

Die Rolle von Progranulin in entzündlichen Prozessen des Fettgewebes

**Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Kreiß, Anja Franziska
aus Wolfenbüttel**

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter/in: Professor Dr. med. Andreas Schäffler
2. Gutachter/in: PD Dr. rer. nat. Elena Neumann

Tag der Disputation: 21. April 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Vorbemerkung:.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Adipositas	1
1.2 Das Fettgewebe.....	3
1.2.1 Vorkommen, Einteilung und Funktion des Fettgewebes.....	3
1.2.2 Allgemeine Histologie der Fettzelle und des Fettgewebes	5
1.2.3 Entwicklung der Adipozyten	5
1.3 Das Fettgewebe als endokrines und immunologisches Organ	6
1.3.1 Endokrinologische Funktion des Fettgewebes.....	6
1.3.2 Progranulin (PGRN)	8
1.3.3 C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3)	10
1.4 Zielsetzung und Hypothesen der vorliegenden Arbeit	12
2. Materialien	15
2.1 Geräte.....	15
2.2 Verbrauchsmaterial.....	16
2.3 Chemikalien (Stimulanzien)	17
2.4 Kit-Systeme	19
2.5 Zelllinie.....	19
2.6 Medien und Lösungen für die Zelllinie 3T3-L1	19
2.7 Puffer und Lösungen	20
2.8 Enzyme	23
2.9 Verwendete Primer	23
2.10 Murine Serum- und Fettgewebsproben	24
3. Methoden.....	26
3.1 Zell-Kultur	26

3.1.1 Kultivierung der murinen 3T3-L1 Zelllinie	26
3.1.2 Hormonelle Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie	26
3.1.3 Oil Red O Färbung	28
3.1.4 Stimulation der 3T3-L1 Zellen	29
3.2 Arbeiten mit RNA	31
3.2.1 RNA Isolierung aus 3T3-L1-Zellen.....	31
3.2.2 RNA Isolierung aus murinem Fettgewebe.....	31
3.2.3 Isolation von Adipozyten und Stromal-vaskulären Zellen und deren RNA aus murinem Fettgewebe.....	32
3.2.4 Konzentrationsbestimmung von RNA	33
3.2.5 Reverse Transkription (RT)	34
3.2.6 Quantitative Real-Time PCR	35
3.3 Arbeiten mit DNA	36
3.3.1 Isolierung von muriner DNA	36
3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
3.3.3 Agarosegelelektrophorese.....	38
3.4 Arbeiten mit Protein	39
3.4.1 Gewinnung von Zellprotein aus 3T3-L1-Zellen	39
3.4.2 LDH-Messung (Laktat-Dehydrogenase-Messung).....	39
3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA.....	40
3.4.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	40
3.5 Arbeiten mit Tieren	41
3.6 Statistische Auswertung	42
4. Ergebnisse	44
4.1. Basale PGRN Genexpression im Fettgewebe	44
4.1.1 Ergebnisse der basalen PGRN Genexpression während der Differenzierung der 3T3-L1 Adipozyten.....	44

4.1.2 PGRN Genexpression in primären Zellen der SCF und Adipozyten im Vergleich zwischen VAT (epididymal) und SAT	46
4.2. Einfluss von metabolischen und inflammatorischen Stimuli auf die PGRN Genexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten	48
4.2.1 Einfluss metabolischer Stimuli auf die PGRN Genexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten	48
4.2.2 Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die PGRN Genexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten.....	51
4.3 PGRN Expression in vivo.....	55
4.3.1 PGRN Genexpression und systemische Level in CTRP3-Knockout Mäusen und Wildtypen.....	55
4.3.2 PGRN Genexpression und systemische Level in CTRP-3/-LDL-Rezeptor Knockout-Mäusen.....	63
4.4 Immunmodulierende Effekte von PGRN	67
4.4.1 Einfluss von PGRN auf die TNF α -induzierte MCP-1-Genexpression	67
4.4.2 Einfluss von CTRP-3 auf die Poly(I:C)-induzierte PGRN-Expression.....	70
4.4.3 Einfluss von CAMP auf die ODN1585-induzierte PGRN-Expression	73
5. Diskussion	74
5.1 Allgemeine Diskussion.....	74
5.2 Spezielle Diskussion.....	76
6. Zusammenfassung	87
Summary	89
7. Abbildungsverzeichnis	91
8. Tabellenverzeichnis.....	94
9. Literaturverzeichnis.....	95

Abkürzungsverzeichnis

AT	Fettgewebe
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Braunes Fettgewebe
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
CA	Cholsäure
CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide
Cq	Cycle of quantification
CRP	C-reaktives Protein
CTRP-3	C1q/TNF-related protein-3
CTRPs	C1q Tumornekrose Factor-Related Proteine
DCA	Deoxycholsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GARD	Gardiquimod
GIP	Glucose dependent insulinotropic peptide
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	Glukagon-like peptide
HFD	Hochfettdiät
IL-6	Interleukin 6
IMQ	Imiquimod
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
P/S	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PCDGF	proepithelin-cell derived growth factor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGRN	Progranulin
PI	Protease-Inhibitor
Poly(I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PPI	Phosphatase/Protease-Inhibitor

PRR	Pattern Recognition Rezeptoren
RT	Reverse Transkription
SAT	Subkutanes Fettgewebe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SVF	Stromal-vaskuläre Fraktion
TAT	Thorakales Fettgewebe
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrose Faktor α
UCP	Uncoupling Protein
UDCA	Ursodeoxycholsäure
VAT	Viszerales Fettgewebe
WAT	Weißes Fettgewebe

Vorbemerkung:

Wichtige Teile dieser Arbeit sind mit der Verfasserin als Co-Autorin publiziert worden. Die Daten und Grafen, die veröffentlicht sind, wurden mit folgendem Hinweis markiert: Publiziert (Schmid et al., Cytokine 2020)

Die Daten wurden im folgenden Paper publiziert:

Schmid, Andreas; Hochberg, Alexandra; Kreiß, Anja Franziska; Gehl, Jonas; Patz, Marissa; Thomalla, Miriam et al. (2019a): Role of progranulin in adipose tissue innate immunity. In: *Cytokine* 125, S. 154796. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154796

1. Einleitung

1.1 Adipositas

Immer mehr Menschen der Gesellschaft sind übergewichtig und/oder leiden an Adipositas. Dies zeigt zum Beispiel eine Studie des Center for Disease Control and Prevention von 2016, wonach mehr als 40% der Bevölkerung in den USA übergewichtig sind (Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL 2017). In Europa sieht die Situation ähnlich aus. Laut WHO sind in Europa schätzungsweise mehr als 50% der Bevölkerung übergewichtig und fast die Hälfte davon (20-23%) leiden an Adipositas (World Health Organization, Regional Office for Europe 2013). Übergewicht wird definiert ab einem Body-Mass-Index (BMI) von 25 kg/m^2 und Adipositas ab einem BMI von 30 kg/m^2 . Der BMI wird hierbei berechnet aus dem Körpergewicht geteilt durch die Körpergröße in Meter zum Quadrat. Zur weiteren Differenzierung wird die Adipositas in verschiedene Grade eingeteilt. Grad I der Adipositas beginnt ab einem BMI von 30 kg/m^2 , der Grad II ab einem BMI von 35 kg/m^2 und ab einem BMI von 40 kg/m^2 spricht man von einem Grad III der Adipositas (Bischoff und Holl 2017).

Die Genese der Adipositas ist polygenetisch und multifaktoriell. Generell liegt eine positive Energiebilanz vor, die durch eine zu hohe Energiezufuhr (durch Nahrung) bei zu niedrigem Verbrauch (z.B. durch körperliche Aktivität) zustande kommt. Diese positive Differenz wird in Form von Triglyzeriden vom Körper im Fettgewebe gespeichert. Allerdings existieren große individuelle Unterschiede in der Gewichtszunahme, da die Energiebilanz durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Zum einen spielt die genetische Anlage eine entscheidende Rolle, zum anderen Umweltfaktoren wie Nahrungs- und Bewegungsgewohnheiten und sozioökonomische Faktoren. Aber auch bestimmte Medikamente wie Antidepressiva, Antipsychotika, Antihypertensiva oder Kontrazeptiva können als Nebenwirkung einen Gewichtsanstieg zur Folge haben. Nicht zuletzt ist die Adipositas auch häufig Folge von psychischen Erkrankungen wie dem *Binge Eating* oder dem *Night Eating Syndrom*, auch Depressionen können zu einem veränderten Essverhalten und so zu Übergewicht führen (Bischoff et al. 2017b).

Genauso vielseitig wie die Ursachen von Übergewicht sind auch seine Folgen. Es kommt zu Veränderungen des Gastrointestinaltraktes (GI-Trakt) durch einen verlängerten Darm, vermehrte Enterozyten und eine erhöhte intestinale Permeabilität. Dies führt zu einer veränderten Nahrungsaufnahme und durch die geänderte Permeabilität zu einer erhöhten

Aufnahme von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), die über die Pfortader zur Leber gelangen und dort eine Entzündung auslösen. Ebenfalls kann es in der Leber durch Fettablagerungen zu einer sogenannten Leberverfettung (Steatosis hepatis) kommen, die dann im weiteren Verlauf in eine Leberentzündung (NASH) münden kann mit einem erhöhten Risiko für Leberfibrose und hepatozelluläres Karzinom (Bischoff und Bischoff 2017b; Jacob et al. 2017). Insgesamt kommt es bei adipösen Menschen durch die erhöhte metabolische Belastung zu einem subklinischen Entzündungszustand im Körper, der zu verschiedenen metabolischen Folgeerkrankungen führt. Besonders entscheidend ist die Entstehung der Insulinresistenz und somit des Typ 2 Diabetes, da die chronische Hyperglykämie zu zahlreichen schwerwiegenden Folgeerkrankungen führen kann. Darunter zählen die Makroangiopathie mit einem Risiko für koronare Herzerkrankungen, zerebrovaskuläre Insulte und periphere Verschlusskrankheiten, aber auch die Mikroangiopathie mit der diabetischen Retinopathie und Nephropathie, die bei schlecht eingestellten Diabetikern zu Niereninsuffizienz führt (Hien und Böhm 2005). Zusätzlich kann es durch den subklinischen Entzündungszustand bei Adipositas zu einer Fettstoffwechselstörung kommen, die gekennzeichnet ist durch erhöhte Triglyzerid-Werte im Blut bei gleichzeitig erniedrigten HDL (High-density Lipoprotein)-Werten. Das derart veränderte Profil an erhöhten Blutfetten trägt zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose bei. Alles in allem kann es bei Adipositas so zu der Ausprägung eines Metabolischen Syndroms kommen. Das Metabolische Syndrom bezeichnet das Zusammenkommen und -wirken mehrerer Erkrankungen und Risikofaktoren. Darunter zählen starkes Übergewicht, Bluthochdruck, Insulinresistenz oder Typ 2 Diabetes mellitus und ein gestörter Fettstoffwechsel (Bischoff et al. 2017a; Jacob et al. 2017). (Latorre et al. 2018)

Aber nicht nur der GI-Trakt oder die Leber zeigen Veränderungen und spielen eine Rolle bei den genannten Folgeerkrankungen, sondern im besonderen Maße auch das Fettgewebe. Hierfür ist nicht allein die bloße Zunahme des Gesamtfetts bei Übergewicht entscheidend, sondern auch seine Verteilung im Körper. Besonders eine Vermehrung des viszeralen Fettgewebes ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden (Ferreira und Santos 2015). Dazu trägt beispielsweise das epikardiale Fettgewebe bei, welches durch vermehrte Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und dem direkten Kontakt zu den Vorhöfen möglicherweise sowohl an arrhythmischen Störungen als auch endothelialen Dysfunktionen, die für ein erhöhtes Herzinfarkt-Risiko sorgen, beteiligt ist (Ferreira und Santos 2015). Dazu passend gibt es auch „gesunde Dicke“,

die trotz Übergewicht nicht an den genannten Folgeerscheinungen leiden, da sie eine andere Verteilung des Fettgewebes zugunsten des subkutanen Fettgewebes aufweisen (Schulze 2019). Als Maß für den Anteil des viszeralen Fettgewebes wird zusätzlich zum BMI der Bauchumfang, zwischen unterem Rippenbogen und oberem Beckenrand gemessen, bestimmt, in Studien wird der Anteil des viszeralen Fettgewebes mit Hilfe des MRT bestimmt. Durch Synthese und Sekretion sogenannter Adipokine beteiligt sich das Fettgewebe insbesondere am Fett- und Glukosestoffwechsel und an Entzündungsprozessen. Adipokine sind Hormone und Zytokine, die vom Fettgewebe sezerniert werden, die bekanntesten von ihnen sind Leptin und Adiponektin (Ouchi et al. 2011) (Smitka und Marešová 2015). Bei Adipositas kommt es zu Veränderungen in der Synthese und Sekretion verschiedener Adipokine, wodurch das Fettgewebe etwa an der Entstehung von Insulinresistenzen und Hypertonie mitwirkt (Bischoff und Bischoff 2017a; Hotamisligil 2017). Beobachtet wurde eine Einwanderung von Makrophagen und anderen Immunzellen in das Fettgewebe bei Übergewicht, was zu einem Zustand chronischer Entzündung (low grade inflammation) führt. Zusätzlich kommt es zu einer veränderten Stoffwechsellage und zusammen mit der Entzündung entstehen unter anderem Auswirkungen auf den Glucose-Stoffwechsel und somit auf die Entstehung von Insulinresistenz. Dieses Zusammenspiel von Immunreaktion (Entzündung) und Stoffwechselveränderungen bei Adipositas wird auch als Metaflammation bezeichnet. Diese Metaflammation verstärkt wiederum die Entzündung im Fettgewebe (Adipoflammation), was zu einer verstärkten Wirkung und Sekretion proinflammatorischer Moleküle im Fettgewebe führt, und zeigt, dass die Adipoflammation bei Adipositas vom Metabolismus und dem Immunsystem bedingt wird und auch gleichzeitig Auswirkung auf beides hat (Hotamisligil 2017).

Da das Fettgewebe generell einen bedeutenden endokrinen Mediator in metabolischen und immunologischen Prozessen darstellt, kommt der Erforschung seiner Beteiligung an Adipositas und den damit einhergehenden Erkrankungen eine wichtige Rolle zu. Im Folgenden soll daher das Fettgewebe genauer dargestellt werden.

1.2 Das Fettgewebe

1.2.1 Vorkommen, Einteilung und Funktion des Fettgewebes

Das Fettgewebe lässt sich auf Grund seiner Funktion und Zellmorphologie unterteilen in weißes, braunes und beiges Fettgewebe. Das braune Fettgewebe (BAT) hat einen sehr

hohen Stoffumsatz, ist stark vaskularisiert und innerviert und beteiligt sich über Thermogenese an der Regulation der Körpertemperatur (Alcalá et al. 2019). Zu diesem Zweck besitzen die Adipozyten des BAT viele Mitochondrien und sogenannte *uncoupling proteins (UCPs)*, welche die mitochondriale Fettsäureoxidation von der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese entkoppeln (Srivastava und Veech 2019). Das BAT kommt hauptsächlich bei Neugeborenen vor, nimmt bereits in den ersten sechs Lebensmonaten stark ab und ist beim Erwachsenen nur noch in geringer Menge erhalten (Alcalá et al. 2019). Den deutlich größeren Anteil am Fettgewebe bildet das sogenannte weiße Fettgewebe (WAT). Es speichert Energie in Form von Triglyzeriden und sorgt für Wärmeisolation und einen Schutz vor mechanischer Belastung durch eine Art Polsterfunktion (Luong et al. 2019). Es produziert aber auch eine Vielzahl an bioaktiven Peptiden, die als Adipo(zyto)kine bezeichnet werden, mit denen sich das Fettgewebe an verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, wie dem Glukose- und Fettstoffwechsel, aber auch an unterschiedlichen Entzündungsreaktionen beteiligt (Smitka und Marešová 2015). In jüngerer Vergangenheit wurden auch so genannte beige Adipozyten im WAT entdeckt, welche wie die Zellen des BAT vermehrt Mitochondrien und UCPs besitzen. Es handelt sich hierbei möglicherweise um eine Trans- oder Re-Differenzierung von weißen Adipozyten zu einer Art brauner Adipozyten (WAT browning) (Enerbäck 2013) (Srivastava und Veech 2019). Je nach Lokalisation des weißen Fettgewebes unterscheidet man zwischen viszeralem (VAT) und subkutanem (SAT) Fettgewebe. Zum VAT gehören beispielsweise das Fettgewebe um das Herz (perikardial) und das intraabdominelle Fettgewebe um die Bauchorgane (z.B. mesenterisch, omental, perirenal), wohingegen das SAT unter der Subkutis lokalisiert ist und so in enger funktioneller Verbindung mit der Haut steht (Luong et al. 2019).

Das Fettgewebe ist sehr heterogen aufgebaut und besteht neben reifen Adipozyten auch aus einer Vielzahl von anderen Zellen, die zusammenfassend als stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) bezeichnet werden. Darunter zählen endotheliale Zellen, Nervenzellen, immunkompetente Zellen (Monozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, eosinophile und neutrophile Zellen), aber auch Fibroblasten, Myozyten, mesenchymale Stammzellen und unausgereifte Adipozyten (Präadipozyten) (Smitka und Marešová 2015).

1.2.2 Allgemeine Histologie der Fettzelle und des Fettgewebes

Die Adipozyten des weißen Fettgewebes können bis zu 100µm groß sein und sind dominiert durch eine große Vakuole (univakuolär). Diese drängt mit zunehmender Größe das Zytoplasma mit den darin enthaltenen Zellorganellen an den Rand des Zellraums, darunter auch den Zellkern, wodurch eine charakteristische „Siegelringform“ entsteht. Die große Vakuole ist ein Lipidtropfen, der Triglyzeride enthält und durch eine monomolekulare Phospholipidschicht begrenzt wird (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Im interstiellen Bindegewebe können Fettzellen vereinzelt auftauchen. Im eigentlichen Fettgewebe sind die Zellen durch retikuläre und kollagene Fasern zusammengefasst, die wiederum durch Bindegewebssepten in Läppchen organisiert werden, zwischen denen Blutgefäße und Nerven verlaufen. Bei der Lipogenese synthetisiert die Zelle Triacylglycerole und speichert diese, während bei der Lipolyse die Lipide intrazellulär durch zytosolische Lipasen gespalten werden und über das Blut von anderen Organen wie der Leber oder von Muskeln aufgenommen werden (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Die Adipozyten des braunen Fettgewebes sind im Vergleich zu den weißen Adipozyten etwas kleiner und enthalten viele kleine Lipidtröpfchen (plurivakuolär). Die braune Farbe kommt durch den hohen Gehalt an Mitochondrien zustande, die nicht der ATP-Synthese dienen, sondern mithilfe des UCP-1 der Thermogenese (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

Da in dieser Arbeit murine Fettgewebe untersucht wurden, soll hier kurz erwähnt werden, dass der Aufbau des murinen weißen und braunen Fettgewebes dem des humanen Fettgewebes weitestgehend entspricht. Die Zellen des murinen weißen Fettgewebes können jedoch auch plurivakuolär sein (Scudamore 2014).

1.2.3 Entwicklung der Adipozyten

Adipozyten entstehen aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen. Diese entwickeln sich weiter zu sogenannten Adipoblasten, welche unter Beteiligung des Tumor-suppressorgens Rb, des Transkriptionsfaktors E2F und Cyclin-abhängiger Kinasen sowie vermittels Zell-Zell-Kontakt zu Präadipozyten erster Ordnung werden. In diesen findet die Genexpression der frühen Marker ($\alpha 2\text{Col}6$, LPL, IGF-1, KROX-20, KLF4, CREB) der adipozytären Differenzierung statt. Nach mehreren Phasen der Zellteilung kommt es bei den

entstandenen Präadipozyten zweiter Ordnung zu einem Wachstumsstopp. Die Präadipozyten zweiter Ordnung produzieren mittlere Marker wie C/EBP β/δ , ADD1/SREBP, PPAR γ_2 und KLF-5. Durch die Transkription dieser Marker kommt es zur Entwicklung der unreifen Adipozyten, welche Lipide zu akkumulieren und die späten Marker (C/EBP α , Glut-4, Perilipin, lipogene Enzyme, lipolytische Enzyme) zu exprimieren beginnen. Zuletzt entstehen aus diesen die reifen Adipozyten, die charakterisiert sind durch die Transkription der sehr späten Marker wie Leptin, Adiponektin, Resistin, Adipsin, Visfatin und Omentin (Schäffler et al. 2006). Sogenannte beige Adipozyten entstehen durch Transdifferenzierungsprozesse aus weißen Adipozyten (browning). Induziert werden kann dieser Vorgang durch dauerhafte Exposition gegenüber erniedrigten Temperaturen (Barbatelli et al. 2010). Diskutiert werden zudem endokrine Stimuli, wie zum Beispiel Schilddrüsenhormone, Progesteron und FGF21 (Srivastava und Veech 2019).

1.3 Das Fettgewebe als endokrines und immunologisches Organ

1.3.1 Endokrinologische Funktion des Fettgewebes

Wie oben bereits erwähnt fungiert das Fettgewebe nicht nur als Fettspeicher, sondern produziert auch eine Vielzahl an Hormonen. Diese werden als Adipokine bezeichnet und können sowohl autokrin und parakrin als auch endokrin wirken. Das Fettgewebe beteiligt sich so an vielen verschiedenen Prozessen im Körper, wie der Regulation der Nahrungsaufnahme, der Regulation von Stoffwechselwegen wie dem Glukose- und Fettstoffwechsel, Insulinsensitivität, Entzündungsprozessen und der Adipogenese (Smitka und Marešová 2015). Insgesamt stellt das Fettgewebe auf Grund dieser Funktion die größte endokrine Drüse im menschlichen Körper dar. Zusätzlich zeigen einige Adipokine auch Auswirkungen auf die Neurodegeneration, Zellwachstum und Apoptose, oder sind beteiligt an der Entstehung von Adipositas, Insulinresistenzen und kardiovaskulären Erkrankungen. Dazu produziert das Fettgewebe immunmodulierende Hormone wie die prominenten Vertreter Leptin, Resistin und Adiponektin und auch Zytokine wie Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrose Faktor α (TNF α), Progranulin (PGRN) und C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) (Smitka und Marešová 2015). Im Folgenden sollen einige dieser Adipokine und Zytokine kurz vorgestellt werden.

