoe,R.K., Milburn,M.V., Kliewer,S.A., Willson,T.M., and Xu,H.E. (2000). Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell* 5, 545-555.
- Ge,K., Guermah,M., Yuan,C.X., Ito,M., Wallberg,A.E., Spiegelman,B.M., and Roeder,R.G. (2002). Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* 417, 563-567.
- Geiss-Friedlander,R. and Melchior,F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 947-956.
- Gesta,S., Tseng,Y.H., and Kahn,C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256.
- Glass,C.K. and Ogawa,S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 44-55.
- Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121-141.
- Graves,R.A., Tontonoz,P., and Spiegelman,B.M. (1992). Analysis of a tissue-specific enhancer: ARF6 regulates adipogenic gene expression. *Mol. Cell Biol.* 12, 3313.
- Grundy,S.M. (2004). Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 2595-2600.
- Grundy,S.M. (2008). Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 629-636.

- Gupta,R.K., Arany,Z., Seale,P., Mepani,R.J., Ye,L., Conroe,H.M., Roby,Y.A., Kulaga,H., Reed,R.R., and Spiegelman,B.M. (2010). Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* 464, 619-623.
- Hallakou,S., Doare,L., Foufelle,F., Kergoat,M., Guerre-Millo,M., Berthault,M.F., Dugail,I., Morin,J., Auwerx,J., and Ferre,P. (1997). Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes* 46, 1393-1399.
- Hirsch,J. and Batchelor,B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin. Endocrinol. Metab* 5, 299-311.
- Hofmann,C., Lorenz,K., Braithwaite,S.S., Colca,J.R., Palazuk,B.J., Hotamisligil,G.S., and Spiegelman,B.M. (1994). Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134, 264-270.
- Hossain,P., Kavar,B., and El Nahas,M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N. Engl. J. Med.* 356, 213-215.
- Hotamisligil,G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hotamisligil,G.S., Shargill,N.S., and Spiegelman,B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hu,E., Kim,J.B., Sarraf,P., and Spiegelman,B.M. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 274, 2100-2103.
- Huang,P., Chandra,V., and Rastinejad,F. (2010). Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol* 72, 247-272.
- Hummasti,S. and Tontonoz,P. (2006). The peroxisome proliferator-activated receptor N-terminal domain controls isotype-selective gene expression and adipogenesis. *Mol. Endocrinol.* 20, 1261-1275.
- Ibrahimi,A. and Abumrad,N.A. (2002). Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 5, 139-145.
- Issemann,I. and Green,S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.
- Issemann,I., Prince,R.A., Tugwood,J.D., and Green,S. (1993). The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 75, 251-256.
- Jiang,C., Ting,A.T., and Seed,B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82-86.
- Kalant,D. and Cianflone,K. (2004). Regulation of fatty acid transport. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 309-314.

Kallenberger,B.C., Love,J.D., Chatterjee,V.K., and Schwabe,J.W. (2003). A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat. Struct. Biol.* 10, 136-140.

Kamei,N., Tobe,K., Suzuki,R., Ohsugi,M., Watanabe,T., Kubota,N., Ohtsuka-Kowatari,N., Kumagai,K., Sakamoto,K., Kobayashi,M., Yamauchi,T., Ueki,K., Oishi,Y., Nishimura,S., Manabe,I., Hashimoto,H., Ohnishi,Y., Ogata,H., Tokuyama,K., Tsunoda,M., Ide,T., Murakami,K., Nagai,R., and Kadowaki,T. (2006). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 281, 26602-26614.

Kanda,H., Tateya,S., Tamori,Y., Kotani,K., Hiasa,K., Kitazawa,R., Kitazawa,S., Miyachi,H., Maeda,S., Egashira,K., and Kasuga,M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest* 116, 1494-1505.

Katsuki,A., Sumida,Y., Murata,K., Furuta,M., Araki-Sasaki,R., Tsuchihashi,K., Hori,Y., Yano,Y., Gabazza,E.C., and Adachi,Y. (2000). Troglitazone reduces plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab* 2, 189-191.

Kershaw,E.E. and Flier,J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 2548-2556.

Kim,J.B., Wright,H.M., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4333-4337.

Kliwer,S.A., Sundseth,S.S., Jones,S.A., Brown,P.J., Wisely,G.B., Koble,C.S., Devchand,P., Wahli,W., Willson,T.M., Lenhard,J.M., and Lehmann,J.M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4318-4323.