Eines der bekanntesten und als erste beschriebenen Hormone, die von Fettzellen produziert werden, ist Leptin. Leptin wurde 1994 entdeckt und bindet im Hypothalamus im Nucleus arcuatus und im Nucleus paraventricularis an seinen Rezeptor (Trayhurn und Beattie 2001). Leptin trägt zu einer Hemmung der Nahrungsaufnahme bei, indem es die Synthese und Freisetzung vom Neuropeptid Y inhibiert, und ist somit Teil der Regulierung des Energiehaushaltes des Körpers. Zusätzlich ist Leptin auch beteiligt an der Angiogenese und der sexuellen Reifung bei Frauen und spielt eine Rolle im Immunsystem (Trayhurn und Beattie 2001).

Adiponektin ist an der Regulation des Metabolismus beteiligt, inhibiert die Gluconeogenese in der Leber und fördert die Insulinsensitivität. Dazu wirkt es in sehr vielen verschiedenen Zielgeweben, wie zum Beispiel der Leber, dem Pankreas und Muskelzellen. Ebenso wirkt Adiponektin entzündungshemmend und anti-apoptotisch (Wang und Scherer 2016).

Im Gegensatz dazu stellt Resistin ein eher proinflammatorisches Adipokin dar und ist wahrscheinlich beteiligt an der Entstehung von Insulinresistenz und Adipositas-induzierter Inflammation (Benomar und Taouis 2019). Es wird auch von Präadipozyten während der Adipogenese produziert und hohe Resistin Plasmaspiegel wurden bei kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose beschrieben (Smitka und Marešová 2015).

IL-6 und TNF α stellen zwei hauptsächlich proinflammatorische Zytokine dar, die neben anderen Geweben auch vom Fettgewebe produziert werden. Sie sind involviert in die Entstehung von Insulinresistenz und rheumatischen Erkrankungen (Elena Nikiphorou and George E. Fragoulis). Zusätzlich wird auch ihre Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen, wie dem kolorektalen Karzinom, diskutiert (Kern et al. 2018). Beide Parameter werden im Fettgewebe zum größten Teil von den Zellen der SVF produziert und sind bei Übergewicht und Adipositas erhöht (Smitka und Marešová 2015).

Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1, alternativ als CCL2 bezeichnet) ist ebenfalls ein proinflammatorischer Botenstoff, der für eine Einwanderung von Monozyten in das Fettgewebe und eine Aktivierung von proinflammatorischen Makrophagen sorgt (Shimobayashi et al. 2018). Ähnlich wie MCP-1 stellt auch Rantes (auch CCL5 genannt) ein chemotaktisch wirkendes Zytokin dar. Es sorgt für eine Rekrutierung von Leukozyten, wie T-Lymphozyten, Makrophagen, Eosinophilen und Basophilen, in entzündetes

Gewebe, und führt zu einer Aktivierung und Proliferation von natürlichen Killerzellen (Aldinucci und Casagrande 2018).

1.3.2 Progranulin (PGRN)

PGRN (auch proepithelin-cell derived growth factor (PCDGF)) ist ein rund 88 kDa großes Glykoprotein und besteht aus sieben bis acht kleinen Peptiden, die jeweils ungefähr 6 kDa groß sind und als Granuline bezeichnet werden. PGRN gehört zu der Familie der Wachstumsfaktoren und ist gekennzeichnet durch ein Cystein-reiches Motiv von 12 Cysteinen (Serrero 2003). PGRN ist beteiligt am Zellzyklus, der Angiogenese und der Wundheilung, und auch Auswirkungen bei der Entstehung von bestimmten Tumorerkrankungen werden diskutiert (Arechavaleta-Velasco et al. 2017). Ein durch Mutationen bedingter Funktionsverlust von PGRN ist beteiligt an der Entstehung der frontotemporalen Demenz, weshalb besonders die Rolle von PGRN bei neurodegenerativen Erkrankungen in vielen Studien untersucht wird (Mendsaikhan et al. 2019). PGRN wird auch im Hypothalamus gebildet und ist dort vermutlich an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes beteiligt (Kim et al. 2011). Kim et al. haben gezeigt, dass ein Injizieren von PGRN in den Hypothalamus die Nahrungsaufnahme und die Gewichtszunahme bei Mäusen verringert und dass die PGRN-Konzentration im Hypothalamus je nach Energiezustand variiert. So wird im Zustand geringerer Energie weniger PGRN produziert und bei erhöhter Energiezufuhr mehr (Kim et al. 2011). PGRN ist sowohl im Serum als auch im Liquor des Menschen zu finden (Berghoff et al. 2016). Dies liegt unter anderem daran, dass PGRN von einer Vielzahl von Zelltypen und Geweben produziert wird. Dazu gehören zum Beispiel endotheliale und epitheliale Zellen, Immunzellen, Mikroglia und Neurone, auch Gewebe wie die Niere, die Milz und das Fettgewebe produzieren PGRN. Die Regulation der PGRN-Genexpression und -Sekretion ist noch nicht komplett geklärt. Jedoch gibt es einige Substanzen, die Auswirkungen auf die Regulation von PGRN zeigen. Vitamin A soll die Genexpression von PGRN in Mikroglia erhöhen, Estradiol die Expression in Brustkrebszellen und Östrogen diejenige im Hypothalamus (Mendsaikhan et al. 2019). Auch IL-6 induziert die PGRN-Synthese (Mendsaikhan et al. 2019). Ein für PGRN spezifischer Rezeptor ist noch nicht bekannt, jedoch bindet PGRN an bestimmte TNF α -Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) und wirkt dadurch als kompetitiver Inhibitor von TNF α (Tang et al. 2011). In diesem Kontext besitzt PGRN antiinflammatorische Eigenschaften. Eine Studie von Yin et al. hat passend dazu gezeigt, dass in PGRN-defizienten Mäusen

Makrophagen vermehrt proinflammatorische Zytokine produzieren und weniger antiinflammatorisches IL-10 (Yin et al. 2010). Zusätzlich konnte sich eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* schneller in der PGRN-defizienten Maus als in Kontrolltieren ausbreiten (Yin et al. 2010). Unter bestimmten Bedingungen wird PGRN durch Proteasen in seine Untereinheiten, die Granuline, aufgespalten. Im Gegensatz zu der Wirkung des Gesamtproteins weisen diese eher proinflammatorische Eigenschaften auf (Mendsaikhan et al. 2019). Eine Studie von Park et al. hat beispielsweise gezeigt, dass die Granuline als Co-Faktoren den CpG-ODN-induzierten TLR9-Signalweg und so die TNF α - und IL-6-Produktion in Makrophagen verstärken. Wie genau die Granuline an den CpG-ODNs und am TLR-9 wirken, ist bislang noch ungeklärt (Park et al. 2011).

Da PGRN u. a. vom Fettgewebe sezerniert wird, stellt es ein Adipokin dar. In einer Studie von Youn et al. von 2009 wurde gezeigt, dass PGRN im Serum von übergewichtigen Probanden erhöht ist, besonders bei Probanden mit erhöhtem Anteil an VAT, und positiv korreliert mit dem BMI ist. In derselben Studie wurde dabei gezeigt, dass PGRN in größerem Umfang vom VAT als vom SAT produziert wird. Zusätzlich ist das Serum-PGRN positiv korreliert mit der Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe, sowohl im VAT als auch im SAT (Youn et al. 2009). Dies zeigt, dass PGRN ebenfalls eine wichtige Rolle bei entzündlichen Reaktionen des Fettgewebes zu spielen scheint, was zu der Beobachtung passt, dass PGRN bei erhöhten CRP-Werten im Serum ansteigt (Berghoff et al. 2016). Da Adipositas häufig zu einem gestörten Fettstoffwechsel führt, ist ebenfalls von besonderem Interesse, dass PGRN positiv mit LDL-Werten im Blut korreliert (Berghoff et al. 2016). Somit sind sowohl metabolisch wirkende Eigenschaften von PGRN als auch die Beteiligung von PGRN an der Entstehung von Atherosklerose von Interesse. Auch ein Zusammenhang zwischen PGRN und Typ 2 Diabetes, welcher durch Übergewicht bedingt und mit Ernährungsumstellung, vermehrter körperlicher Aktivität und Gewichtsreduktion therapiert wird, wurde festgestellt. Dabei zeigen sich bei Personen die unter Diabetes leiden, höhere PGRN-Spiegel, als bei Nicht-Diabetikern, sowie positive Korrelationen zwischen PGRN und HbA1c sowie IL-6 (Qu et al. 2013). Besonders zu erwähnen ist hierbei die Studie von Matsubara et al., die einen kausalen Zusammenhang zwischen PGRN über IL-6 und der Hochfett-diät(HFD)-induzierten Insulinresistenz beschrieben hat (Matsubara et al. 2012). Hierbei zeigte sich, dass eine HFD bei Mäusen die PGRN-Expression im Blut und Fettgewebe steigerte und eine Applizierung von PGRN zu der Entstehung von Insulinresistenz führte. PGRN-defiziente Mäusen waren jedoch

vor HFD-induzierter Insulinresistenz geschützt und wiesen weniger adipozytäre Hypertrophien und eine gehemmte IL-6 Sekretion im Blut und Fettgewebe auf. Zuletzt wurde gezeigt, dass die durch appliziertes PGRN induzierte Insulinresistenz durch Neutralisation von IL-6 verringert werden konnte (Matsubara et al. 2012). Ebenfalls zeigt sich eine Erhöhung von PGRN bei Patienten mit Metabolischem Syndrom, besonders in dem Fall, wenn mehrere der Komponenten des Metabolischen Syndroms zusammenkommen (Yoo et al. 2013). Das Adipokin PGRN stellt somit einen wichtigen Modulator bei verschiedenen metabolischen Reaktionen und Entzündungsprozessen des Fettgewebes dar, dessen Rolle und Wirkmechanismen teilweise noch aufgeklärt werden müssen.

1.3.3 C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3)

CTRP-3 gehört zu der Familie der C1q/TNF-related proteins (CTRPs). Alle CTRPs sind in ihrem zueinander homologen Aufbau gekennzeichnet durch eine C-terminale, globuläre C1q-Domäne und eine N-terminale Kollagen-Domäne (Li et al. 2017). CTRPs bilden Trimere und Multimere (Li et al. 2016). CTRP-3 wird hauptsächlich im Fettgewebe produziert, zudem von anderen Geweben wie der Lunge oder der Niere. Es ist als Adipokin in verschiedene metabolische Prozesse involviert, schwächt Entzündungsreaktionen ab und fördert die Differenzierung und Proliferation von Zellen. Insgesamt ist CTRP-3 auf Grund seiner Eigenschaften als anti-inflammatorisch zu charakterisieren. Analog dazu ist CTRP-3 negativ assoziiert mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, TNF α und dem C-reaktiven Protein (CRP)(Li et al. 2017). In diätinduziert adipösen Mäusen ist ein Abfall der CTRP3-Werte bei Gewichtszunahme festzustellen (Li et al. 2017). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer anderen Studie, die einen negativen Zusammenhang zwischen CTRP-3 und dem Bauchumfang festgestellt hat (Yoo et al. 2013). Da besonders Entzündungsreaktionen im Zusammenhang mit Übergewicht einen wichtigen Punkt bei der Entstehung des Metabolischen Syndroms und seiner Folgeerkrankungen darstellen, kommt CTRP-3 als anti-inflammatorischem Adipokin eine besondere Rolle zu. Es wurde gezeigt, dass CTRP-3 die Bindung von LPS an den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) blockiert und so LPS-induzierte Entzündungsreaktionen unterdrücken kann. Durch diesen Mechanismus inhibiert CTRP-3 auch die Sekretion von TNF α und IL-6 aus Monozyten (Li et al. 2017). Zusätzlich hat man festgestellt, dass eine erhöhte Expression oder Gabe von CTRP-3 in Mäusen die Entstehung von Hochfettdiät-bedingter hepatischer Insulinresistenz und Leberverfettung abschwächen kann (Li et al. 2017).

Ebenfalls wurden in Mäusen mit Atherosklerose niedrigere CTRP-3-Level festgestellt, und eine Reduzierung der endothelialen Dysfunktion bei einer Überexpression von CTRP-3 in diesen Tieren. Da CTRP-3 die Zell-Proliferation und -Migration sowie die Zellantwort auf Inflammation in Endothelzellen reguliert, scheint CTRP-3 eine protektive Wirkung auf die Entstehung der Atherosklerose zu haben und eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung zu spielen (Chen et al. 2019).

1.4 Zielsetzung und Hypothesen der vorliegenden Arbeit

Bei Adipositas entsteht ein chronischer, lokaler und systemischer Entzündungszustand (=Metaflammation), der die Entstehung von Typ 2 Diabetes, Bluthochdruck, Kardiovaskuläre Erkrankungen und Tumorerkrankungen begünstigt. Ursächlich dafür ist zum großen Teil eine durch Übergewicht induzierte Veränderung des Fettgewebes. Dabei kommt es bei Übergewicht zu einer Hypertrophie der Fettzellen, zur Infiltration von Immunzellen wie Makrophagen in das Fettgewebe sowie zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Adipokinen (Ballak et al. 2015; Kern et al. 2018). PGRN stellt ein solches Adipokin dar, das bei Patienten mit Übergewicht und Typ 2 Diabetes vermehrt im Serum auftritt (Qu et al. 2013) und ebenfalls an der Entstehung von Hochfett-diät-induzierter Insulinresistenz beteiligt ist (Matsubara et al. 2012). Daher kommt PGRN im Kontext von Fettgewebe und Inflammation eine besondere Rolle zu.

Ziel dieser Arbeit war es, durch grundlagenbasierte Experimente zu untersuchen, unter welchen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen PGRN von Adipozyten exprimiert und reguliert wird.

Dazu wurden murine Zellen der Linie 3T3-L1 von Fibroblasten-ähnlichen Zellen zu reifen Adipozyten differenziert, die ein gut charakterisiertes und häufig verwendetes Zellmodell darstellen (Green und Kehinde 1975; Green und Meuth 1974), und entsprechend den Fragestellungen mit metabolischen und inflammatorischen Stimuli behandelt. Im Anschluss wurde aus den Adipozyten die RNA isoliert, um mit Hilfe der Reversen Transkription und der quantitativen Real-Time PCR die Auswirkungen der Stimulationen auf die PGRN-Genexpression zu analysieren.

Zur Sicherung der ersten Hypothese, dass PGRN ein Adipokin darstellt, das von Adipozyten produziert wird, wurde die PGRN-Genexpression in 3T3-L1 Zellen während der Adipozyten-Differenzierung sowie in primären stromal-vaskulären Zellen und Adipozyten aus murinem SAT und VAT gemessen.

Da PGRN bei Betrachtung seiner Funktion im Fettgewebe im Zusammenhang mit Insulinresistenz (Matsubara et al. 2012) und dem Metabolischen Syndrom (Yoo et al. 2013) beschrieben wird, wurde die zweite Hypothese aufgestellt, dass PGRN ein proinflammatorisches Adipokin ist. Zur Untersuchung wurden 3T3-L1 Adipozyten in einen entzündlichen Zustand versetzt, indem sie jeweils mit verschiedenen TLR-Agonisten für TLR-3, -5, -7 und -9 stimuliert wurden.

Da auch metabolische Veränderungen entzündlich auf Adipozyten wirken können (dritte Hypothese), wurden Zellen in weiteren Experimenten mit verschiedenen Gallensäuren und Inkretinen stimuliert.

Ebenfalls in Zellkulturversuchen wurde die vierte Hypothese, Veränderung der PGRN-Genexpression nach Co-Stimulationen mit verschiedenen Substanzen, untersucht. Damit sollten genauer die Fragestellungen beantwortet werden, ob CTRP-3 als antiinflammatorisches Adipokin die Poly(I:C)-induzierte PGRN-Genexpression in Adipozyten inhibieren kann, ob CAMP, ein Molekül, das nachweislich von Adipozyten zur Infektabwehr ausgeschüttet wird (Zhang et al. 2015), den inhibitorischen Effekt von ODN1585 auf PGRN verstärkt und, ob der TNF α inhibierende Effekt von PGRN (Tang et al. 2011) auch in Adipozyten gezeigt werden kann.

Außerdem sollte in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen PGRN und CTRP-3 erforscht werden. Dazu wurde PGRN im Serum mittels ELISA und mit Hilfe der Real-Time PCR seine Genexpression im SAT und gonadalen AT von 6 und 12 Monate alten Mäusen bestimmt, die mit Hilfe eines Adipozyten-spezifischen CTRP-3 Knockout genetisch verändert waren (vgl. 3.5). Durch DNA-Isolierung aus Ohrstanzen der Mäuse wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion und einer Agarosegelelektrophorese der Genotyp der Mäuse bestimmt, um die Mäuse in Kontroll- und Knockout-Tiere einzuteilen.

Da CTRP-3 als antiinflammatorisches Adipokin beschrieben wird (Li et al. 2017), wurde die Hypothese (5. Hypothese) aufgestellt, dass CTRP-3 inhibitorisch auf PGRN in Adipozyten wirkt und somit ein Knockout des CTRP-3 Gens zu einer vermehrten PGRN Produktion führt.

Zur Untersuchung eines potenziellen regulatorischen Zusammenhangs zwischen CTRP-3 und PGRN im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen, wurden zirkulierendes sowie lokal im WAT und TAT exprimiertes PGRN in einem weiteren Mausmodell bestimmt. Diese Mäuse hatten eine nachgewiesene Atherosklerose, welche durch einen LDL-Rezeptor Knockout in Verbindung mit einer speziellen, cholesterinreichen 6- oder 12-wöchige HFD induziert wurde. Da sowohl CTRP-3 als auch PGRN im Zusammenhang mit der Atherosklerose Entwicklung und Progression diskutiert werden (Chen et al. 2019; Yoo et al. 2013; Kojima et al. 2009), war die Untersuchung der Auswirkung von CTRP-3 auf PGRN in einem solchen Kontext von Interesse und die Hypothese (6.Hypothese) wurde aufgestellt, dass CTRP-3 einen inhibitorischen Effekt auf die PGRN Expression im entzündlichen Zustand der Atherosklerose in Adipozyten hat.

Insgesamt soll die vorliegende Arbeit durch die Untersuchung der verschiedenen Aspekte der Regulierung der PGRN-Expression in Adipozyten im Zellkultur- und Maus-Modell zur Aufklärung von PGRN als Adipokin beitragen.

Zur besseren Übersicht folgt eine kurze Gliederung der einzelnen Hypothesen.

Hypothesen zu PGRN in Versuchen an der Zelllinie 3T3-L1:

Hypothese 1: PGRN ist ein Adipokin und wird von Adipozyten produziert.

Hypothese 2: PGRN ist ein proinflammatorisches Adipokin und wird bei Stimulation inflammatorischer TLR-Rezeptoren von Adipozyten vermehrt produziert.

Hypothese 3: Die PGRN Genexpression wird von metabolischen Stimuli beeinflusst.

Hypothese 4: Die PGRN Genexpression verändert sich nach Co-Stimulationen mit verschiedenen Substanzen dahingehend, dass CTRP-3 als antiinflammatorisches Adipokin die Poly(I:C)-induzierte PGRN-Genexpression in Adipozyten inhibiert, CAMP den inhibitorischen Effekt von ODN1585 auf PGRN verstärkt und die Auswirkungen von TNF α in Adipozyten von PGRN inhibiert wird.

Hypothesen zu PGRN in Versuchen an Material von genmodifizierten Mäusen:

Hypothese 5: CTRP-3 inhibiert die PGRN Synthese in Adipozyten, weshalb CTRP-3 Knockout Mäuse PGRN vermehrt in Adipozyten produzieren.

Hypothese 6: CTRP-3 hat einen inhibitorischen Effekt auf die PGRN Expression in Adipozyten im entzündlichen Zustand der Atherosklerose.

2. Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Agarosegelkammer (12x14 cm) und Zubehör	VWR International
Agarosegelkammer (7x15cm) und Zubehör	VWR International
Analysenwaage KERN ACS · ACJ	KERN
Biometra Thermocycler	Biometra
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
Epoch™ Microplate Spectrophotometer	BioTek Instruments, Inc.
Eppendorf Research® plus Pipettensatz	Eppendorf
Eppendorf® Multipette® Plus pipette	Eppendorf
Flockeneisbereiter EF 103 easy-fit	Scotsman
Fusion SL	Vilber Lourmat
Gefrierschrank, Liebherr comfort	Liebherr
GentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec
Heracell™ 150i CO2-Inkubator	Thermo Scientific™
HLC Heating-ThermoMixer	DITABIS
Kanister für Dauerzellkulturen, 21HCL	Taylor-Wharton
Laborzentrifuge Rotina 380 / Rotina 380 R	Hettich GmbH & Co.KG
Magnetrührer RH basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Microzentrifuge Micro 200R	Hettich GmbH & Co.KG
Mikroskop Kamera, MC120 HD	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
Mikroskop, S40/0,45 521251	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
Mikrowelle	SHARP
MSC-Advantage™ Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific™
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
Shaking incubator, SI500	Stuart
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad

Thermomixer, Eppendorf ThermoMixer® F1.5	Eppendorf
Vortex Modell VTX-3000L	LMS
Wasserbad	Memmert
Zellzählkammer, 01mm Tiefe	Neubauer

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

1.5ml SC Micro Tube PCR-PT	SARSTEDT
12Well-Platten für Gewebekulturen	Falcon™
5ml Tube®	Eppendorf
Biosphere® SafeSeal Tube 1.5ml	SARSTEDT
CELLSTAR® serological pipette 2/5/10/25/50 ml	Greiner Bio-One
Combitips advanced 0,2/0,5/1/5/10 ml	Eppendorf
Easyseal Abdeckfolie, TRANSP. 79x135 mm	Greiner Bio-One
Gentle MACS M Tubes	© Miltenyi Biotec
Handschuhe MICRO-TOUCH® Nitra-Tex®	Ansell
Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/clear	Bio-Rad
Injekt® Einmalspritzen 10ml	BRAUN
Microplatte, 96 WELL, PS, Half Area, TRANSP., MICRO-LON®, High Binding	Greiner Bio-One
Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad
Minisart® NML Spritzenvorsatzfilter	Sartorius
Multiply®-Pro 0.2ml Biosphere®	SARSTEDT
Parafilm®	Bemis
Pipettenspitzen 10, 100, 20, 200 µl	Nerbe plus
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	SARSTEDT
QIAshredder	QIAGEN
Reagiergefäß 1,5ml	SARSTEDT
RNeasy spin columns	QIAGEN
Schraubverschlussröhrchen CELLSTAR® 15ml, 50ml	Greiner Bio-One

Sterile Einweg-Filtrationsgeräte Nalgene™ Rapid-Flow™	Thermo Scientific™
TC-Flasche T75, Stand.,Bel. Ka.	SARSTEDT
Zellschaber 16cm 2-Pos.-Klinge	SARSTEDT
Zellsieb 100 µm	Greiner Bio-One

2.3 Chemikalien (Stimulanzen)

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH
apo-Transferrin	Sigma-Aldrich®
Ascorbat	Sigma-Aldrich®
Biotin	Sigma-Aldrich®
Borsäure	EMSURE®
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich®
BSA	Sigma-Aldrich®
Cathelicidin (CAMP)	Hycult Biotech
Chloroform	Roth
Cholsäure (CA)	Sigma-Aldrich®
Corticosteron	Sigma-Aldrich®
CTRP-3 (rek. Exprimiert in H5-Zellen)	AG Schäffler®
Deoxycholsäure (DCA)	Sigma-Aldrich®
DMEM-F12	Lonza, BioWhittaker®
dNTPs	Roche
Dulbecco's MEM (DMEM)	Biochrom GmbH
EDTA	Roth
Ethanol absolut (100%)	Chemsolute
Fetuin	MP Biomedicals™
Flagellin, TLR-5-Agonist	Enzo Life Sciences
Formaldehydlösung (37%)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Gardiquimod (GIQ), TLR-7-Agonist	InvivoGen
Glucose dependent insulinotropic peptide (GIP)	Sigma-Aldrich®
Glukagon-like peptide (GLP-1)	Sigma-Aldrich®
Glycerin	Sigma-Aldrich®

IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Serva
Igepal	Sigma-Aldrich®
Imiquimod (IMQ), TLR-7-Agonist	InvivoGen
Insulin	Sigma-Aldrich®
Isopropanol (2-Propanol 99,9%)	Sigma-Aldrich®
NaCl	Sigma-Aldrich®
Newborn Calf Serum (NCS)	Capricorn Scientific
Nuclease-Free Water	QIAGEN
Oil Red O	Sigma-Aldrich®
Oligodeoxynucleotid 1585, TLR-9-Agonist	InvivoGen
Pantothensäure	Sigma-Aldrich®
Penicillin-Streptomycin	PAN™ Biotech
Phosphatgepufferte Salzlösung - PBS	Biochrom Gmbh
polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) TLR-3-Agonist	Axxora
Progranulin (PGRN), in PBS gelöst	R&D Systems
RDD-Puffer	QIAGEN
RedSafe	Intron Biotechnology
RNAse freies Wasser	QIAGEN
Schwefelsäure 95-97%	EMSURE®
SDS Stammlösung	Roth
SYBER® Green	BioRad
TNF α (murin)	biomol
Tris	Merck
TRIZol	Invitrogen
Trypsin	PAN-Biotech
Tween	Roth
Typan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich®
Ursodeoxycholsäure (UDCA)	Sigma-Aldrich®
Xylencyanol	Sigma-Aldrich®
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich®

2.4 Kit-Systeme

Nachfolgend sind alle verwendeten Kit-Systeme aufgelistet. Alle Kit-Systeme wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme

Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	QIAGEN
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	BioRad
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
QuantiTect Reverse Transcription Kit (400)	QIAGEN
RNeasy Mini Kit (250)	QIAGEN

ELISA-Kits

Tabelle 5: Verwendete ELISA-Kits

DuoSet® ELISA Development System mouse Progranulin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System Mouse MCP-1	R&D Systems

2.5 Zelllinie

Verwendet wurden Zellen der Linie 3T3-L1 von der American Type Culture Collection (ATCC) Organisation.

2.6 Medien und Lösungen für die Zelllinie 3T3-L1

Nachfolgend sind alle verwendeten Medien mit ihren Zusätzen und den Angaben der einzelnen Endkonzentrationen für die Zellkultur aufgelistet. Alle Medien wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 6: Medien für die Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie

Anzuchtmedium	10% NCS
DMEM	1% Penicillin-Streptomycin
Differenzierungsmedium I	5% NCS
DMEM-F12	1% Penicillin-Streptomycin
	2 µg/ml Apo-Transferrin
	17 µM Pantothersäure

	1 μ M Biotin 300 μ g/ml Fetuin 0,1 μ M Insulin (frisch dazugegeben) 200 μ M Ascorbat (frisch dazugegeben) 1 μ M Corticosteron (frisch dazugegeben) 20 μ M IBMX (frisch dazugegeben)
Differenzierungsmedium II DMEM-F12	1% Penicillin-Streptomycin 1 μ M Insulin (frisch dazugegeben)
Medium für Stimulationsversuche DMEM-F12	1% Penicillin-Streptomycin

Oil Red O – Lösungen

Nachstehend sind alle Lösungen und ihre Zusammenstellung für die Oil Red O Färbung aufgelistet. Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Tabelle 7: Lösungen für die Oil Red O Färbung

10%iges Formaldehydlösung	10 ml 37%ige Formaldehydlösung 27 ml PBS
60%iges Isopropanol	60 ml Isopropanol 40 ml PBS
Oil Red O Working Solution	4,5 ml Oil Red O 3 ml ddH ₂ O

2.7 Puffer und Lösungen

Im nächsten Abschnitt sind alle Lösungen und Puffer mit ihrer Zusammensetzung für die Arbeiten mit RNA, DNA und Protein, ebenso für die ELISA-Methode aufgelistet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

Lösungen für Arbeiten mit RNA

Tabelle 8: Lösungen für die RNA-Isolierung

RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol	RLT-Puffer (QIAGEN) + 1% β -Mercaptoethanol
70%iger Ethanol	75 ml Ethanol

	25 ml RNase freies Wasser
--	---------------------------

Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA

Tabelle 9: Lösungen für die Gelelektrophorese

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	10,8 g Tris 5,5 g Borsäure 0,7 g EDTA Auf 1000 ml auffüllen mit Wasser
Loading Dye (Gelladepuffer) 10-fach	5,8 ml Glycerin (87%) 25 mg Bromphenolblau 25 mg Xylencyanol 10 ml 0,5 M EDTA-Stammlösung, pH 8,0 Lagerung bei 4 °C

Lösungen und Puffer für Arbeiten mit Protein

Tabelle 10: Zusammensetzung des RIPA-Puffer

RIPA-Puffer	2,5 ml 3 M NaCl Stammlösung 500 µl Igepal 0,25 g Desoxycholate 250 µl 20%ige SDS Stammlösung 2,5 ml 1M Tris Stammlösung, pH 7,5 50 ml ddH ₂ O
-------------	---

Lösungen und Puffer für den ELISA allgemein

Tabelle 11: Lösungen und Puffer für den ELISA allgemein

Waschpuffer	0,5 ml Tween 1000 ml PBS
Reagent Diluent (1%ige BSA-Lösung)	1,8 g BSA 180 ml PBS Lagerung bei 4 °C

Chromogen Mix	Die Substrate A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) von R&D Systems wurden vor Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt
1 M Schwefelsäure	94 ml Wasser 6 ml konz. Schwefelsäure

Lösungen für den PGRN ELISA

Die murinen Serumproben wurden für die Messung von PGRN im Verhältnis 1:400 mit Reagent Diluent verdünnt. Nachfolgend sind die Zusammensetzungen der Antikörper und der HRP aufgelistet.

Tabelle 12: Lösungen für den PGRN ELISA

Capture Antibody	5 ml PBS 27,8 µl Capture Antibody mPGRN
Detection Antibody	5 ml Reagent Diluent 27,8 µl Detection Antibody mPGRN
HRP	51 µl HRP (R&D Systems) 10,2 ml Reagent Diluent

Lösungen für den MCP-1 ELISA

Die Überstände der 3T3-L1 Zellen wurden für die Messung von MCP-1 mit Reagent Diluent im Verhältnis 1:3 verdünnt und verwendet. Nachfolgend sind die Verdünnungen der Antikörper und des HRP aufgelistet.

Tabelle 13: Lösungen für den MCP-1 ELISA

Capture Antibody	8 ml H ₂ CO ₃ 40 µl Capture Antibody mMCP-1
Detection Antibody	8 ml Reagent Diluent 40 µl Detection Antidody mMCP-1
HRP	8 ml Reagent Diluent 8 µl HRP

2.8 Enzyme

Nachfolgend sind alle verwendeten Enzyme aufgelistet. Wenn nicht anders angegeben wurden die Enzyme bei -4 °C gelagert.

Tabelle 14: Verwendete Enzyme

DNase	QIAGEN (RNase-Free DNase Set (250))
Proteinkinase K	QIAGEN (Raumtemperatur)
Taq Polymerase (+Puffer)	One Tay®DNA Polymerase, BioLabs
Protease Inhibitor (PI)	PhosSTOP EASYpack, Roche
Phosphatase-Protease Inhibitor (PPI)	Roche

2.9 Verwendete Primer

Primer für die Real-Time PCR

Nachfolgend sind alle Sequenzen der verwendeten Primer mit ihrer Schmelztemperatur und Zyklenzahl für die Real-Time PCR aufgelistet. Durch die Verwendung eines forward (for) Primer und eines reverse (rev) Primer grenzen beide Primer zusammen einen bestimmten Sequenzbereich in der DNA ein, der ein bestimmtes Protein codiert, und so spezifisch amplifiziert werden konnte. Die beiden zusammengehörenden Primer wurden zusammen im Verhältnis 1:20 mit Wasser gemischt und als Primer-Mix verwendet. Der Primer-Mix wurde bei -4 °C gelagert. Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Metabion (München).

Tabelle 15: Primer für die Real-Time PCR mit spezifischer Schmelztemperatur und Zyklenzahl

Mouse Progranulin	For: 5'-GTG GCT GGC CTG GAG AAG AT-3'	62 °C
	Rev: 5'-CCT CAC AGC ACA CAG CAT GG-3'	44x
Mouse GAPDH	For: 5'-TGT CCG TCG TGG ATC TGA C-3'	58,9 °C
	Rev: 5'-AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG -3'	34x
Mouse MCP-1	For: 5'-AGG TCC CTG TCA TGC TTC TG-3'	61 °C
	Rev: 5'-TCT GGA CCC ATT CCT TCT TG-3'	44x

Primer für die Amplifikation muriner Gene (PCR)

Nachfolgend sind alle Primerpaare mit ihre Schmelztemperatur für die Annealing-Phase und der Zyklenzahl aufgelistet, die in der PCR verwendet wurden. Die Primerpaare wurden zusammen im Verhältnis 1:20 auf 5µM verdünnt und als Primermix bei -4 °C gelagert. Die Primer stammen von der Firma Metabion.

Tabelle 16: Primer für die Amplifikation muriner Gene (PCR) mit Schmelztemperatur und Zyklenzahl

Cre-PCR (Nachweis Cre-Transgen)	5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3'	51,7 °C
	5'-GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3'	40x
Positivkontrolle Cre	5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'	51,7 °C
	5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'	40x
LoxP-Distal	5'-GACATAATTCTCAGAGCTTGACCG-3'	61,3 °C
	5'-CTTTGGACAAGAGGAATATATGGC-3'	60x
LoxP-Proximal	5'-CTCAGGCCATCATTGTAATAGC-3'	60 °C
	5'-GTGATTAGAGAACTGACAATTGAGC-3'	35x

2.10 Murine Serum- und Fettgewebsproben

In Kooperation mit Dr. A. Schmid wurden post-mortal entnommene Serum und Fettgewebsproben von genetisch veränderten Tieren zur Verfügung gestellt. Die Proben von Adipozyten-spezifischen CTRP-3-Knockout und Kontroll-Mäusen stammen von einer selbst etablierten Zuchtlinie der Arbeitsgruppe Molekulare Endokrinologie von Professor Schäffler der Medizinischen Klinik und Poliklinik III in Gießen. Es wurden Proben von 6 und 12 Monate alten Tieren verwendet. Die Tierhaltung dieser Tiere ist mit der JLU-Meldenummer 544_M genehmigt. Serum- und Fettgewebsproben von LDL-Rezeptor-/CTRP-3-Doppel-Knockout Mäusen wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Schieffer (Kardiologie, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Tiere sind durch eine Kreuzung von LDL-Rezeptor-Knockout-Tieren und den oben erwähnten CTRP-3-Knockout-Tieren entstanden. Diese Mäuse wurden ab einem Alter von 10 Wochen in einem Fütterungsversuch entweder 6 oder 12 Wochen lang mit einer speziellen Hochfett-diät (HFD) ernährt. Die HFD stammt von der Firma Research Diets und hat die Kennnummer D12079B. Der hierzu genehmigte Tierversuchsantrag trägt die Kennung G36/2017.

Für die Isolierung von Adipozyten und Zellen der SVF wurden epididymale und subkutane Fettgewebsproben von 12 Monate alten C57BL/6 (black-6) Mäusen verwendet. Die Mäuse stammen ebenfalls aus der Arbeitsgruppe Molekularen Endokrinologie unter der Leitung von Professor Schäffler der Medizinischen Klinik und Poliklinik III in Gießen.

3. Methoden

3.1 Zell-Kultur

3.1.1 Kultivierung der murinen 3T3-L1 Zelllinie

Fibroblasten der Zelllinie 3T3-L1 wurden durch hormonelle Supplementation zu Adipozyten differenziert. Die Differenzierung dieser Zelllinie sowie ihre Verwendung als Fettzell-Modell sind gut etabliert (Green und Kehinde 1975; Green und Meuth 1974). Dazu wurden die 3T3-L1 Zellen in einer Zellkulturflasche von 75 cm^2 mit 12 ml Anzuchtmedium angezchtet. Das Anzuchtmedium bestand aus DMEM-Medium mit einem Zusatz von 10 % NCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S) (vgl.2.6). Die Zellen wurden im Brutschrank bei konstanten Bedingungen von 37°C und 5 % CO_2 in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert.

Einmal pro Woche wurden die Zellen, wenn sie eine 70-80%ige Konfluenz erreicht hatten, gesplittet. Dazu wurde das Anzuchtmedium in der Zellkulturflasche abgesaugt und wurden 3 ml Trypsin (Lösung in EDTA) auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Trypsin bewirkte ein Ablösen der zuvor adhärenen Zellen vom Flaschenboden. Dieser Vorgang wurde nach den 10 Minuten durch Zugabe von 7 ml Anzuchtmedium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Das Medium über dem entstandenen Zellpellet wurde abgesaugt und durch 5 ml frisches Anzuchtmedium ersetzt, um das Trypsin aus der Lösung komplett zu entfernen. Das Zellpellet wurde in dem frischen Medium resuspendiert und anschließend wurden die Zellen in einer angepassten Verdünnung auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

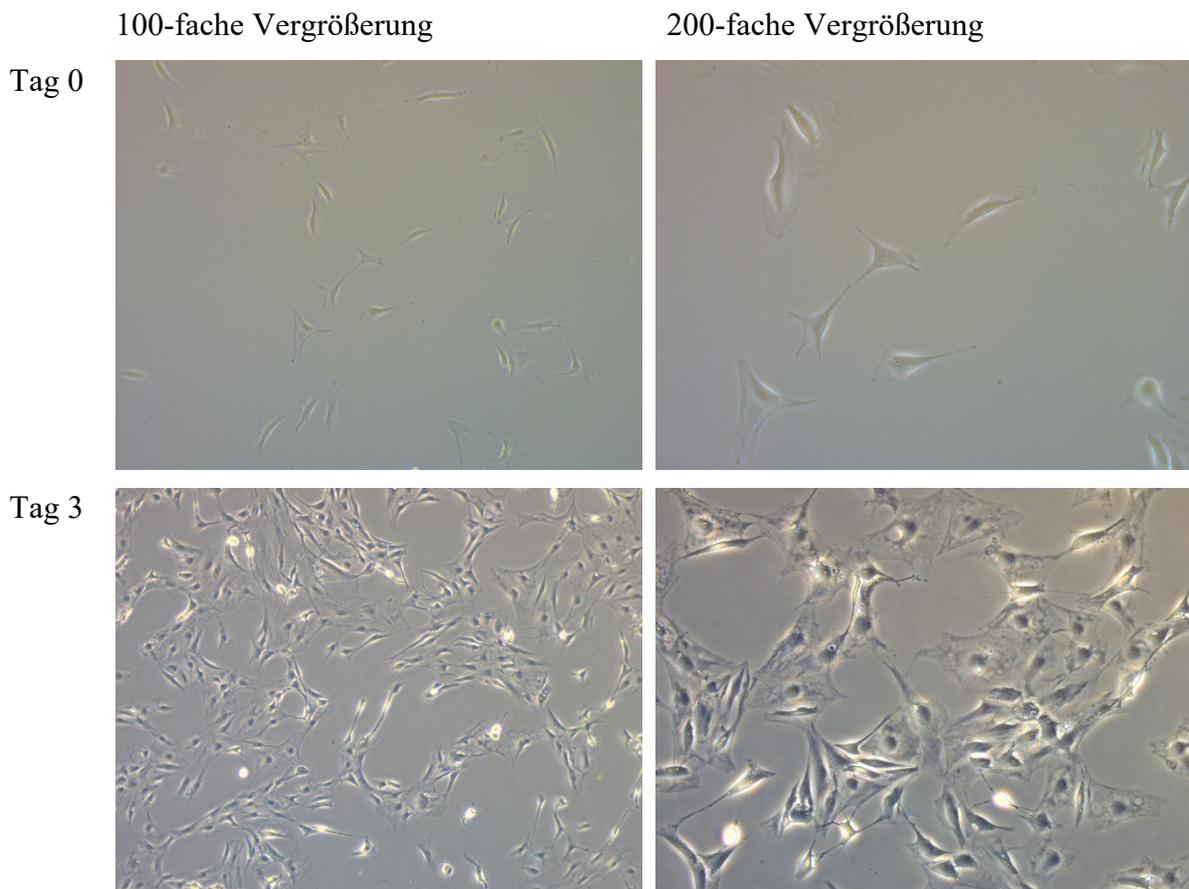
3.1.2 Hormonelle Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie

3T3-L1 Zellen der Passagen 3 bis 8 wurden für die adipozytäre Differenzierung verwendet und hierfür jeweils in einer Dichte von $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ auf 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Das Auszählen der Zellen erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 μl der Zellsuspension mit 90 μl Trypanblau, um die Zellen unter dem Mikroskop

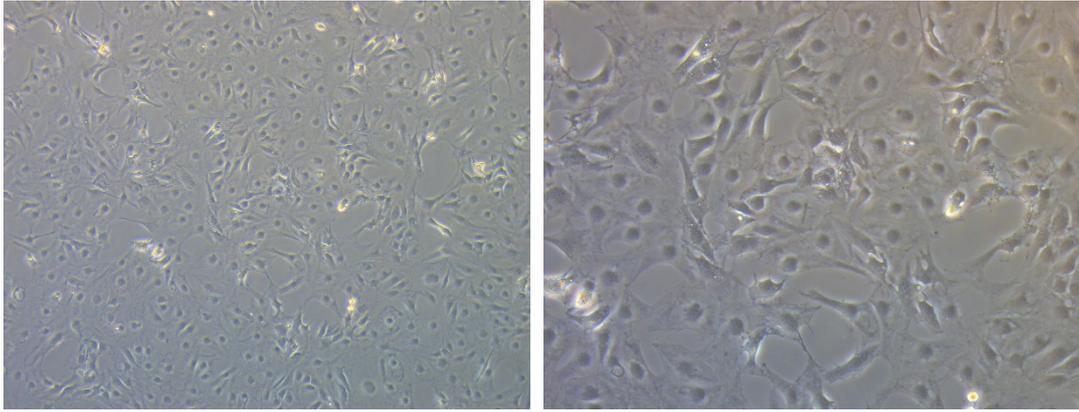
besser sichtbar zu machen, gemischt, und 10 µl dieser verdünnten Suspension in die Zählkammer gegeben. Die Zellen wurden in 1 ml Anzuchtmedium pro Well über Nacht angezogen.

Die Differenzierung der 3T3-L1 Zellen startete am darauffolgenden Tag durch Absaugen des Anzuchtmediums und Zugabe von 500 µl DIFF-Medium (vgl.2.6) (Tag 0 der Differenzierung). An Tag 3 und 6 der Differenzierung wurde das DIFF-Medium erneuert. An Tag 7 erfolgte ein Wechsel, ebenfalls mit 500 µl pro Well, auf serumfreies DMEM-F12 mit einer Zugabe von 1 µM Insulin und an Tag 8 ein Wechsel auf serumfreies DMEM-F12 ohne Insulin (vgl.2.6). An Tag 9 nach Differenzierungsbeginn konnten die nun ausdifferenzierten Zellen geerntet werden.

Die morphologisch sichtbare Differenzierung der 3T3-L1 Zellen von Fibroblasten zu Adipozyten wurde mithilfe des Lichtmikroskops vor jedem Wechsel des Mediums kontrolliert. Die morphologischen Veränderungen während der Differenzierung sind in der folgenden Abbildung 1 dargestellt.