Kliwer,S.A., Umesono,K., Noonan,D.J., Heyman,R.A., and Evans,R.M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.

Kolditz,C.I. and Langin,D. (2010). Adipose tissue lipolysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 13, 377-381.

Kurokawa,R., Soderstrom,M., Horlein,A., Halachmi,S., Brown,M., Rosenfeld,M.G., and Glass,C.K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* 377, 451-454.

Lazar,M.A. (2005). How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307, 373-375.

Lehmann,J.M., Moore,L.B., Smith-Oliver,T.A., Wilkison,W.O., Willson,T.M., and Kliwer,S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for

peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953-12956.

Lehrke, M. and Lazar, M.A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell* **123**, 993-999.

Lelliott, C. and Vidal-Puig, A.J. (2004). Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **28 Suppl 4**, S22-S28.

MacDougald, O.A. and Lane, M.D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 345-373.

MacDougald, O.A. and Mandrup, S. (2002). Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol. Metab* **13**, 5-11.

Magun, R., Burgering, B.M., Coffey, P.J., Pardasani, D., Lin, Y., Chabot, J., and Sorisky, A. (1996). Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (c-Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology* **137**, 3590-3593.

Makowski, L. and Hotamisligil, G.S. (2005). The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **16**, 543-548.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.

McKenna, N.J. and O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**, 465-474.

Mead, J.R., Irvine, S.A., and Ramji, D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med. (Berl)* **80**, 753-769.

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

Medina-Gomez, G., Gray, S.L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell, M., Curtis, R.K., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Yeo, G.S., Lopez, M., Seppanen-Laakso, T., Ashcroft, F.M., Oresic, M., and Vidal-Puig, A. (2007b). PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS. Genet.* **3**, e64.

Medzhitov, R. and Horng, T. (2009a). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 692-703.

Medzhitov, R. and Horng, T. (2009b). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 692-703.

Menghini, R., Marchetti, V., Cardellini, M., Hribal, M.L., Mauriello, A., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R., and Federici, M. (2005). Phosphorylation of GATA2 by Akt

increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation* 111, 1946-1953.

Mohamed-Ali,V., Goodrick,S., Rawesh,A., Katz,D.R., Miles,J.M., Yudkin,J.S., Klein,S., and Coppack,S.W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 82, 4196-4200.

Mukherjee,R., Jow,L., Croston,G.E., and Paterniti,J.R., Jr. (1997). Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.* 272, 8071-8076.

Nakae,J., Kitamura,T., Kitamura,Y., Biggs,W.H., III, Arden,K.C., and Accili,D. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* 4, 119-129.

Nedergaard,J., Bengtsson,T., and Cannon,B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 293, E444-E452.

Nelson,D. and Cox,M. (2009). *Lehninger Biochemie* (4. Auflage). Springer).

Nolte,R.T., Wisely,G.B., Westin,S., Cobb,J.E., Lambert,M.H., Kurokawa,R., Rosenfeld,M.G., Willson,T.M., Glass,C.K., and Milburn,M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-143.

Ohshima,T., Koga,H., and Shimotohno,K. (2004). Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* 279, 29551-29557.

Ouchi,N., Kihara,S., Arita,Y., Okamoto,Y., Maeda,K., Kuriyama,H., Hotta,K., Nishida,M., Takahashi,M., Muraguchi,M., Ohmoto,Y., Nakamura,T., Yamashita,S., Funahashi,T., and Matsuzawa,Y. (2000). Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102, 1296-1301.

Ouchi,N., Kihara,S., Funahashi,T., Matsuzawa,Y., and Walsh,K. (2003). Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 561-566.

Pascual,G., Fong,A.L., Ogawa,S., Gamliel,A., Li,A.C., Perissi,V., Rose,D.W., Willson,T.M., Rosenfeld,M.G., and Glass,C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763.

Powell,E., Kuhn,P., and Xu,W. (2007). Nuclear Receptor Cofactors in PPARgamma-Mediated Adipogenesis and Adipocyte Energy Metabolism. *PPAR. Res.* 2007, 53843.

- Prawitt,J., Niemeier,A., Kassem,M., Beisiegel,U., and Heeren,J. (2008). Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 314, 814-824.
- Qi,C., Surapureddi,S., Zhu,Y.J., Yu,S., Kashireddy,P., Rao,M.S., and Reddy,J.K. (2003). Transcriptional coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)-interacting protein, is required for PPARgamma-mediated adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 25281-25284.
- Reaven,G.M. (1993). Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu. Rev. Med.* 44, 121-131.
- Reshef,L., Olswang,Y., Cassuto,H., Blum,B., Croniger,C.M., Kalhan,S.C., Tilghman,S.M., and Hanson,R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 30413-30416.
- Ricote,M. and Glass,C.K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 926-935.
- Ricote,M., Li,A.C., Willson,T.M., Kelly,C.J., and Glass,C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.
- Ridker,P.M., Rifai,N., Stampfer,M.J., and Hennekens,C.H. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101, 1767-1772.
- Rollins,B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Rosen,E.D., Hsu,C.H., Wang,X., Sakai,S., Freeman,M.W., Gonzalez,F.J., and Spiegelman,B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16, 22-26.
- Rosen,E.D. and MacDougald,O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 885-896.
- Rosen,E.D., Sarraf,P., Troy,A.E., Bradwin,G., Moore,K., Milstone,D.S., Spiegelman,B.M., and Mortensen,R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611-617.
- Rosen,E.D. and Spiegelman,B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 145-171.
- Rosen,E.D. and Spiegelman,B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853.
- Rosenfeld,M.G., Lunnyak,V.V., and Glass,C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20, 1405-1428.

Ross,S.E., Hemati,N., Longo,K.A., Bennett,C.N., Lucas,P.C., Erickson,R.L., and MacDougald,O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.

Rotter,V., Nagaev,I., and Smith,U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* 278, 45777-45784.

Rubin,C.S., Lai,E., and Rosen,O.M. (1977). Acquisition of increased hormone sensitivity during in vitro adipocyte development. *J. Biol. Chem.* 252, 3554-3557.

Sakaue,H., Ogawa,W., Matsumoto,M., Kuroda,S., Takata,M., Sugimoto,T., Spiegelman,B.M., and Kasuga,M. (1998). Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 28945-28952.

Saltiel,A.R. and Pessin,J.E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* 12, 65-71.

Samama,P., Rumennik,L., and Grippo,J.F. (2003). The melanocortin receptor MCR4 controls fat consumption. *Regul. Pept.* 113, 85-88.

Sartipy,P. and Loskutoff,D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7265-7270.

Schaffer,J.E. and Lodish,H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427-436.

Scherer,P.E., Williams,S., Fogliano,M., Baldini,G., and Lodish,H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 26746-26749.

Schoonjans,K., Peinado-Onsurbe,J., Lefebvre,A.M., Heyman,R.A., Briggs,M., Deeb,S., Staels,B., and Auwerx,J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336-5348.

Shao,D., Rangwala,S.M., Bailey,S.T., Krakow,S.L., Reginato,M.J., and Lazar,M.A. (1998). Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* 396, 377-380.

Simonsen,J.L., Rosada,C., Serakinci,N., Justesen,J., Stenderup,K., Rattan,S.I., Jensen,T.G., and Kassem,M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 592-596.

Smas,C.M. and Sul,H.S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725-734.

Sohda,T., Mizuno,K., Imamiya,E., Sugiyama,Y., Fujita,T., and Kawamatsu,Y. (1982). Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-

benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 30, 3580-3600.

Sul,H.S., Smas,C., Mei,B., and Zhou,L. (2000). Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 24 *Suppl 4*, S15-S19.

Taga,T., Hibi,M., Hirata,Y., Yamasaki,K., Yasukawa,K., Matsuda,T., Hirano,T., and Kishimoto,T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573-581.

Tanti,J.F., Grillo,S., Gremeaux,T., Coffey,P.J., Van,O.E., and Le Marchand-Brustel,Y. (1997). Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 138, 2005-2010.

Tong,Q., Dalgin,G., Xu,H., Ting,C.N., Leiden,J.M., and Hotamisligil,G.S. (2000). Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 290, 134-138.

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

Tontonoz,P. and Spiegelman,B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289-312.

Tseng,Y.H., Butte,A.J., Kokkotou,E., Yechoor,V.K., Taniguchi,C.M., Kriauciunas,K.M., Cypess,A.M., Niinobe,M., Yoshikawa,K., Patti,M.E., and Kahn,C.R. (2005). Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nat. Cell Biol.* 7, 601-611.