Tag 6



Tag 8

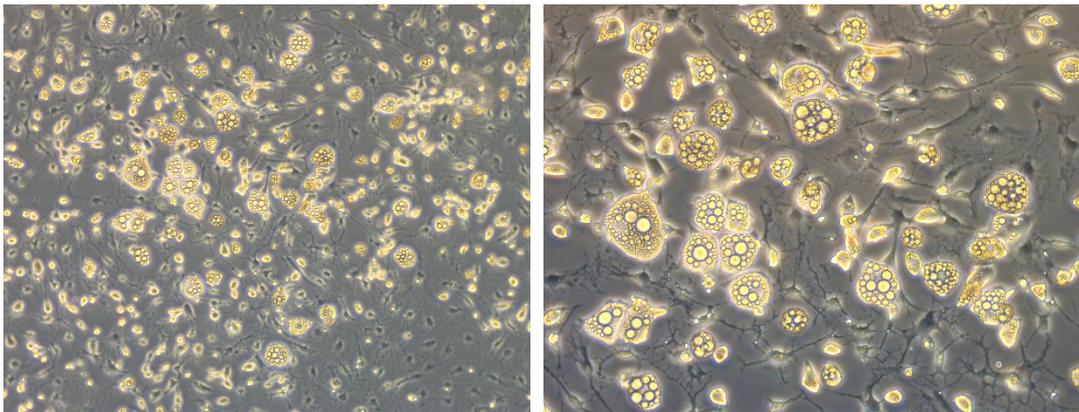


Abbildung 1: Differenzierung der murinen 3T3-L1 Zelllinie

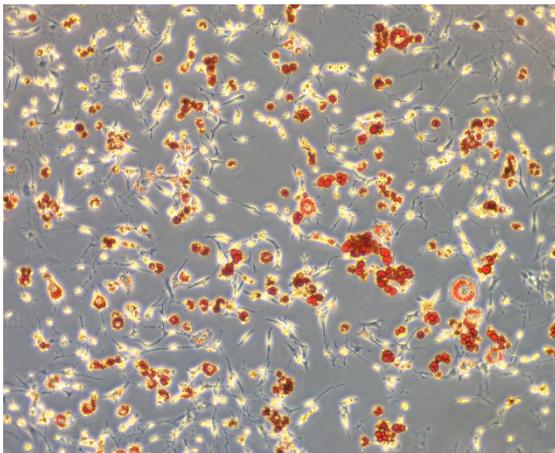
3.1.3 Oil Red O Färbung

Mithilfe der Oil Red O Färbung wurde die Differenzierung der 3T3-L1 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten begutachtet. Oil Red O ist ein roter Bisazofarbstoff, der zur Färbung von Triglyceriden und Lipiden genutzt wird und durch den die Entstehung von Lipidvakuolen im Verlauf der Differenzierung der 3T3-L1 Zellen nachgewiesen und visualisiert werden konnte.

Dazu wurde zunächst das Medium auf den Zellen abgesaugt und wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS, das vorher auf 37 °C erwärmt wurde, pro Well gewaschen. Im Anschluss wurde 1 ml 10%ige Formaldehydlösung in PBS pro Well auf die Zellen gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur auf diesen belassen. Anschließend wurde diese Fixierlösung abgesaugt und 1 ml 60%iges Isopropanol für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Danach erfolgte der Wechsel auf die Working Solution. Diese wurde angesetzt aus 4,5 ml Oil Red O und 3 ml ddH₂O, nach Vermischung steril filtriert und anschließend mit 500 µl pro Well auf die Zellen gegeben. Die Working Solution wurde für 20 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen, danach

wurde jedes Well dreimal mit 2 ml Wasser gewaschen. Die letzten 2 ml Wasser verblieben auf den Zellen und unter dem Lichtmikroskop wurde die Färbung der Zellen dokumentiert. Die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen ist unter 2.6 zu finden. Die folgende Abbildung 2 zeigt ein Beispiel einer Oil Red O Färbung bei 3T3-L1 Zellen an Tag 8 der Differenzierung.

Tag 8 der Differenzierung
100x Vergrößerung



Tag 8 der Differenzierung
200x Vergrößerung

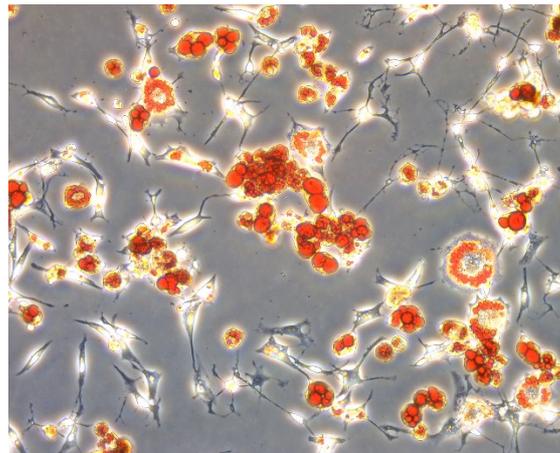


Abbildung 2: Oil Red O Färbung an Tag 8 der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen

3.1.4 Stimulation der 3T3-L1 Zellen

Die 3T3-L1 Zellen wurden an Tag 8 der Differenzierung mit der jeweiligen Substanz, welche in der gewünschten Konzentration in frischem serumfreiem Medium (DMEM-F12) gelöst und auf die Zellen gegeben wurde, stimuliert. Jeder Stimulationsansatz wurde an 6 Wells der Platte durchgeführt und es erfolgte jeweils eine Kontrollstimulation mit dem analogen Volumen des entsprechenden Lösungsmittels (Vektorkontrolle) ebenfalls an 6 Wells. An Tag 9 erfolgte die Ernte von Zellen und Zellkultur-Überstand.

Nachfolgend sind alle Stimulanzen für die 3T3-L1 Zelllinie mit den jeweiligen Konzentrationen aufgelistet, mit denen die Zellen über Nacht und insgesamt über einen Zeitraum von 18 Stunden stimuliert wurden. Wenn nicht anders angegeben waren die Stimulanzen in Wasser gelöst, welches als Kontrollstimulation genutzt wurde.

Tabelle 17: Stimulationsansätze der 3T3-L1 Zelllinie

Glukagon-like peptide (GLP-1)	1, 10 und 100 nM
Glucose dependent insulinotropic peptide (GIP)	1, 10, und 100 nM
Cholsäure (CA)	100 µM
Deoxycholsäure (DCA)	10 µM
Ursodeoxycholsäure (UDCA)	50 µM
Flagellin, TLR-5-Agonist	100 ng/ml
Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly(I:C)), TLR-3-Agonist	1 und 10 µg/ml
Oligodeoxynucleotid 1585, TLR-9-Agonist	1, 5, und 20 µg/ml
Imiquimod (IMQ), TLR-7-Agonist	5 µg/ml
Gardiquimod (GARD), TLR-7-Agonist	1 µg/ml
Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)	3 µg/ml
Progranulin (PGRN), in PBS gelöst	0,5,1 und 3 µg/ml
TNF α	2 ng/ml

Zusätzlich zu den Stimulationsversuchen mit einzelnen Substanzen wurden auch Co-Stimulationen durchgeführt, um die Auswirkung einzelner Stoffe auf die Effekte anderer zu untersuchen. Neben der Einzelstimulation von 1 und 10 µg/ml mit Poly(I:C), wurden in einem Ansatz 10 µg/ml an rekombinant exprimiertem CTRP-3 30 Minuten vor Beginn der Stimulation mit Poly(I:C) in serumfreiem Medium auf die Zellen gegeben. Poly(I:C) wurde danach in den genannten Konzentrationen nachträglich hinzugefügt und die Zellen wurden für 18 Stunden inkubiert. Zusätzlich zur Stimulation durch CAMP (3 µg/ml) und ODN 1585 (20 µg/ml) wurden beide Substanzen in serumfreiem Medium vermischt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert und geschüttelt, bevor sie gemeinsam auf die Zellen gegeben wurden. Eine weitere Kombinationsstimulation erfolgte mit TNF α und PGRN. Dazu wurden die Zellen einmal mit PGRN zusätzlich zu den Einzelstimulationen mit den beiden oben genannten Konzentrationen eine Stunde vorinkubiert und wurde anschließend jeder Ansatz mit 2 ng/ml TNF α stimuliert. In einem separaten Experiment erhielten die Zellen statt serumfreiem Medium zuvor einen Wechsel auf serumarmes Medium, welches aus DMEM/F12 und 1% FCS hergestellt wurde. Anschließend wurden die Zellen im serumarmen Medium einmal eine Stunde und einmal 3 Stunden mit 1 µg/ml PGRN vorinkubiert und im Anschluss wurden für 18 Stunden 2 ng/ml TNF α hinzugefügt.

3.2 Arbeiten mit RNA

3.2.1 RNA Isolierung aus 3T3-L1-Zellen

Bei der RNA-Isolierung aus den 3T3-L1 Zellen wurde das *RNeasy® Mini* Kit von Qiagen gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Die Auswirkung der Stimulation auf den morphologischen Phänotyp der Zellen wurde zunächst unter dem Lichtmikroskop bewertet. Danach wurden die Zellplatten auf Eis gestellt und die Überstände abgenommen, welche in Reaktionsgefäßen für die LDH-Messung aufbewahrt wurden. Im Anschluss wurden pro Zellkultur-Well 350 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol auf die Zellen gegeben, und mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der Platte gelöst. β-Mercaptoethanol wurde verwendet, um die RNA vor Kontakt mit RNasen zu schützen, indem es RNasen denaturiert und somit inaktiviert. Die im RLT-Puffer gelösten Zellen wurden dann auf QIAshredder-Säulen gegeben und bei 13000rpm für 2 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der QIAshredder entfernt und der Durchfluss wurde mit 350 µl 70%-igem Ethanol (vgl.2.7) gemischt und auf RNeasy spin columns gegeben. Die RNeasy spin columns wurden bei 10000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert und die Säule wurde anschließend einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach den ersten beiden Waschschrritten wurde die Säule bei 10000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert, nach dem dritten für 2 Minuten. Danach wurde die Säule in einem neuen Auffanggefäß bei 14000 rpm für eine Minute trocken zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA wurde durch Zentrifugation bei 10000 rpm für eine Minuten in 30 bis 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Dieser Schritt wurde mit dem erhaltenen Eluat wiederholt, welches erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert wurde. Die so gewonnene RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2 RNA Isolierung aus murinem Fettgewebe

Zur RNA Isolierung aus murinem Fettgewebe wurde zusätzlich das TRIzol Reagenz von Invitrogen verwendet. Dazu wurden die murinen Fettgewebeprouben auf Trockeneis gelagert und mithilfe einer Feinwaage 90-100 mg des Fettgewebes abgewogen und in ein M-Tube mit 1 ml TRIzol überführt. Die M-Tubes wurden anschließend für 80 Sekunden im Gentle MACS Dissociator gerührt, in dem das Fettgewebe zerkleinert und homogenisiert

wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das erhaltene Gewebe-Homogenisat für 10 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde, ohne die oben aufliegende Fettphase, auf QiaShredder-Säulen überführt und für 2 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der QiaShredder verworfen und wurden die erhaltenen Zelllysate mit 200 µl Chloroform durch Invertieren gut gemischt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 3 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 Minuten bei 11200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Von den dadurch entstandenen beiden flüssigen Phasen wurde die obere, klare in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während die untere (proteinhaltige) Phase bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert wurde. Die überführte, Nukleinsäuren enthaltende Probe wurde anschließend im Verhältnis 1:1 mit Ethanol (70%) gemischt, auf RNeasy columns gegeben und für 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer und erneutem Zentrifugieren, wurden verbliebene DNA Reste durch 15-minütige Zugabe von 10 µl DNase und 70 µl RDD Puffer pro Probe bei Raumtemperatur entfernt. Die Säulen der RNeasy columns wurden anschließend erneut mit 350 µl RW1-Puffer und danach zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde weiter nach dem beschriebenen Protokoll gemäß den Herstellerangaben für die RNA-Isolierung verfahren (siehe Punkt 3.2.1). In jedem Waschschrift wurde die Probe zentrifugiert, und zuletzt wurde sie trocken zentrifugiert. Am Schluss wurde die Säule in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA wurde durch Zentrifugation (10000 rpm für eine Minute) mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Dieser Schritt wurde mit dem erhaltenen Eluat wiederholt, welches erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert wurde. Die so gewonnene RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Isolation von Adipozyten und Stromal-vaskulären Zellen und deren RNA aus murinem Fettgewebe

Für die Isolation von Adipozyten und Stromal-vaskulären Zellen (SVC) aus murinem Fettgewebe (C57BL/6, black-6 Maus, 12 Monate), wurde je ein ca. 2 g schweres Stück des entnommenen Fettgewebes in einem 15 ml Tube mit 2 ml PBS vermengt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden zum Abbau des Gewebes 30 µl Kollagenase (Konzentration/Aktivität der Stocklösung: 0,225 U/ml) für 30-60 Minuten im Wasserbad bei 37 °C hinzugefügt, bis sich das Gewebe komplett aufgelöst hatte. Die Reaktion wurde durch

Zugabe von 4 ml Anzuchtmedium (vgl. 2.6) abgestoppt. Die Lösung wurde daraufhin durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß filtriert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 200 rcf und 4 °C für 10 Minuten wurde der schaumige Überstand, der die Adipozyten enthielt, in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2-4 ml PBS vermischt. Das Pellet und das Medium, welche die Zellen der SVF enthielten, wurden im verwendeten 50 ml Reaktionsgefäß belassen. Beide Reaktionsgefäße wurden erneut bei 4 °C und 180 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Aus dem 5 ml Reaktionsgefäß wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pipette die untere Phase entfernt, sodass die obere, schaumige Phase mit den Adipozyten im Gefäß verblieb. Aus dem anderen Reaktionsgefäß, das die Zellen der SVF enthielt, wurde der Überstand abgesaugt.

Im Anschluss erfolgte die RNA-Isolierung mit Hilfe des TRIzol Reagenz von Invitrogen. Dazu wurden beide Ansätze (Adipozyten und SVF) mit 2 ml TRIzol resuspendiert, hiervon wurde je 1 ml in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben inkubierten danach für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, und ab diesem Schritt wurde nach dem gleichen Protokoll wie bei der RNA Isolierung aus murinem Fettgewebe vorgegangen (vgl. 3.2.2). Es wurden Adipozyten und Zellen der SVF aus murinem subkutanem und epididymalem Fettgewebe isoliert und zur RNA-Isolierung und Genexpressionsanalyse verwendet.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der gewonnen RNA in wässriger Lösung kann durch die gemessene Extinktion von Licht der Wellenlänge 260 nm bestimmt werden. Dazu wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

E_{260} : Extinktion bei 260 nm

40 µg/ml: Extinktionskoeffizient von RNA

Verdünnungsfaktor (hier 1)

Die Messung erfolgte mit dem Epoch™ Microplate Spectrophotometer von BioTek Instruments, indem die Licht-Extinktion in 2 µl der RNA-Lösung gemessen und mit einer Negativkontrolle (H₂O) verglichen wurde. Die Reinheit der RNA wurde durch eine zusätzliche Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt. Bei reiner RNA liegt das Verhältnis von E₂₆₀ zu E₂₈₀ bei mindestens 2,0.

3.2.5 Reverse Transkription (RT)

Für die Genexpressionsanalyse wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Zunächst wurden die RNA-Proben anhand ihrer gemessenen RNA-Konzentration durch Verdünnung mit RNase-freiem Wasser auf eine einheitliche Konzentration gebracht. Anschließend wurden zu jeder Probe 2 µl gDNA Wipeout Puffer gegeben, um gegebenenfalls noch vorhandene Reste genomischer DNA zu entfernen. Dies erfolgte während einer Inkubation bei 42°C für 5 Minuten. Zuletzt wurden 6 µl eines Reaktionsgemisches hinzugegeben, das sich pro Probe wie folgt zusammensetzte:

Quantiscript RT Puffer: 4 µl

Quantiscript Reverse Transcriptase: 1 µl

RT Primer Mix: 1 µl

Die Reverse Transkriptase ist ein Enzym, das die Umwandlung von RNA zu DNA katalysiert. Dazu synthetisiert sie zunächst einen RNA-DNA-Hybridstrang mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität und anschließend mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität einen doppelsträngigen DNA-Strang.

In einer mitgeführten Negativ-Kontrolle wurde die Reverse Transkriptase im Reaktionsansatz durch RNase-freies Wasser ersetzt. Die Reaktion fand bei einer Temperatur von 42 °C für 30 Minuten statt und wurde anschließend durch eine Temperaturerhöhung auf 95 °C für 3 Minuten gestoppt, bei der die Reverse Transkriptase deaktiviert wurde. Die neu synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der eine Quantifizierung der im Reaktionsverlauf entstehenden DNA-Fragmente möglich ist. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBER® Green lagert sich in die synthetisierte doppelsträngige-DNA ein, wodurch seine Fluoreszenzaktivität um ein Vielfaches ansteigt. Die Zunahme der Ziel-DNA während der PCR ist daher direkt proportional zur Zunahme der gemessenen Fluoreszenzintensität. Für die Real-Time PCR wurde das CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System der Firma Bio Rad verwendet.

Dazu wurden je 4 µl verdünnte cDNA-Lösung, angepasst an das zu quantifizierende Genprodukt, in Duplikaten oder Triplikaten auf eine 96-Well PCR-Platte aufgetragen und ein Reaktionsmix, bestehend aus 5 µl SYBER® Green der Firma BIO-RAD (enthält dNTPs, iTaq DNA Polymerase, MgCl₂, SYBR® Green I) und 1 µl eines entsprechenden Primerpaares (vgl. 2.9) pro Probe, hinzugegeben. Das Programm begann mit einer 3-minütigen Aktivierungsphase der iTaq DNA Polymerase bei 95 °C. Anschließend lief die Kettenreaktion ab (vgl. 3.3.2), deren Zyklen je nach individuellem Protokoll für das untersuchte Genprodukt 40-45mal wiederholt wurden (vgl. 2.9). Ein Zyklus bestand aus Denaturierung (bei 95 °C, 10 s), Annealing (spezifische Temperatur, 30 s) und Elongation (72 °C, 20 s). Die Annealing Temperatur war spezifisch für das jeweilige zu amplifizierende Genprodukt bzw. verwendete Primerpaar und wurde aus der Schmelztemperatur der Primer bestimmt (vgl. 2.9). Nach Abschluss der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve der entstandenen DNA erstellt, um zu überprüfen, ob ein einziges spezielles PCR-Produkt amplifiziert wurde oder Nebenprodukte vorlagen. Dazu wurde der PCR Ansatz schrittweise von einer Temperatur von 65°C auf 95°C erhitzt, wobei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Sofern aufgrund der spezifischen Primerpaare ein bestimmtes DNA-Fragment amplifiziert wurde, spalten sich diese DNA-Moleküle bei einer bestimmten Temperatur simultan in Einzelstränge auf. Dies wird durch eine Freisetzung des SYBR® Green und somit durch einen abrupten Abfall der Fluoreszenz bemerkbar. Wurden hingegen bei der Reaktion mehrere unterschiedliche DNA-Fragmente gebildet, waren mehrere unterschiedliche Schmelztemperaturen über eine Änderung der Fluoreszenz zu beobachten.

Zur Quantifizierung der Amplifikation der cDNA wurde nach der Elongationsphase eines jeden Reaktionszyklus die Fluoreszenz gemessen. Durch Auftragungen der erhaltenen Messwerte gegen die Anzahl an abgelaufenen Amplifikationszyklen, wurde der cycle of quantification (Cq) bestimmt. Der Cq beschreibt den Reaktionszyklus (bzw. einen Punkt innerhalb eines Zyklus), bei dem der Anstieg des Fluoreszenzsignals erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Anhand des Vergleichs der Cq-Werte unterschiedlicher Proben können bei bekannter Amplifizierungseffizienz des verwendeten Primerpaares die Mengenverhältnisse der Ausgangskonzentrationen der zu quantifizierenden cDNA (und mittelbar die relativen Konzentrationen der korrespondierenden mRNA) in den Proben berechnet werden. Beispielsweise entspricht bei einer Effizienz von 100% des Primerpaares, was einer genauen Verdopplung der cDNA in jedem Reaktionszyklus entspricht, eine Differenz der Cq-Werte von $Cq_1 - Cq_2 = 3$, einem Mengenverhältnis der gesuchten mRNA von $Konzentration_1 / Konzentration_2$ von $2^{-3} = 1/8$.

Als *housekeeping gene* diente das kodierende Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Ein *housekeeping gene* stellt ein Gen dar, das im untersuchten Gewebe oder in zu vergleichenden Zellenkulturversuchen unabhängig von abweichenden experimentellen Bedingungen in konstanter Quantität exprimiert wird. Die mRNA-Konzentrationen eines geeigneten *housekeeping gene* können daher als Referenz-Wert und für die Normierung der Zielgen-Expression auf die allgemeine Transkriptionsrate in den untersuchten Zellen bzw. Geweben dienen. Somit konnte beurteilt werden, ob das zu untersuchende Gen in seiner Expression reguliert wurde oder ob stattdessen eine generelle Steigerung bzw. Verminderung der Genexpression stattfand. Die Berechnung der auf GAPDH normierten, relativen mRNA-Ausgangskonzentrationen des Zielgens in zwei separaten Proben 1 und 2 erfolgte dann anhand folgender Formel:

$$\text{Konz.1} / \text{Konz.2} = 2^{-((Cq_{\text{Zielgen1}} - Cq_{\text{GAPDH1}}) - (Cq_{\text{Zielgen2}} - Cq_{\text{GAPDH2}}))}$$

3.3 Arbeiten mit DNA

3.3.1 Isolierung von muriner DNA

Zur Isolierung der DNA aus murinen Gewebeproben (zum Zwecke der Genotypisierung aus Ohrstanzen (vgl. 3.5)) wurde das DNeasy® Blood&Tissue Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Gewebe wurde in einem Reaktionsgefäß mit 180

µl ATL Puffer und 20 µl Proteinkinase K, welche den Abbau von Proteinen katalysiert, gemischt und bei 56°C für eine bis zwei Stunden inkubiert, bis eine vollständige Auflösung des Gewebes erfolgt war. Anschließend wurden 200 µl AL Puffer und daraufhin 200 µl Ethanol (96-100%) hinzugegeben. Nach jedem Schritt wurde die Probe auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Danach wurde die Probe auf eine *DNeasy Mini column* überführt und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss und das Sammelgefäß wurden verworfen. Die Säule wurde in einem neuen Sammelgefäß anschließend mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, danach mit AW2-Puffer gewaschen und für 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach jedem Schritt wurden der Durchfluss und das Sammelgefäß verworfen. Zuletzt wurde die Säule in das endgültige Reaktionsgefäß gesetzt und mit 100 µl AE Puffer gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die DNA durch Zentrifugation bei 8000 rpm (eine Minute) eluiert. Dieser Schritt wurde mit dem gewonnenen Eluat wiederholt und die Proben wurden bis zur Wiederverwendung bei 4°C gelagert.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird verwendet, um geringe Mengen an DNA selektiv zu vervielfältigen. Dabei läuft eine enzymatisch katalysierte exponentielle Amplifikation der DNA ab. Genutzt wird dabei die Taq-Polymerase, eine DNA-Polymerase von hoher Thermostabilität und mit optimaler Reaktionsleistung bei einer Temperatur von 72°C. Durch Zugabe und Anlagerung spezifischer Primerpaare, deren Bindungsstellen an der DNA einen ausgewählten Nukleotid-Abschnitt eingrenzen, kann dieser spezifisch vervielfältigt werden.

Die Reaktion begann mit einem ersten Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 95°C, anschließend liefen die drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation ab. In der Denaturierungsphase wurde die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C (30sec) in ihre Einzelstränge aufgetrennt. In der Annealing-Phase (30 sec) wurde die DNA auf eine niedrigere Temperatur heruntergekühlt, sodass die Primerpaare an ihre Zielsequenzen an der DNA binden konnten. Die Temperatur der Annealing-Phase war jeweils abhängig vom verwendeten Primerpaar bzw. von dessen spezifischer Schmelztemperatur (vgl.2.9). Anschließend wurde in der Elongationsphase für die komplementäre Synthese

der Zielsequenz anhand der Primer-gebundenen DNA-Matrize und mithilfe der Taq-Polymerase der Reaktionsansatz auf 72 °C (1 Minute) erwärmt. Nach Abschluss eines Zyklus wurden die drei Phasen wiederholt, sodass bei idealer Amplifizierungseffizienz pro Zyklus eine Verdopplung der Kopienzahl und somit eine exponentielle Vermehrung der DNA-Abschnitte stattfand. Die vervielfältigte DNA wurde bei 4°C gelagert.

Ein Reaktionsansatz für eine Probe bei der Polymerase-Kettenreaktion war wie folgt zusammengesetzt:

H₂O: 11,93 µl

Puffer: 4,8 µl

2,5 mM dNTPs: 1,92 µl

Primermix: 1,2 µl

Taq-Polymerase: 0,15 µl

3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von amplifizierten DNA-Molekülen und zur Genotypisierung der verwendeten transgenen Mauslinie (vgl. 3.5) wurden die Proben auf einem Agarosegel durch Elektrophorese analysiert. Verwendet wurden 4%- und 2%ige Agarosegele, die durch Lösung der entsprechenden Menge Agarose in 1xTBE-Puffer (vgl. 2.7) hergestellt wurden. Das Auflösen des Agarosepulvers erfolgte durch Aufkochen im Puffer, anschließend wurde im noch flüssigen Zustand der Fluoreszenzfarbstoff RedSafe im Volumen-Verhältnis 1:20000 hinzugegeben. Zum Aushärten wurde die viskose Lösung in eine Kammer gegossen und zur Aussparung freier Taschen im Gel wurde ein Taschenkamm eingesetzt. Nachdem das Gel abgekühlt und dabei vollständig ausgehärtet war, wurde es in eine Gelelektrophorese-Vorrichtung eingesetzt und vollständig mit 1xTBE-Puffer (vgl. 2.7) bedeckt. Die zuvor mit farbigem Loading Dye (vgl. 2.7) versetzten (und dadurch beschwerten) DNA-Proben wurden anschließend in die Taschen gefüllt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 100V für 90 Minuten, bei der die DNA-Proben auf Grund ihrer negativen Ladung durch das Gel zur Anode wanderten und dabei aufgrund der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Zuletzt wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert. Durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff RedSafe emittierten die DNA-Fragmente im Gel unter Anregung durch UV-Bestrahlung Licht und waren dadurch als

hell leuchtende Banden zu erkennen. Zur Größenabschätzung diente ein ebenfalls aufgetragener DNA-Standard mit Fragmenten bekannter Größe.

3.4 Arbeiten mit Protein

3.4.1 Gewinnung von Zellprotein aus 3T3-L1-Zellen

Reife 3T3-L1 Adipozyten wurden unter dem Lichtmikroskop betrachtet und der Phänotyp der Zellen wurde hinsichtlich sichtbarer Stresssymptome aufgrund der Stimulation bewertet. Anschließend wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und in Reaktionsgefäße, die mit Pellet beschriftet wurden, überführt. Auf die Zellen in den Kulturplatten wurde 350 µl PBS mit Protease-Inhibitor (PI) (im Verhältnis 1:50 angesetzt) gegeben. Der Protease-Inhibitor verhinderte durch die Inaktivierung von Peptidasen den Abbau der Proteine. Die Pellet-Gefäße wurden bei 4000 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, um abgelöste Zellen gegebenenfalls zu pelletieren. Die dabei erhaltenen Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei direkter Weiterverwendung für die LDH-Messung und den ELISA auf Eis und für längere Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

Mithilfe von Zellschabern wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und in PBS zu den bereits pelletierten Zellen der Überstände gegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C wurde der erhaltene Überstand verworfen und 50 µl RIPA-Puffer (vgl. 2.7) mit Phosphatase/Protease-Inhibitor (PPI) (Verhältnis 1:10) auf das Pellet gegeben. Zuletzt wurde das Zell-Pellet für 10 Sekunden durch Ultraschall sonifiziert. Das homogenisierte Zelllysate enthielt das Gesamtprotein, dessen Konzentration mithilfe des BCA-Assay bestimmt wurde. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.4.2 LDH-Messung (Laktat-Dehydrogenase-Messung)

Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkultur-Überstand diente als Maß für die Zytotoxizität der experimentellen Behandlung der Zellen. Dabei war die gemessene LDH-Aktivität direkt proportional zur Belastung der Zellen, die gegebenenfalls zum Zelluntergang und somit zur Freisetzung der intrazellulär lokalisierten LDH führte.

Dazu wurden 25 µl vom (frisch entnommenen und abzentrifugierten) Überstand der Zellen mit 25 µl DMEM-Medium verdünnt und mit 50 µl des Reaktionsmix für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Für den Reaktionsmix wurde das Cytotoxicity Detection Kit von Roche Diagnostics verwendet. Katalyst und Färbelösung wurden gemäß Herstellerprotokoll im Volumen-Verhältnis 1:45 gemischt. Nach Zugabe zum Zellüberstand kam es durch die enzymatische Aktivität der LDH zu einer Farbreaktion, deren relatives Ausmaß anhand der Extinktion von Licht der Wellenlänge 490 nm bestimmt wurde. Als Referenz diente dabei eine Kontrolle nur aus (serumfreiem) DMEM-Medium (Blank).

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA

Zur Konzentrationsbestimmung des gelösten Proteins wurde die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode verwendet. Es wurde das Thermo Scientific Pierce® BCA Protein Assay Kit nach dem Herstellerprotokoll benutzt. Dazu wurden die Proben mit PBS im Verhältnis 1:5 verdünnt und pro Ansatz Triplikate mit je 10µl auf eine 96Well-Microplatte aufgetragen. Nach Zugabe von 100 µl des Reaktionsmix, bestehend aus 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung und Bicinchoninsäure im Verhältnis 1:50, wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proteine reduzierten die Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺, welches wiederum mit der Bicinchoninsäure Farbkomplexe mit einem Farbspektrum von grün bis violette bildete. Je höher der Proteingehalt der Probe war, desto mehr Farbkomplexe wurden gebildet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Licht-Extinktion bei 562 nm gemessen und mithilfe einer Standardkurve wurde der dazu proportionale Proteingehalt bestimmt.

3.4.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentrationsbestimmung eines bestimmten Proteins, in dieser Arbeit von PGRN und MCP-1, im Serum oder in Zellüberständen wurde mithilfe eines ELISA durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen immunologischen Nachweis mit einer an die Antikörper-Antigen-Bindung gekoppelten Farbreaktion, über die eine Konzentrationsbestimmung möglich ist. Zuerst wurden 50 µl eines für das zu untersuchende Protein bindungsspezifischen *capture antibody* in jedes Well gegeben, der durch Inkubation über Nacht auf der

Plattenoberfläche immobilisiert wurde. Der *capture antibody* für PGRN wurde bei Raumtemperatur immobilisiert, der MCP-1 Antikörper bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde nach drei Waschschritten mit PBS + 0,05% Tween (zur Entfernung ungebundener Antikörper), der *capture antibody* mit 100 µl einer 1%igen BSA (bovines Serumalbumin)-Lösung in PBS (Reagent Diluent) für eine Stunde inkubiert. Dadurch wurden potentielle unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers blockiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in einer angepassten Verdünnung (mit Reagent Diluent verdünnt, vgl. 2.7) aufgetragen. Das zu analysierende Protein wurde vom Antikörper gebunden und dadurch auf der Platte immobilisiert. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden durch Waschen ungebundene Proteine entfernt. Als Nächstes wurden 50 µl eines spezifischen Biotin-gekoppelten *detection antibody* aufgetragen, welcher an das immobilisierte Protein binden kann. Nach erneut zweistündiger bei PGRN bzw. einer einstündigen Inkubationszeit bei MCP-1 wurden die Platten gewaschen und 50 µl des Enzyms Meerrettichperoxidase (englisch *horse raddish peroxidase*, HRP) aufgetragen, welches an Streptavidin gekoppelt war und über dieses an das Biotin des *detection antibody* binden konnte. Das HRP inkubierte beim PGRN-ELISA 20 Minuten und beim MCP-1-ELISA 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschritt erfolgte der Nachweis des gebundenen Proteins durch die Katalyse der Umsetzung der zuletzt zugegebenen Chromogen-Mischung durch HRP, welches als Farbreaktion (blau) sichtbar war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt, wodurch es zu einem sofortigem Farbumschlag von blau nach gelb kam. Die photometrisch bestimmte optische Dichte des Farbstoffes bei Licht der Wellenlänge 490 nm war proportional zur Menge der HRP-Antikörper-Antigen-Komplexe und somit des gebundenen Proteins. Unter Verwendung parallel gemessener Standardproben mit bekannten Konzentrationen wurde der Gehalt des gesuchten Proteins in den Proben bestimmt. Die genauen Angaben zu allen verwendeten Verdünnungen und Lösungen sind unter 2.7 zu finden.

3.5 Arbeiten mit Tieren

Es wurden Mäuse der Zuchtlinie B6NTac.Cg-*C1qtnf3*^{tm3113^{Arte}}Tg(Fabp4-cre)1Rev verwendet, die mit mithilfe des Cre/loxP-Systems gentechnisch verändert waren und einen Adipozyten-spezifischen CTRP-3-Knockout trugen. Das Cre/loxP-System ist eine Methode, um gezielt DNA-Sequenzen zu entfernen. Dabei katalysiert eine Cre-Rekombinase die homologe Rekombination von DNA an spezifisch erkannten Basensequenzen mit der

Bezeichnung LoxP (Kos 2004). Im Falle des gentechnisch modifizierten Konstrukts, das hier behandelten, transgenen Mauslinie zu Grunde lag, wurde beiderseits von Exon 4 des Gens *C1qtnf3* je ein LoxP-Loxus eingefügt. Die Zelltyp-Spezifität des Knockouts kam durch die Expressionskontrolle der in das Genom der Tiere integrierten Cre-Rekombinase durch den α 2-Promotor zustande, der spezifisch in Adipozyten die Transkription nachfolgender DNA-Regionen aktiviert. Die Genotypisierung der Tiere zur Unterscheidung zwischen Kontroll- und Knockout-Tieren erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese mit aus Ohrstanzen gewonnener DNA (vgl. 3.3.3). Postmortal aus Knockout- sowie Kontroll-Mäusen (negativ für das die Cre-Rekombinase kodierende Transgen) gewonnenes Blut sowie subkutanes und gonadales Fettgewebe wurden untersucht. Nach der RNA-Isolierung aus dem Fettgewebe wurden Genexpressionsanalysen mittels Real-Time PCR durchgeführt. Aus Vollblut wurde durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 30 Minuten Serum gewonnen. In den Serumproben wurde unter Verwendung der ELISA-Methode der Gehalt ausgewählter Proteine spezifisch gemessen.

Zusätzlich wurden Serumproben sowie Proben aus weißem (viszeralem) (WAT) und thorakalem Fettgewebe (TAT) aus low density lipoprotein receptor (LDL-R)-defizienten Mäusen hinsichtlich zirkulierender Adipokine und lokaler Genexpression analysiert. Durch Einkreuzung der oben beschriebenen Zuchtlinie mit Adipozyten-spezifischen CTRP-3-Knockout Tieren wurden transgene Tiere mit zweifachem Gen-Knockout (CTRP-3- und LDL-R-Knockout) erhalten. Die Mäuse (eingeteilt in LDL-Rezeptor Knockout Tiere und LDL-Rezeptor und CTRP-3 Doppel-Knockout Tiere) wurden wiederum in zwei experimentelle Gruppen unterteilt, die entweder eine 6-wöchige Hochfett-diät (HFD) oder eine 12-wöchige HFD zur metabolischen Induktion einer Atherosklerose erhielten. Die Entwicklung der Atherosklerose wurde histologisch gesichert. Tierhaltung und Durchführung der Fütterungsexperimente erfolgten in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Karsten Grote in der Kardiologie der Philipps-Universität Marburg.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Statistik- und Analyse-Software SPSS 22. Mit dieser wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) berechnet. Die Mittelwerte wurden mithilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test verglichen. Als statistisch signifikant betrachtet wurden Unterschiede zwischen verglichenen Gruppen

mit einem p-Wert für den Fehler 1. Art unter 0,05. Zusätzlich wurde bei einigen Ergebnissen zur genaueren Betrachtung die Bonferroni-Kurzformel (p-korrigiert = p/n Gruppen) für multiples Testen angewandt. Die graphischen Darstellungen zeigen die statistischen Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen (Mittelwert \pm einfacher oder doppelter SEM) oder von Boxplots (Darstellung der beiden mittleren Quartile inkl. Median als Box sowie der beiden äußeren Quartile als *whiskers* bzw. Einzelpunkte).

4. Ergebnisse

4.1. Basale PGRN Genexpression im Fettgewebe

4.1.1 Ergebnisse der basalen PGRN Genexpression während der Differenzierung der 3T3-L1 Adipozyten

Es wurde die Genexpression von PGRN (normiert auf GAPDH) während der Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie an verschiedenen Tagen der Differenzierung gemessen (Abb.3). Die Isolierung der mRNA und die anschließende Genexpressionsanalyse erfolgten an Tag 0 (direkt zu Beginn der Differenzierung), an Tag 3, Tag 5, Tag 7 und Tag 9. Es war ein starker Anstieg der PGRN RNA-Expression an Tag 3 zu erkennen. Die Genexpression von PGRN war um das 6-fache im Vergleich zu Tag 0 angestiegen ($p < 0,001$). Anschließend wurde eine kontinuierliche Reduktion der Genexpression an Tag 5 und Tag 7 gemessen, mit einem p-Wert von 0,004 zwischen Tag 5 und Tag 7 und einem p-Wert $< 0,001$ zwischen Tag 3 und Tag 7. An Tag 9 war wiederum eine erneute verstärkte Genexpression zu messen ($p < 0,001$ zwischen Tag 7 und Tag 9). Somit zeigte sich ein zweigipfliges Expressionsmaximum während der frühen und in der späten Adipogenese.

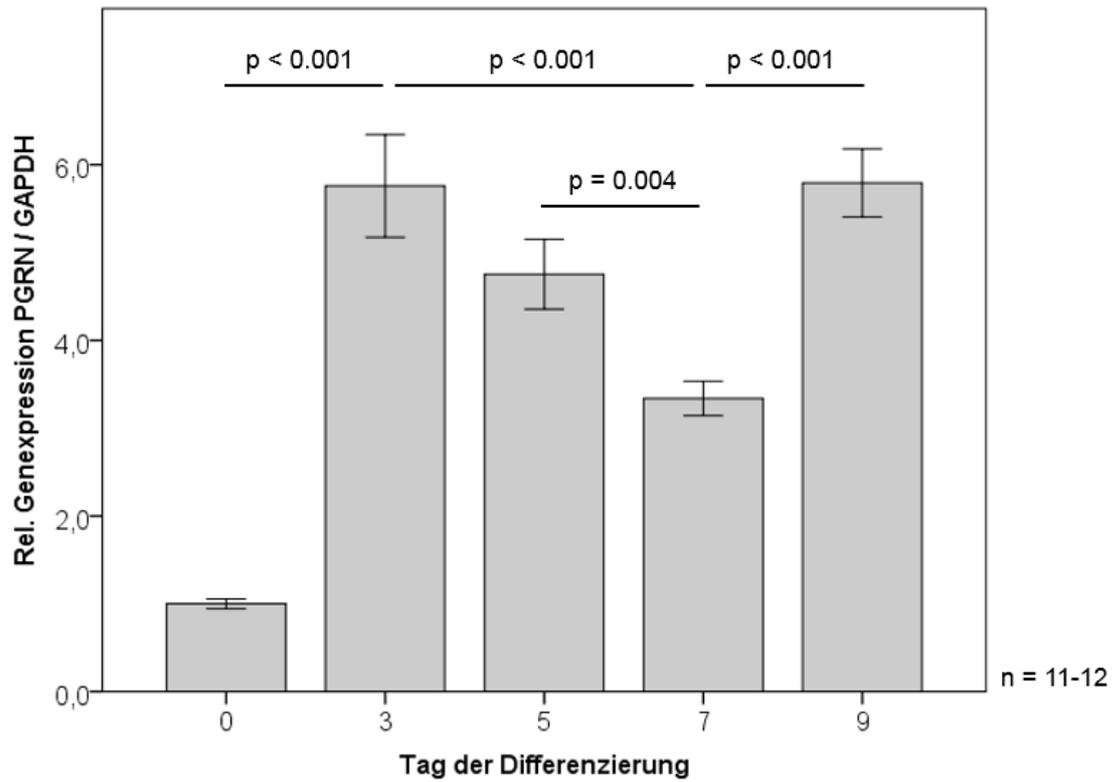


Abbildung 3: Relative PGRN Genexpression während der Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie an Tag 0,3,5,7 und 9

Publiziert (Schmid et al., Cytokine 2020)

4.1.2 PGRN Genexpression in primären Zellen der SCF und Adipozyten im Vergleich zwischen VAT (epididymal) und SAT

Es wurde die Genexpression von PGRN (normiert auf GAPDH) in murinem epididymalem (Abb.4) und subkutanem Fettgewebe (Abb.5) gemessen, jeweils in primären Zellen der SVF (SVC) und in primären Adipozyten, die aus diesen Geweben isoliert und für die RNA-Isolierung verwendet wurden. Sowohl im subkutanen ($p < 0,001$) als auch im epididymalen Fettgewebe ($p = 0,001$) war ein signifikanter Unterschied zwischen Adipozyten und SVC zu erkennen. In beiden Fettgewebsarten war eine höhere PGRN Genexpression in den Zellen der SVF zu verzeichnen.