U.S.Food and Drug Administration. FDA significantly restricts access to the diabetes drug Avandia. 2010.

Ref Type: Online Source

Ueda,A., Ishigatsubo,Y., Okubo,T., and Yoshimura,T. (1997). Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J. Biol. Chem.* 272, 31092-31099.

Villena,J.A., Kim,K.H., and Sul,H.S. (2002). Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm. Metab Res.* 34, 664-670.

Virtue,S. and Vidal-Puig,A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 338-349.

Viswakarma,N., Jia,Y., Bai,L., Vluggens,A., Borensztajn,J., Xu,J., and Reddy,J.K. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR. Res.* 2010.

Walkey,C.J. and Spiegelman,B.M. (2008). A functional peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand-binding domain is not required for adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 24290-24294.

Wang,Y.X., Lee,C.H., Tiep,S., Yu,R.T., Ham,J., Kang,H., and Evans,R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113, 159-170.

Weisberg,S.P., McCann,D., Desai,M., Rosenbaum,M., Leibel,R.L., and Ferrante,A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest* 112, 1796-1808.

Wellen,K.E. and Hotamisligil,G.S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest* 112, 1785-1788.

Wellen,K.E. and Hotamisligil,G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest* 115, 1111-1119.

Wellen,K.E., Uysal,K.T., Wiesbrock,S., Yang,Q., Chen,H., and Hotamisligil,G.S. (2004). Interaction of tumor necrosis factor-alpha- and thiazolidinedione-regulated pathways in obesity. *Endocrinology* 145, 2214-2220.

Wu,Z., Bucher,N.L., and Farmer,S.R. (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* 16, 4128-4136.

Wu,Z., Rosen,E.D., Brun,R., Hauser,S., Adelmant,G., Troy,A.E., McKeon,C., Darlington,G.J., and Spiegelman,B.M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151-158.

Wulster-Radcliffe,M.C., Ajuwon,K.M., Wang,J., Christian,J.A., and Spurlock,M.E. (2004). Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 924-929.

Yamashita,D., Yamaguchi,T., Shimizu,M., Nakata,N., Hirose,F., and Osumi,T. (2004a). The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells* 9, 1017-1029.

Yamashita,D., Yamaguchi,T., Shimizu,M., Nakata,N., Hirose,F., and Osumi,T. (2004b). The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells* 9, 1017-1029.

Yamauchi,T., Kamon,J., Ito,Y., Tsuchida,A., Yokomizo,T., Kita,S., Sugiyama,T., Miyagishi,M., Hara,K., Tsunoda,M., Murakami,K., Ohteki,T., Uchida,S., Takekawa,S., Waki,H., Tsuno,N.H., Shibata,Y., Terauchi,Y., Froguel,P., Tobe,K., Koyasu,S., Taira,K., Kitamura,T., Shimizu,T., Nagai,R., and Kadowaki,T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.

Yamauchi,T., Oike,Y., Kamon,J., Waki,H., Komeda,K., Tsuchida,A., Date,Y., Li,M.X., Miki,H., Akanuma,Y., Nagai,R., Kimura,S., Saheki,T., Nakazato,M., Naitoh,T.,

Yamamura,K., and Kadowaki,T. (2002). Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nat. Genet.* 30, 221-226.

Zhang,Y., Proenca,R., Maffei,M., Barone,M., Leopold,L., and Friedman,J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhu,Y., Qi,C., Korenberg,J.R., Chen,X.N., Noya,D., Rao,M.S., and Reddy,J.K. (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, 7921-7925.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	Acyl-CoA Synthetase
AdipoR	Adiponektin-Rezeptor
ADD	Alpha-Adducin
AF	<i>activation function</i>
AGPAT	1-Acyl-sn-Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AP1	<i>activator protein 1</i>
aP2	<i>adipocyte protein 2</i>
ATGL	<i>adipose triglyceride lipase</i>
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CCR	<i>chemokine cc motif receptor</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
CM	Chylomikron
CR	<i>Chylomikron Remnant</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CVD	<i>cardiovascular disease</i>