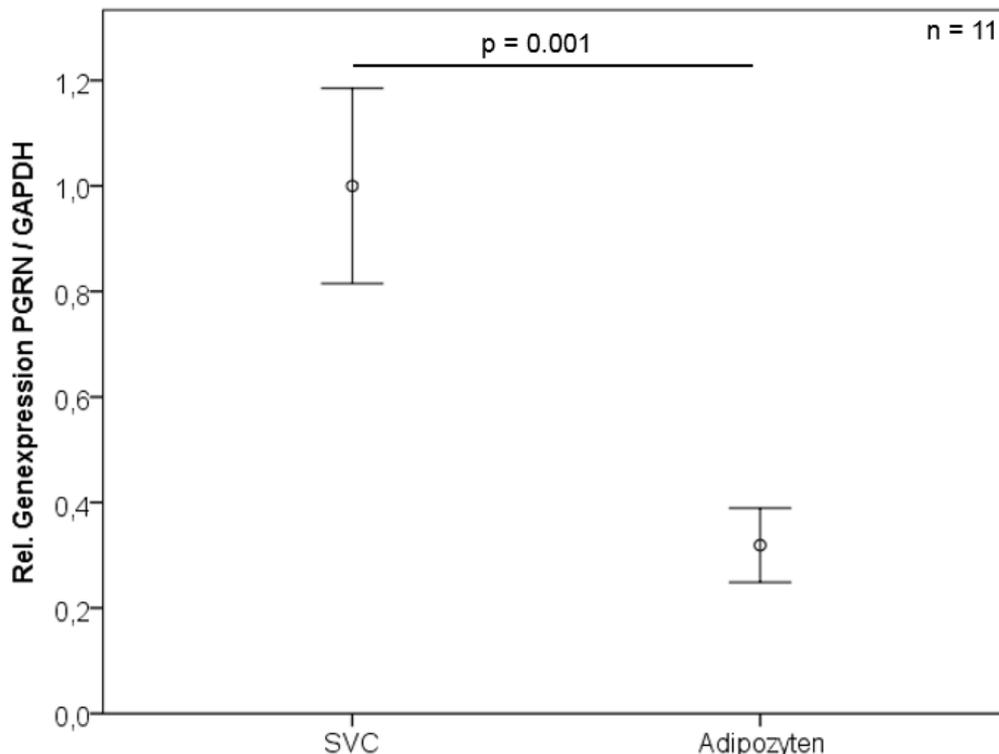


Abbildung 4: Relative PGRN Genexpression in murinem epididymalem Fettgewebe von 12 Monate alten black-6 Mäusen (C57BL/6, Wildtyp) - Vergleich zwischen Zellen der SVF (SVC) und Adipozyten

Publiziert (Schmid et al., Cytokine 2020)

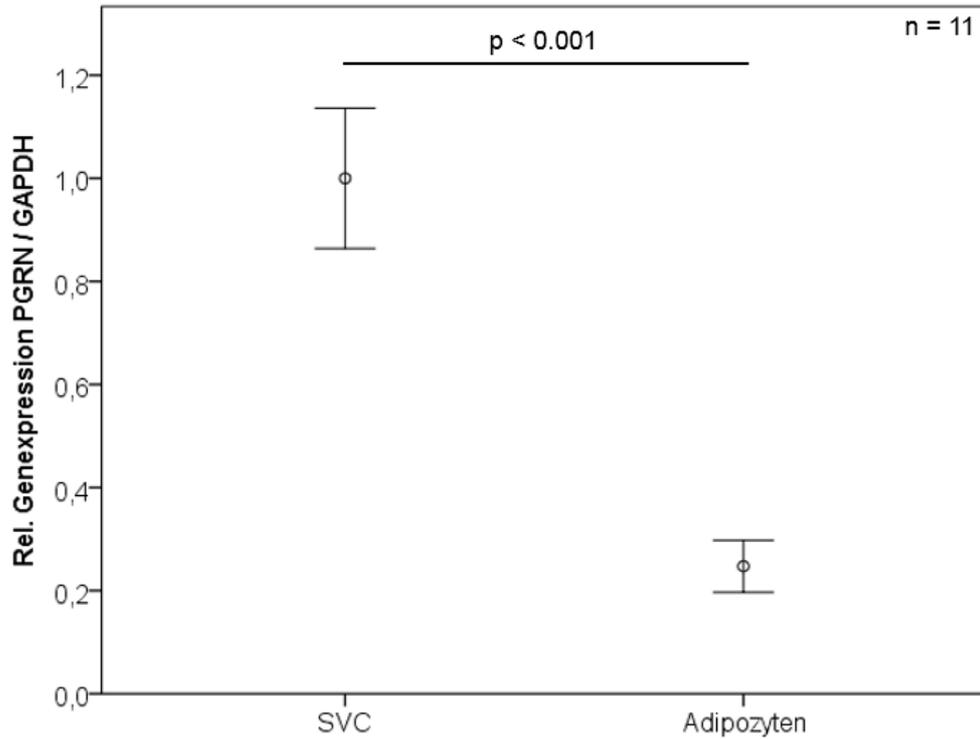


Abbildung 5: Relative PGRN Genexpression in murinem subkutanem Fettgewebe von 12 Monate alten black.6 Mäusen (C57BL/6, Wildtyp) - Vergleich zwischen Zellen der SVF (SVC) und Adipozyten

Publiziert (Schmid et al., Cytokine 2020)

4.2. Einfluss von metabolischen und inflammatorischen Stimuli auf die PGRN Genexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten

4.2.1 Einfluss metabolischer Stimuli auf die PGRN Genexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten

Untersucht wurden zum einen die Auswirkungen von verschiedenen Gallensäuren auf die PGRN Genexpression in murinen 3T3-L1 Adipozyten und zum anderen die Auswirkung von Inkretinen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 18 Stunden mit den Gallensäuren Cholsäure (CA, 100 μ M), Deoxycholsäure (DCA, 10 μ M) und Ursodeoxycholsäure (UDCA, 50 μ M) (Abb.6) sowie mit den Inkretinen GLP-1 (100nM) und GIP (100nM) (Abb.7) stimuliert. Bei der Stimulation mit den Gallensäuren CA ($p < 0,001$) und UDCA ($p = 0,002$) war eine erniedrigte Expression von PGRN RNA im Vergleich zum Kontrollansatz mit DMSO zu verzeichnen. Die Stimulation mit DCA zeigte keinen solchen Effekt auf die Expression. In beiden Stimulationsansätzen mit den Inkretinen GLP-1 und GIP war eine signifikante Reduktion der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle mit einem p-Wert von 0,026 bei GLP-1 und mit einem p-Wert von 0,03 bei GIP zu messen. Allerdings wurde bei strikter Anwendung der Bonferroni-Korrekturformel für multiples Testen das angepasste Signifikanz-Niveau von 0.016 knapp verpasst.

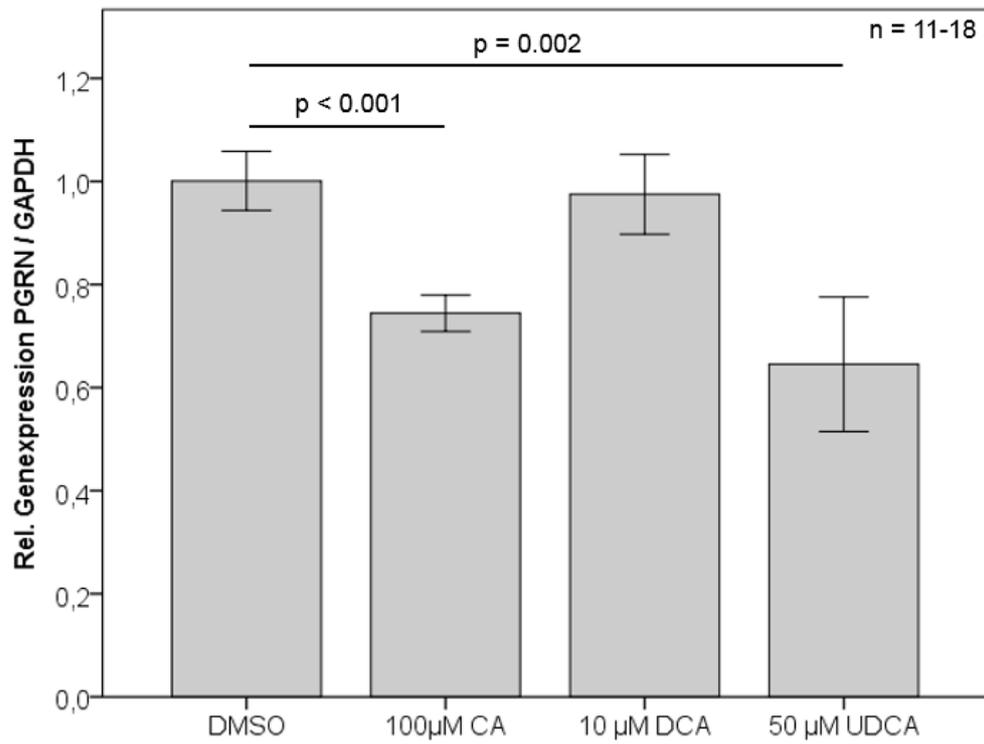


Abbildung 6: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 100 µM CA, 10 µM DCA und 50 µM UDCA

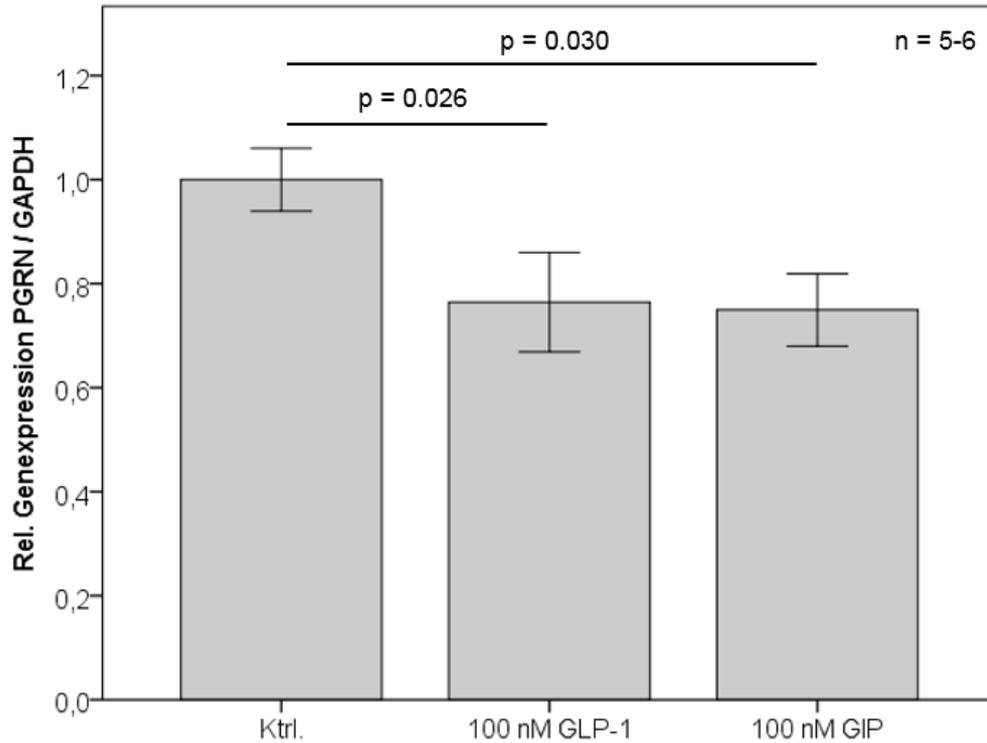


Abbildung 7: Relative PGRN Genexpression von 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 100 nM GLP-1 und 100 nM GIP. Bei Anwendung der Bonferroni-Kurzformel (p -korrigiert = p/n Gruppen) für multiples Testen ergibt sich ein entsprechend niedrigeres Signifikanz-Niveau von 0,016.

Abbildung 6 und 7: Publiziert (Schmid et al., Cytokine 2020)

4.2.2 Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die PGRN Genexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten

Die 3T3-L1 Adipozyten wurden über einen Zeitraum von 18 Stunden mit verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert. Verwendet wurden Agonisten für den TLR-3 (Poly(I:C)), den TLR-5 (Flagellin), den TLR-9 (ODN1585) und IMQ sowie GARD als TLR-7 Agonisten. Die Stimulation mit 10 µg/ml Poly(I:C) zeigte eine signifikante, deutliche Erhöhung ($p=0,002$) der PGRN-Genexpression im Vergleich zur Behandlung mit Wasser (Abb.8). Auch die Flagellin-Stimulation zeigte eine sehr leicht, jedoch signifikant ($p=0,015$) erhöhte Genexpression von PGRN verglichen mit der Kontrolle (Abb.8). Ebenfalls wurde bei den TLR-7-Stimulationen mit IMQ und GARD eine vermehrte Genexpression von PGRN (normiert auf GAPDH) im Vergleich zur Kontrolle mit Wasser festgestellt. Diese war bei der Stimulation mit 5 µg/ml IMQ mit einem p -Wert $< 0,001$ signifikant (Abb.9), während die Stimulation mit 1 µg/ml GARD eine entsprechende Tendenz zeigte, aber mit einem p -Wert von 0,051 die Signifikanz nicht erreicht hat (Abb.10). Stimulationsversuche mit den Konzentrationen von 1 µg/ml und 5 µg/ml des ODN1585 zeigten keine Veränderungen in der Genexpression von PGRN im Vergleich zu der Kontrolle. Ab einer Konzentration von 20 µg/ml des ODN1585 war hingegen ein Rückgang des PGRN RNA-Gehalts zu verzeichnen ($p=0,03$) (Abb.11). Allerdings wurde bei strikter Anwendung der Bonferroni-Korrekturformel für multiples Testen das angepasste Signifikanz-Niveau von 0.013 knapp verpasst.

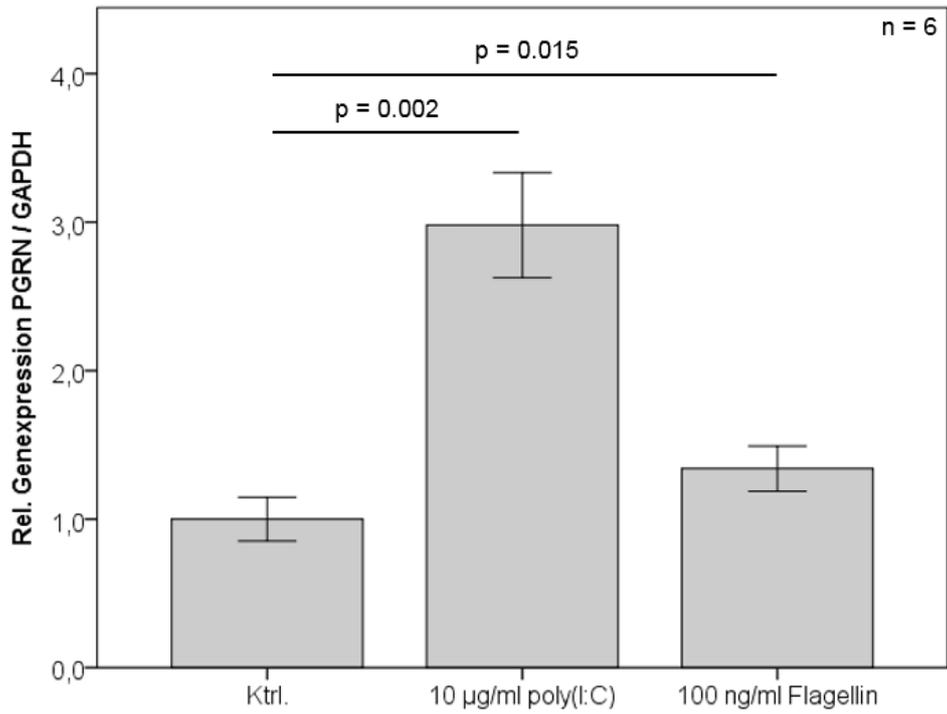


Abbildung 8: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 10µg/ml Poly(I:C) und 100 ng/ml Flagellin

Publiziert (Schmid et al., Cytokine 2020)

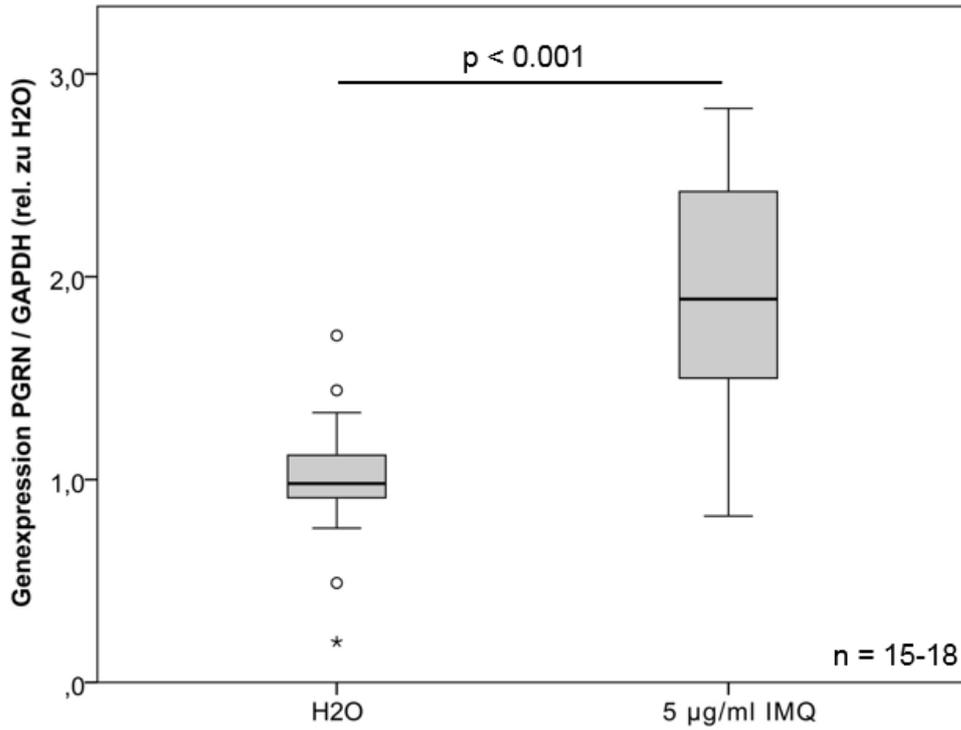


Abbildung 9: Relative PGRN Genexpression nach Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten mit 5 µg/ml Imiquimod (IMQ)

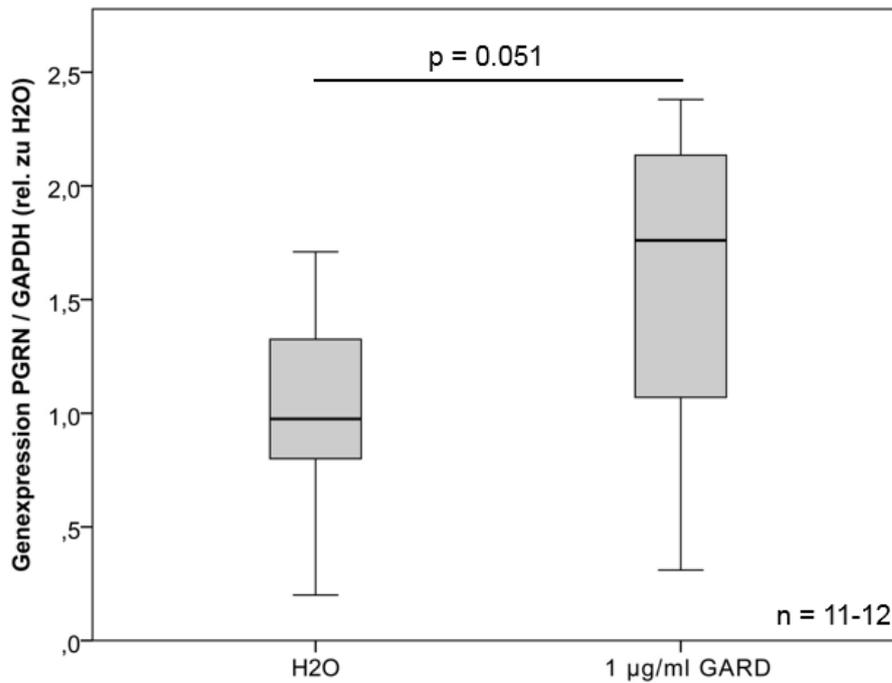


Abbildung 10: Relative PGRN Genexpression von 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1 µg/ml Gardiquimod (GARD)

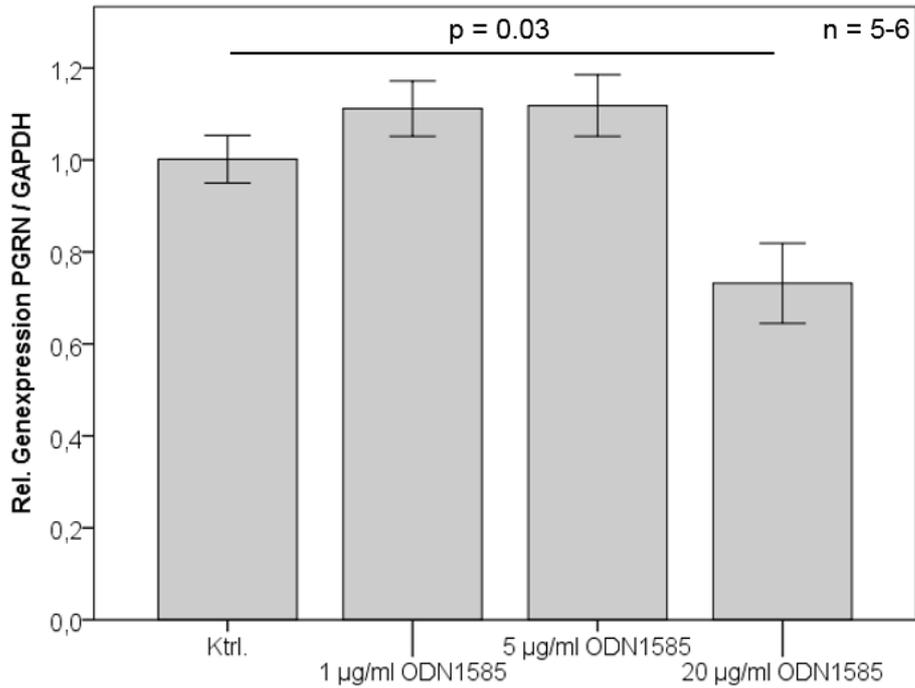


Abbildung 11: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1, 5 und 20 µg/ml ODN1585. Bei Anwendung der Bonferroni-Kurzformel (p-korrigiert = p/n Gruppen) für multiples Testen ergibt sich ein entsprechend niedrigeres Signifikanz-Niveau von 0,013.

Publiziert (Schmid et al., Cytokine 2020)

4.3 PGRN Expression in vivo

4.3.1 PGRN Genexpression und systemische Level in CTRP3-Knockout Mäusen und Wildtypen

Untersucht wurden Serumproben sowie SAT und gonadales AT, welches in seiner Funktion und Physiologie dem VAT ähnelt, von 6 und 12 Monate alten Mäusen. Die Mäuse waren mit Hilfe des Cre/loxP-Systems genetisch verändert, sodass ein Teil der Tiere einen Adipozyten-spezifischen Knockout von CTRP-3 aufwies. Unter Verwendung des ELISA wurde PGRN im Serum von 6 und 12 Monate alten Mäusen bestimmt. Bei den weiblichen 6 Monate alten Tieren war ein signifikanter Unterschied der Serum PGRN Werte zwischen den Knockout- und Kontroll-Tieren, zu messen (p -Wert=0,019) (Abb.12). Dabei wurden in den Knockout-Tieren höhere PGRN Werte als in Kontroll-Tieren verzeichnet. Bei den männlichen 6 Monate alten Mäusen wurde ein solcher Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht festgestellt (Abb.13). Ebenso wurden die Serumproben der 6 Monate alten Tiere innerhalb der Kontroll- und Knockout-Gruppe auf geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht. Innerhalb der Kontrolltier-Gruppe war mit einem p -Wert von 0,854 kein Unterschied von PGRN im Serum zwischen männlichen und weiblichen Tieren festzustellen (Abb.14). Bei dem Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Tieren in der Knockout-Gruppe der 6 Monate alten Tiere wiesen hingegen die Weibchen verglichen mit den Männchen signifikant höhere PGRN-Serumlevel auf (p -Wert=0,001) (Abb.15).

Genau wie bei den 6 Monate alten Tieren wurden die Serum PGRN-Werte der 12 Monate alten Tiere zunächst zwischen Kontroll- und Knockout-Gruppe innerhalb der männlichen und weiblichen Tiere verglichen. Bei den 12 Monate alten Tieren war sowohl bei den Weibchen (p -Wert=0,762) (Abb.16) als auch bei den Männchen (p -Wert=0,973) (Abb.17), kein Unterschied in den PGRN-Serumlevel zwischen Kontroll- und Knockout-Gruppe festzustellen. Zugleich wurden unterschiedliche PGRN-Serumlevel jeweils innerhalb der Kontroll- und Knockout-Gruppe zwischen männlichen und weiblichen Tieren gemessen. Sowohl in den Kontroll-Tieren (p -Wert=0,015) (Abb.18) als auch in den Knockout-Tieren (p -Wert=0,001) (Abb.19) waren bei den 12 Monate alten Weibchen höhere PGRN-Serumlevel zu verzeichnen.

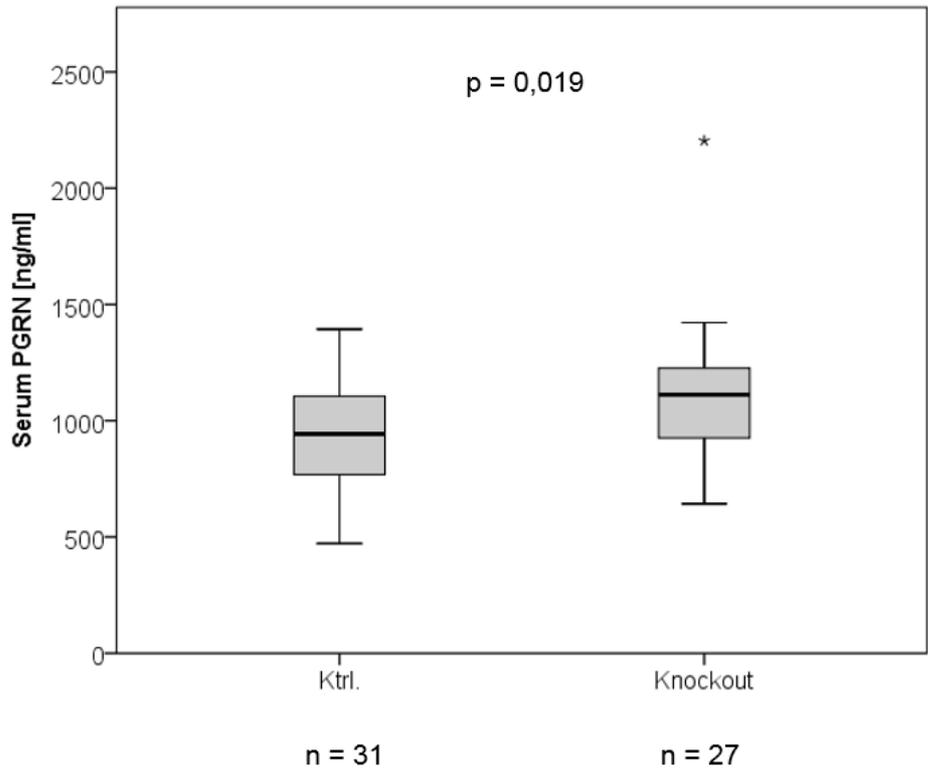


Abbildung 12: Serum PGRN Level in weiblichen 6 Monate alten CTRP-3 Knockout- und Kontroll-Tieren

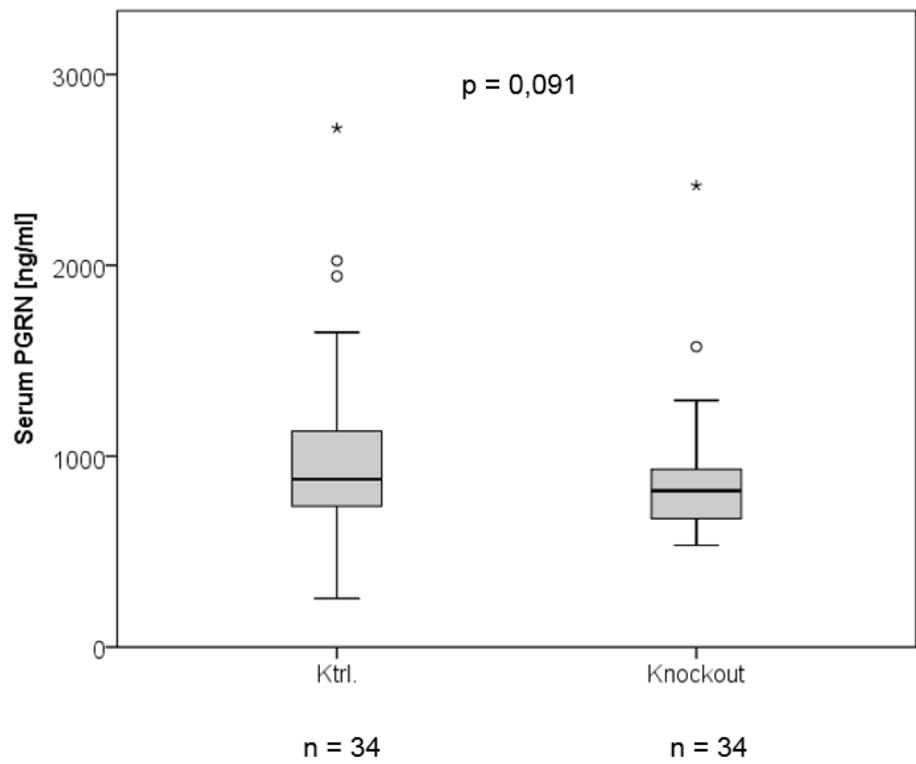


Abbildung 13: Serum PGRN Level in männlichen 6 Monate alten CTRP-3 Knockout- und Kontroll-Tieren

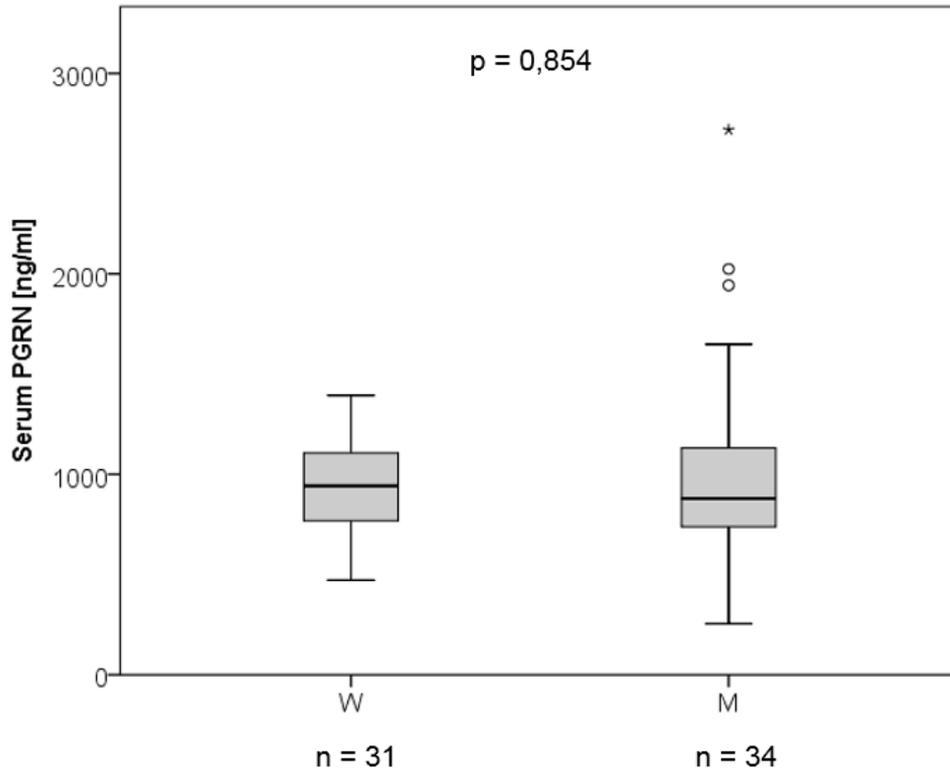


Abbildung 14: Serum PGRN Level in weiblichen und männlichen 6 Monate alten Kontroll-Tieren

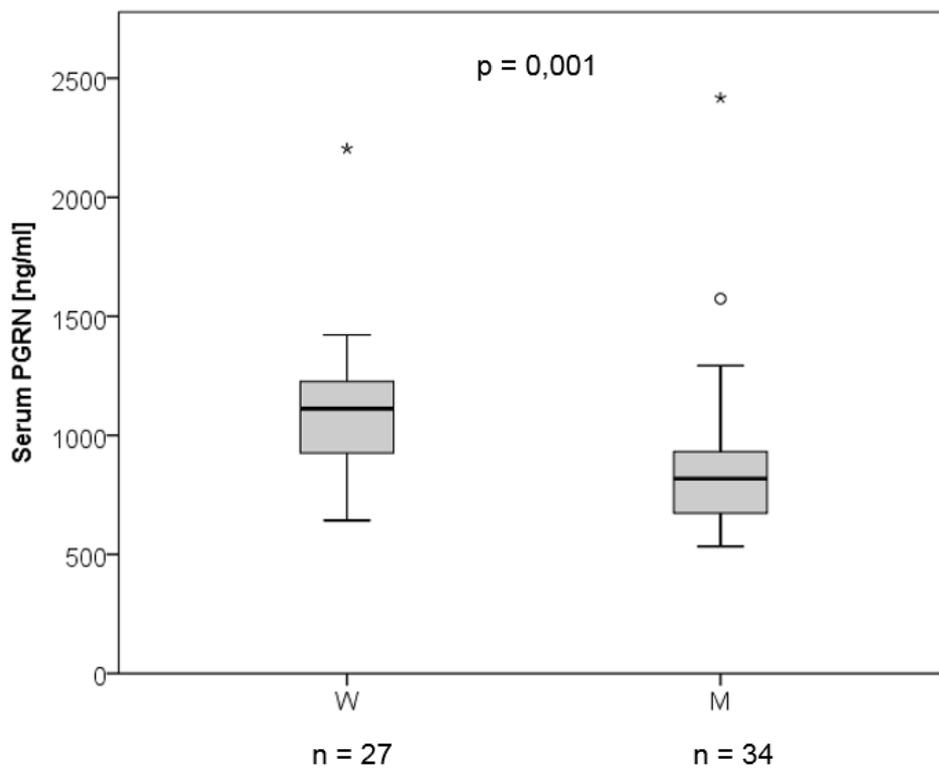


Abbildung 15: Serum PGRN Level in weiblichen und männlichen 6 Monate alten CTRP-3 Knockout-Tieren

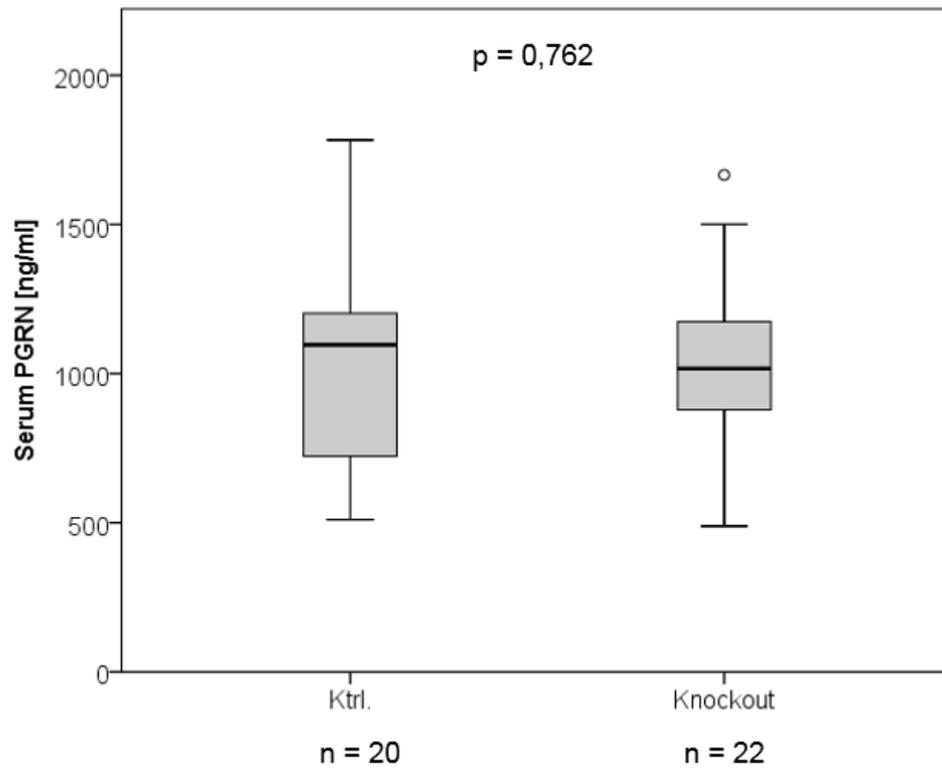


Abbildung 16: Serum PGRN Level in 12 Monate alten weiblichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren

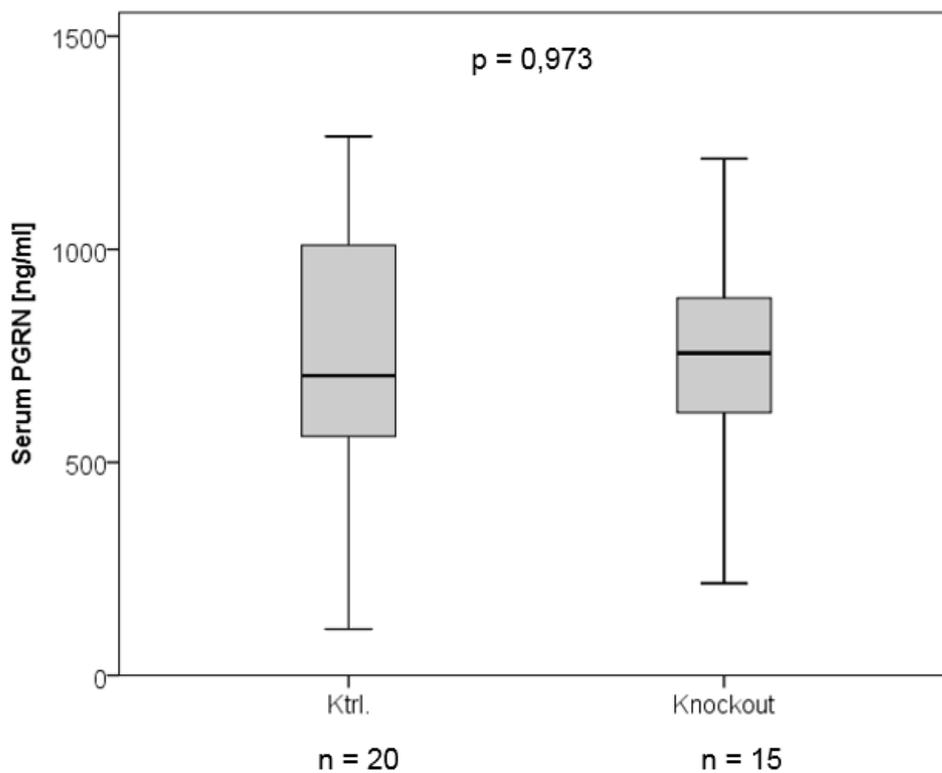


Abbildung 17: Serum PGRN Level in 12 Monate alten männlichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren

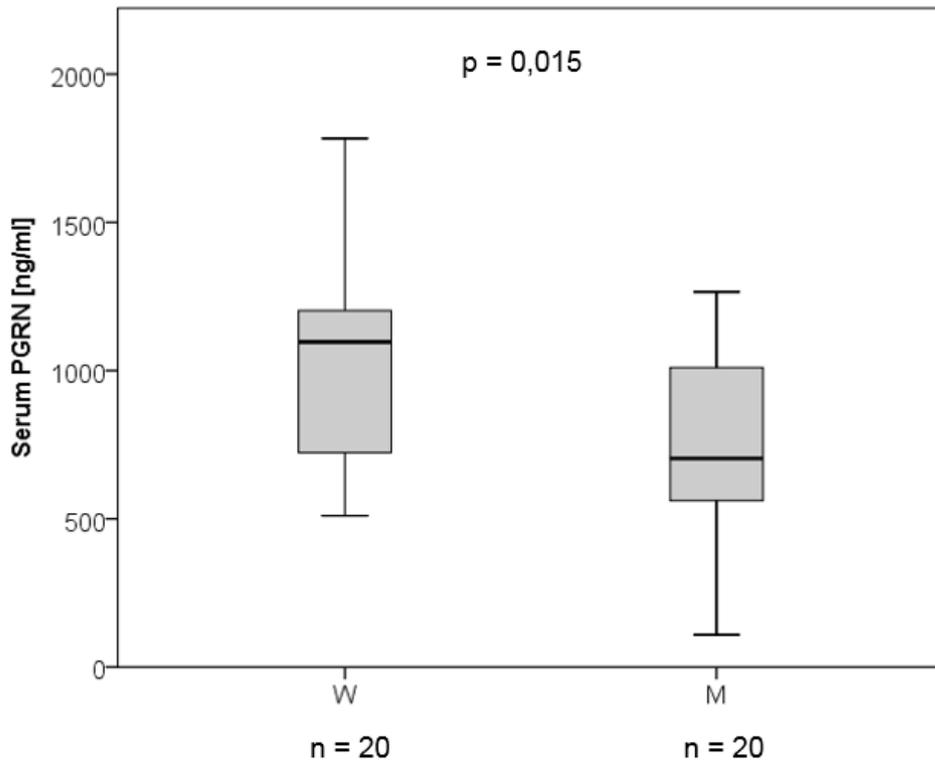


Abbildung 18: Serum PGRN Level in 12 Monate alten weiblichen und männlichen Kontroll-Tieren

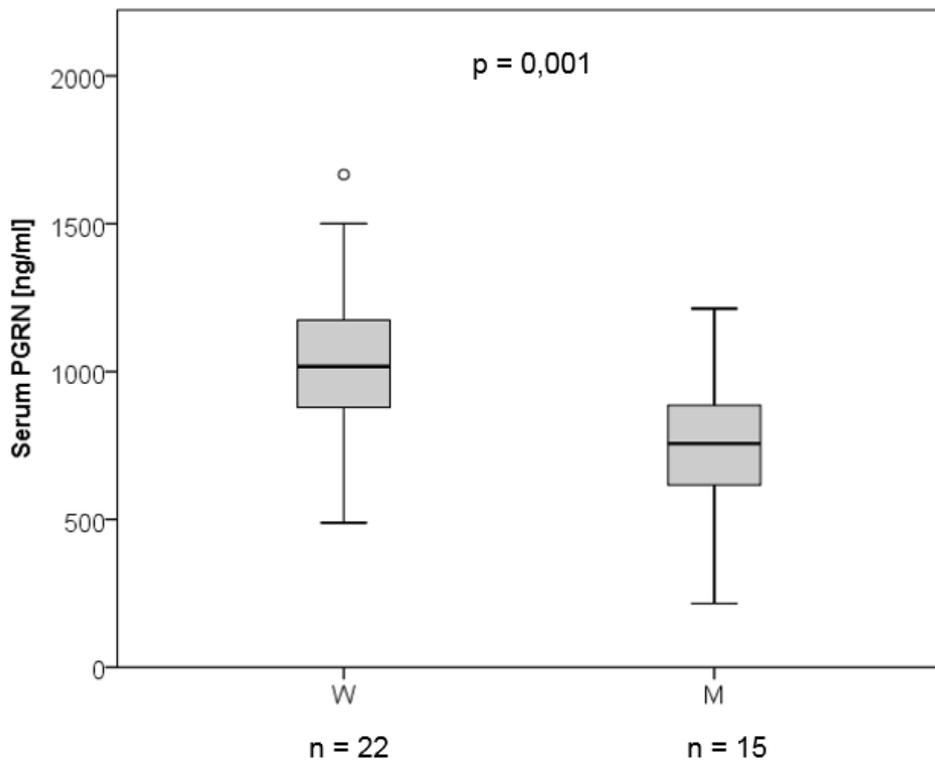


Abbildung 19: Serum PGRN Level in 12 Monate alten weiblichen und männlichen CTRP-3 Knockout-Tieren

Neben den Proteinexpressionsanalysen im Serum der Tiere wurden mit Hilfe der Real-Time PCR Genexpressionsanalysen von PGRN im SAT und gonadalen AT durchgeführt. Es wurde zunächst die relative Genexpression von PGRN im gonadalen AT, das bei Mäusen dem VAT entspricht, bei den 6 Monate alten Tieren gemessen. Bei den weiblichen Tieren war kein Unterschied zwischen den Kontroll- und Knockout-Tieren in der Genexpression von PGRN (normiert auf GAPDH) zu verzeichnen (p-Wert=0,085) (Abb.20). Im Vergleich dazu wurde bei den männlichen 6 Monate alten Tieren eine höhere relative Genexpression von PGRN in den Kontroll-Tieren verglichen mit den Knockout-Tieren festgestellt (p-Wert=0,027) (Abb.21). Im SAT der 6 Monate alten Tiere zeigte sich weder bei den weiblichen Tieren (p-Wert=0,839) (Abb.22) noch bei den männlichen Tieren (p-Wert=0,246) (Abb.23) ein Unterschied zwischen Kontroll- und Knockout-Tieren in der relativen Genexpression von PGRN. Es wurden auch Genexpressionsanalysen in den Fettgewebeproben von 12 Monate alten Tieren durchgeführt. Weder im gonadalen AT noch im SAT waren signifikante Unterschiede zwischen Knockout- und Kontroll-Mäusen bei den weiblichen und männlichen Tieren zu verzeichnen. Diese Daten sind hier nicht gezeigt.