---

DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBD	DNA-Bindungs-Domäne
DGAT	Diglycerid Acyltransferase
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	desoxy-Nucleosid-Triphosphat
15dPGJ <sub>2</sub>	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J <sub>2</sub>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
FATP1	<i>fatty acid transport protein 1</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FS	Fettsäure
G3P	Glycerol-3-Phosphat
GLUT	Glucose-Transporter
GPAT	Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase
GPCR	G-protein coupled receptor
GPS	<i>G-protein-pathway suppressor</i>
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
hMSC-Tert	<i>human mesenchymal stem cell line, telomerase-immortalised</i>
HRE	<i>hormone responsive element</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSL	<i>hormon-sensitive lipase</i>
IBMX	Isobutylmethylxanthin
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
IKK $\beta$	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B-kinase <math>\beta</math></i>

---

IL-6	Interleukin-6
IRS	<i>insulin-receptor substrat</i>
Jak	Janus-Kinase
JNK	c-Jun-N-terminal kinase
kDa	kilo-Dalton
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
Lep	Leptin
LpL	Lipoprotein-Lipase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte-chemotactic protein-1</i>
MCR	Melanocortin Rezeptor
MGL	<i>monoglyceride lipase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCoR	<i>nuclear-receptor co-repressor</i>
NEFAS	<i>non esterified fatty acids</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NR	<i>nuclear receptor</i>
ob	<i>obesity</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	para-Formaldehyd
PGC1	<i>PPAR<math>\gamma</math> coactivator 1</i>
PGS	PBS-Glycin-Saponin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PK	Proteinkinase

---

PPAR <sub>γ</sub>	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PPRE	<i>PPAR responsive element</i>
PPD	<i>p-Phenylendiamin</i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
RNA	<i>Ribonucleinsäure</i>
RT	<i>a, Raumtemperatur b, reverse Transkriptase</i>
RXR	<i>Retinoid-X-Rezeptor</i>
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid- and thyroid-hormone receptors</i>
SOCS	<i>suppressors of cytokine signaling</i>
SREBP1c	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TAG	<i>Triacylglycerol</i>
TBL	<i>transducin-β-like protein</i>
TBLR	<i>transducin-β-like-related protein</i>
TBP	<i>TATA Box binding protein</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF <sub>α</sub>	<i>Tumor-Nekrose-Faktor α</i>
TRAP	<i>thyroid receptor associated protein</i>
TZD	<i>Thiazolidindione</i>
u. a.	<i>unter anderem</i>
UCP-1	<i>uncoupling protein 1</i>
v. a.	<i>vor allem</i>
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
WAT	<i>white adipose tissue</i>
ZNS	<i>zentrales Nervensystem</i>

## 7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der Lipogenese und Lipolyse im Adipozyten.....	6
Abb. 1.2	Wichtige Transkriptionsfaktoren der Adipogenese.....	12
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des humanen PPAR $\gamma$ 1 Gens (PPARG)	17
Abb. 1.4	Wirkmechanismen PPAR $\gamma$ s.....	20
Abb. 1.5	Liganden-vermittelte Transrepression PPAR $\gamma$ s.....	23
Abb. 2.1	72-stündige Differenzierung von hMSC-TERT.....	28
Abb. 2.2	9-tägige Differenzierung von hMSC-TERT.....	29
Abb. 2.3	Darstellung von PPAR $\gamma$ 2 und PPAR $\gamma$ 1 in 3T3-L1 Fibroblasten mithilfe des Primärantikörpers 81B8 (Cell Signalling) im Western Blot.....	37
Abb. 2.4	Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz nach der Duolink-Methode.....	40
Abb. 3.1	Schematische Darstellung des humanen PPAR $\gamma$ 2 (PPARG) Gens als Aminosäurenabfolge.....	44
Abb. 3.2	Gelelektrophorese von restringierter PPAR $\gamma$ 2-Plasmid-DNA.....	46
Abb. 3.3	Überexpression von PPAR $\gamma$ in PPAR $\gamma$ 2-transfizierten hMSC-TERT..	47
Abb. 3.4	Western Blot. Nachweis des transient transfizierten PPAR $\gamma$ 2 und dessen Mutanten in hMSC-TERT (A) und HEK 293T (B).....	48
Abb. 3.5	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Nachweis des PPAR $\gamma$ 2 Wildtyps und der Mutante $\Delta$ 3 nach transients Transfektion in nicht-differenzierten hMSC-TERT.....	50
Abb.3.6a	Immunfluoreszenzfärbung. Nachweis der PPAR $\gamma$ 2 Mutanten S1, S2, S1/2, nach transients Transfektion nicht-differenzierter hMSC-TERT.....	51
Abb.3.6b	Immunfluoreszenzfärbung. Nachweis der PPAR $\gamma$ 2 Mutanten $\Delta$ P, PDSM nach transients Transfektion nicht-differenzierter hMSC-TERT.....	52

---

Abb. 3.7	Western Blot. HEK 293T Zellen, transfiziert mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp (WT) und der Mutante PPAR $\gamma$ 2 $\Delta$ 3, stimuliert mit Rosiglitazon für 2 (A) bzw. 24 (B) Stunden.....	54
Abb. 3.8	PPAR $\gamma$ 1 Bande in der eGFP Kontrolle .....	55
Abb. 3.9	Western Blot. Nicht-differenzierte hMSC-TERT, transfiziert mit PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp (WT) und PPAR $\gamma$ 2 $\Delta$ 3, stimuliert mit Rosiglitazon für 2 bzw. 24 Stunden (h ).....	56
Abb. 3.10	Duolink-Immunfluoreszenzfärbung (Olink). Darstellung der SUMOylierung des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$ 2 (Wildtyp) in transient transfizierten nicht-differenzierten hMSC-TERT.....	57
Abb. 3.11	Duolink-Immunfluoreszenzfärbung (Olink). Darstellung der SUMOylierung der PPAR $\gamma$ 2 Mutante $\Delta$ 3 in transient transfizierten nicht-differenzierten hMSC-TERT.....	58
Abb. 3.12	Duolink-Immunfluoreszenzfärbung (Olink) eGFP- transfizierter, nicht-differenzierter hMSC-TERT zur Kontrolle.....	59
Abb. 3.13	Expression der Adipozytenmarker Adiponektin und FABP4 in PPAR $\gamma$ 2-transfizierten hMSC-TERT-Zellen 48 Stunden differenziert	62
Abb. 3.14	Expression der Adipozytenmarker Adiponektin (ADIPOQ) und FABP4 in PPAR $\gamma$ 2-transfizierten hMSC-TERT-Zellen 72 Stunden differenziert.....	64
Abb. 3.15	Expression der Adipozytenmarker Adiponektin (ADIPOQ) und FABP4 in PPAR $\gamma$ -transfizierten hMSC-TERT-Adipozyten unter Stimulation mit Rosiglitazon bzw. GW9662.....	66
Abb. 3.16a	Expression von PPAR $\gamma$ und FABP4 in PPAR $\gamma$ -transfizierten hMSC-TERT-Adipozyten nach Stimulation mit LPS bzw. TNF- $\alpha$ .....	68
Abb. 3.16b	Expression von MCP-1 und IL6 in PPAR $\gamma$ -transfizierten hMSC-TERT-„Adipozyten“ nach Stimulation mit LPS bzw. TNF- $\alpha$ .....	69
Abb. 4.1	Relevante Faktoren der Adipogenese.....	81
Abb. 4.2	Repression von MCP-1 und IL-6 durch PPAR $\gamma$ 2 im adipozytären Zellmodell hMSC-TERT	87

---

Tab. 1	Im Western Blot verwendete Antikörper.....	37
Tab. 2	In der indirekten Immunfluoreszenz (IMF) verwendete Antikörper...	39
Tab. 3	TaqMan <i>real time</i> PCR Sonden.....	42
Tab. 4	PPAR $\gamma$ Mutanten mit Erläuterung des jeweiligen Merkmals.....	45

### 7.3 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel dafür, dass ich meine Promotion am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie durchführen durfte.

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jörg Heeren und Dr. Alexander Bartelt für die großartige Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für ihre Hilfsbereitschaft und und guten Tipps im Labor möchte ich Leah Eissing, Sandra Ehret, Birgit Henkel, Dorte Wendt, Ditte Siemesgelüss und Walter Tauscher ausdrücklich danken.

Dem ganzen Team danke ich für die lehrreiche und nicht zuletzt heitere Zeit am Institut.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder Kai und meiner Freundin Jana für ihre liebevolle Unterstützung danken.

## 7.4 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

---

## 7.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....

Tillman Walk