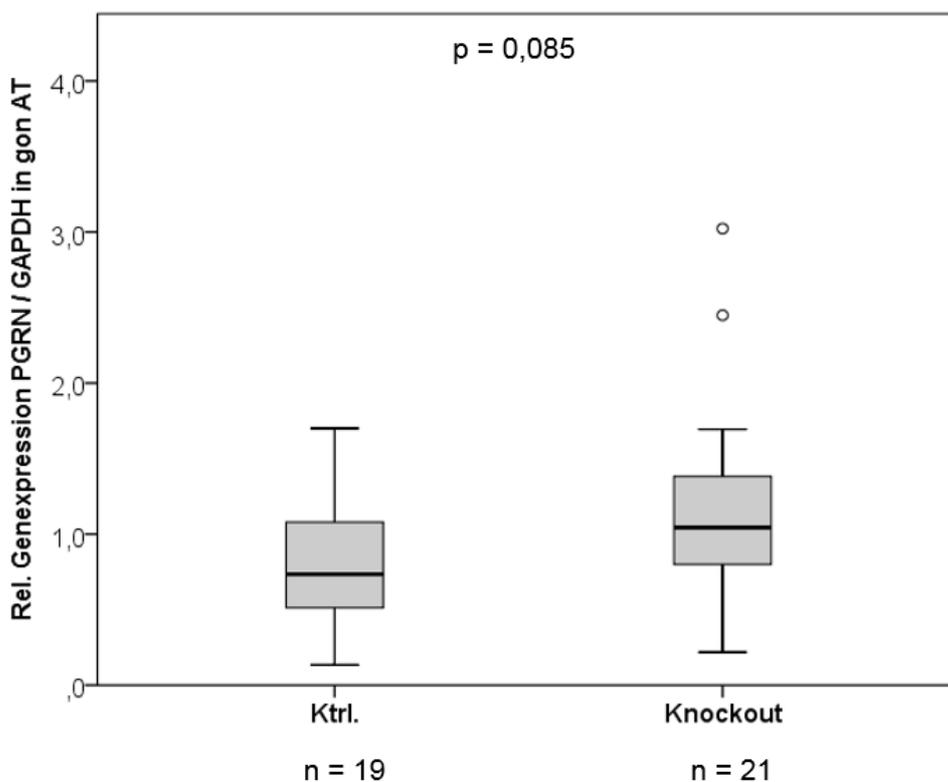


Abbildung 20: Relative PGRN Genexpression im gonadalen AT von 6 Monate alten weiblichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren

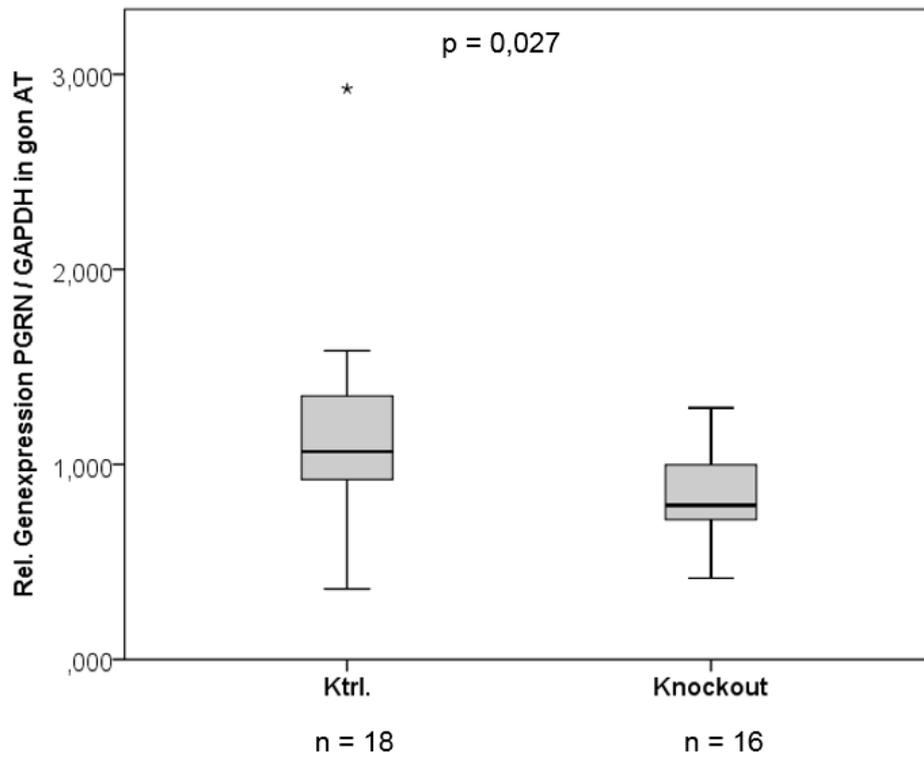


Abbildung 21: Relative PGRN Genexpression im gonadalen AT von 6 Monate alten männlichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren

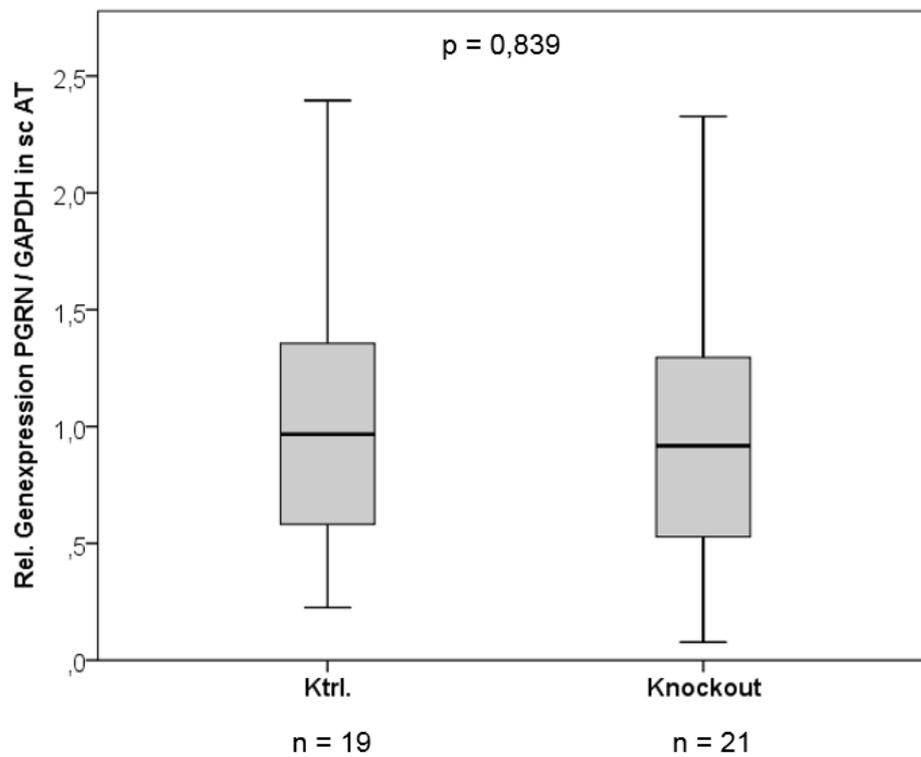


Abbildung 22: Relative PGRN Genexpression im SAT von 6 Monate alten weiblichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren

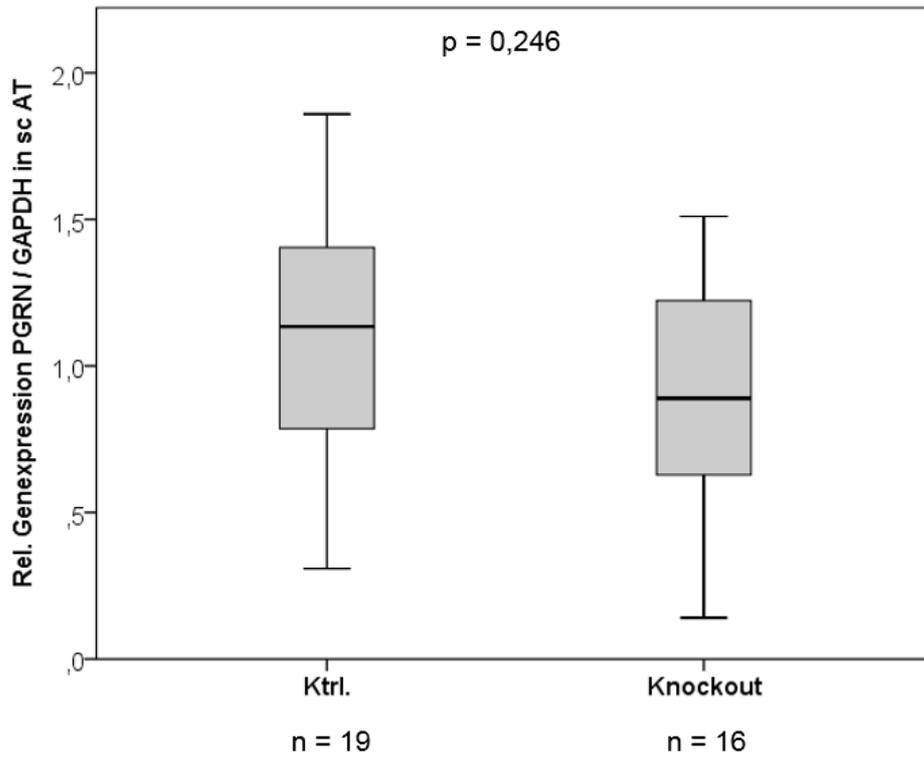


Abbildung 23: Relative PGRN Genexpression im SAT von männlichen 6 Monate alten Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren

4.3.2 PGRN Genexpression und systemische Level in CTRP-3/-LDL-Rezeptor Knockout-Mäusen

Es wurde mit Hilfe der Real-Time PCR die Genexpression von PGRN in weißem Bauchfett (WAT) und in thorakalem Fett (TAT) von Mäusen bestimmt, die einen allgemeinen Knockout für den LDL-Rezeptor (CTRP3^{+/+}) und teilweise zusätzlich einen Adipozyten-spezifischen CTRP-3 Knockout (CTRP3^{-/-}) trugen. Die Tiere erhielten entweder eine 6-wöchige (6w) oder eine 12-wöchige HFD (12w). Die Genexpression von PGRN im WAT (normiert auf GAPDH) war bei der Gruppe der 6-wöchigen HFD mit einem p-Wert von 0,045 signifikant höher bei den beschriebenen Doppel-Knockout-Tieren als bei den Kontrolltieren (nur mit LDL-Rezeptor Knockout) (Abb.24). Bei der Gruppe der 12-wöchigen HFD war in der Genexpression von PGRN im WAT kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen festzustellen (p-Wert=0,573) (Abb.24). Die Genexpression von PGRN im TAT zeigte weder nach 6-wöchiger HFD noch nach 12-wöchiger HFD signifikante Unterschiede zwischen den beiden genetisch veränderten Gruppen (Abb.25).

Zusätzlich zu den Genexpressionsanalysen im Fettgewebe wurden mittels ELISA Proteinexpressionsanalysen für PGRN im Serum der Tiere durchgeführt. Im Serum der 6-wöchigen HFD Gruppe war eine Tendenz dahingehend bemerkbar, dass in den Tieren mit einem zusätzlichen CTRP3 Knockout (CTRP3^{-/-}) weniger PGRN im Serum gemessen wurde als in den Kontroll-Tieren (nur mit LDL-Rezeptor-Knockout) (Abb.26). Diese Tendenz erreichte mit einem p-Wert von 0,083 jedoch keine statistische Signifikanz. In der Gruppe der 12-wöchigen HFD war zwischen den beiden genetisch veränderten Tiergruppen kein Unterschied zu beobachten (p-Wert=0,573) (Abb.26).

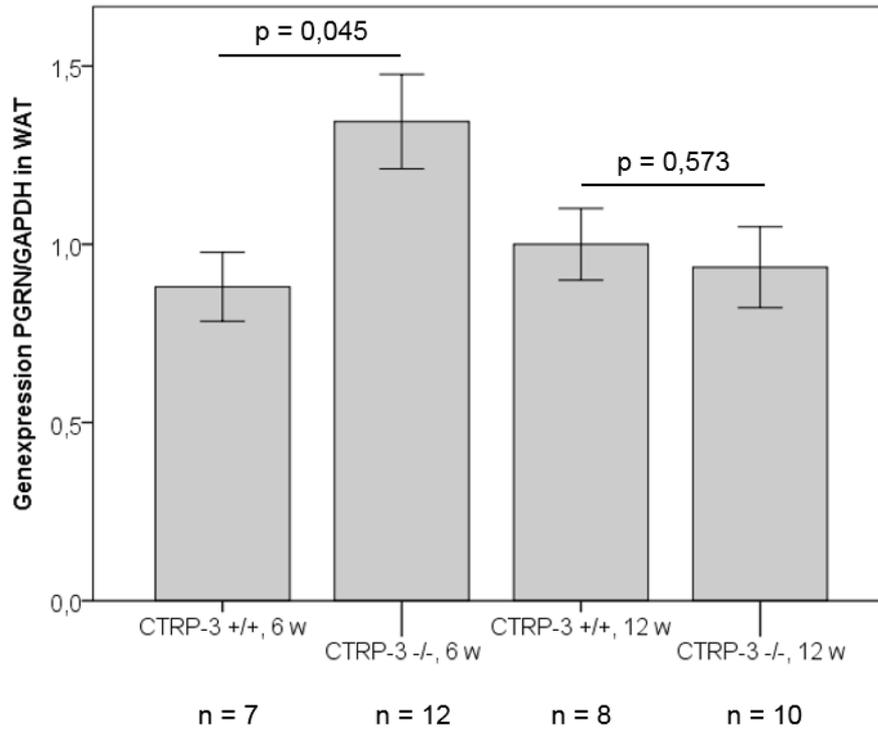


Abbildung 24: Relative PGRN Genexpression im WAT in LDL-Rezeptor KO Tieren sowie in CTRP-3 / LDL-Rezeptor Doppel-Knockout Tieren jeweils unterteilt in 6 Wochen und 12 Wochen HFD. Es handelt sich um den Vergleich 2er Stichproben in unterschiedlichen Alterkohorten von Tieren.

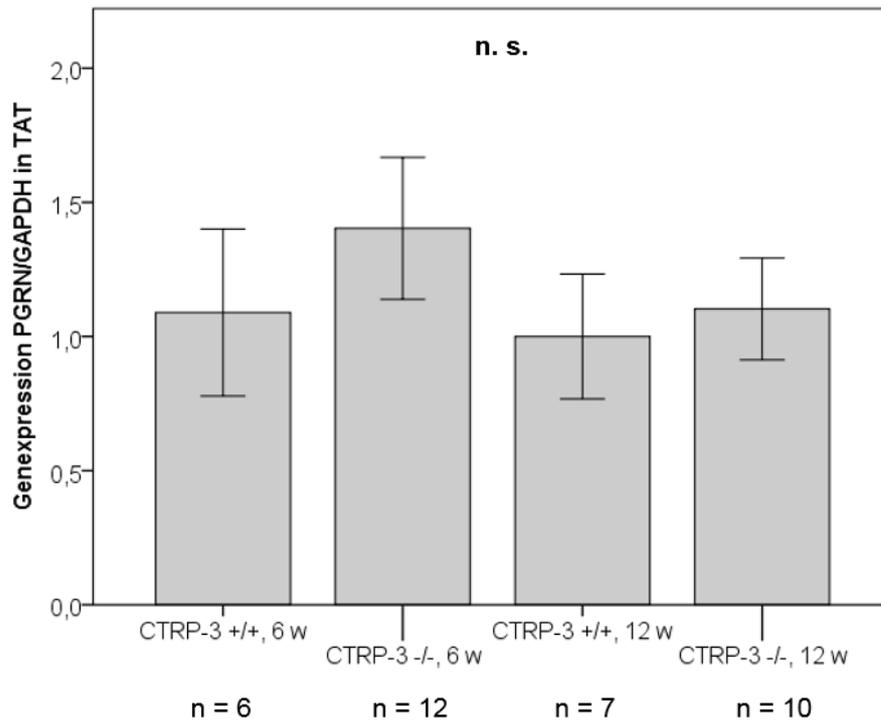


Abbildung 25: Relative PGRN Genexpression im TAT in LDL-Rezeptor KO Tieren sowie in CTRP-3 / LDL-Rezeptor Doppel-Knockout Tieren jeweils unterteilt in 6 Wochen und 12 Wochen HFD. Es handelt sich um den Vergleich 2er Stichproben in unterschiedlichen Alterkohorten von Tieren.

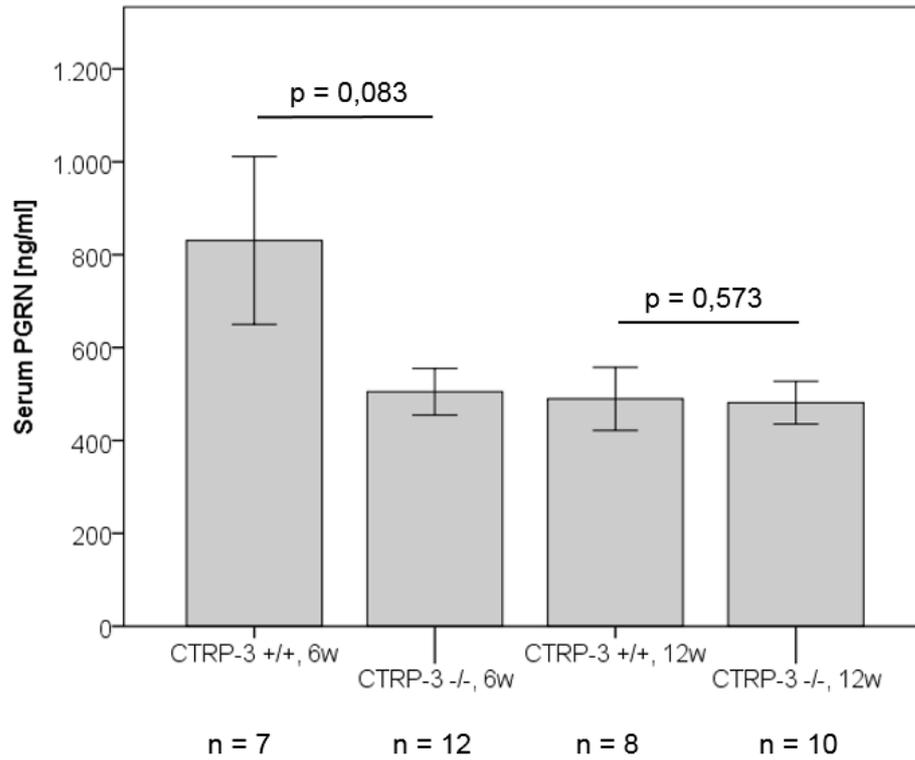


Abbildung 26: Serum PGRN Level in LDL-Rezeptor KO Tieren sowie in CTRP-3 / LDL-Rezeptor Doppel-Knockout Mäusen jeweils unterteilt in 6 Wochen und 12 Wochen HFD. Es handelt sich um den Vergleich 2er Stichproben in unterschiedlichen Alterkohorten von Tieren.

4.4 Immunmodulierende Effekte von PGRN

4.4.1 Einfluss von PGRN auf die TNF α -induzierte MCP-1-Genexpression

3T3-L1 Adipozyten wurden in getrennten Ansätzen für jeweils eine Stunde mit 1 $\mu\text{g/ml}$ und mit 3 $\mu\text{g/ml}$ an rekombinantem PGRN vorinkubiert und anschließend jeweils mit 2 ng/ml TNF α über 18 Stunden stimuliert. Neben diesen Co-Stimulationsansätzen erfolgten auch Einzelstimulationen mit PGRN bzw. TNF α in den genannten Konzentrationen. Die Messung der Genexpression von MCP-1 (normiert auf GAPDH) in den beiden Einzelstimulationen mit PGRN zeigte eine dosisabhängige Steigerung der Genexpression. In beiden Ansätzen war die verstärkte Genexpression im Vergleich zur Kontrollstimulation mit Wasser mit einem p-Wert von jeweils 0,03 signifikant (Abb.27). Ebenfalls wies die alleinige Stimulation mit 2 ng/ml TNF α eine, im Vergleich zur Stimulation mit PGRN sehr viel stärkere, Erhöhung der Genexpression von MCP-1 auf (p-Wert=0,008) (Abb.27). Die Co-Stimulation von 1 $\mu\text{g/ml}$ PGRN und TNF α zeigte im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TNF α einen leichten, nicht signifikanten Rückgang der MCP-1-Level, jedoch im Vergleich zur Wasserkontrolle eine weiterhin deutlich signifikante Erhöhung (p-Wert=0,009) (Abb.27). Der Ansatz mit 3 $\mu\text{g/ml}$ PGRN und TNF α zeigte einen ähnlichen Effekt wie die TNF α -Einzelstimulation, ebenfalls mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit einem p-Wert von 0,008 (Abb.27). Bei Anwendung der Bonferroni-Kurzformel für multiples Testen ergibt sich ein Signifikanz-Niveau von genau 0,008. Neben diesen Stimulationen wurde eine PGRN und TNF α Co-Stimulation in serumarmem (1% FCS) statt serumfreiem Medium durchgeführt. Die 3T3-L1 Zellen wurden dafür eine bzw. drei Stunden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ PGRN in serumarmem Medium vorstimuliert und anschließend für 18 Stunden 2 ng/ml TNF α hinzugegeben. Daneben wurde je ein Ansatz mit 1 $\mu\text{g/ml}$ PGRN und mit 2 ng/ml TNF α stimuliert. Die PGRN Stimulation zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von MCP-1 auf, jedoch die Tendenz eines leichten Rückgangs der Genexpression (p-Wert=0,052) (Abb.28). Die Einzelstimulation mit TNF α wies wie unter serumfreien Bedingungen auch unter serumarmen Bedingungen eine signifikant erhöhte Genexpression von MCP-1 auf (p-Wert=0,004) (Abb.28). Eine noch weiter verstärkte Genexpression von MCP-1 war in dem Ansatz, der eine Stunde mit PGRN vorbehandelt wurde, zu messen. Hier zeigte sich sowohl ein signifikanter Unterschied zur Kontrollstimulation mit Wasser (p-Wert=0,004) als auch zur Einzelstimulation mit TNF α (p-Wert=0,015)

(Abb.28). Beim letzten Ansatz, der eine dreistündige Vorbehandlung mit PGRN erhielt, war wieder ein Rückgang der Genexpression zu verzeichnen. Die Genexpression von MCP-1 war jedoch mit einem p-Wert von 0,004 im Vergleich zur Kontrolle weiterhin signifikant erhöht (Abb.28), auch nach Bonferroni-Korrektur mit einem adaptierten p-Wert von 0,01.

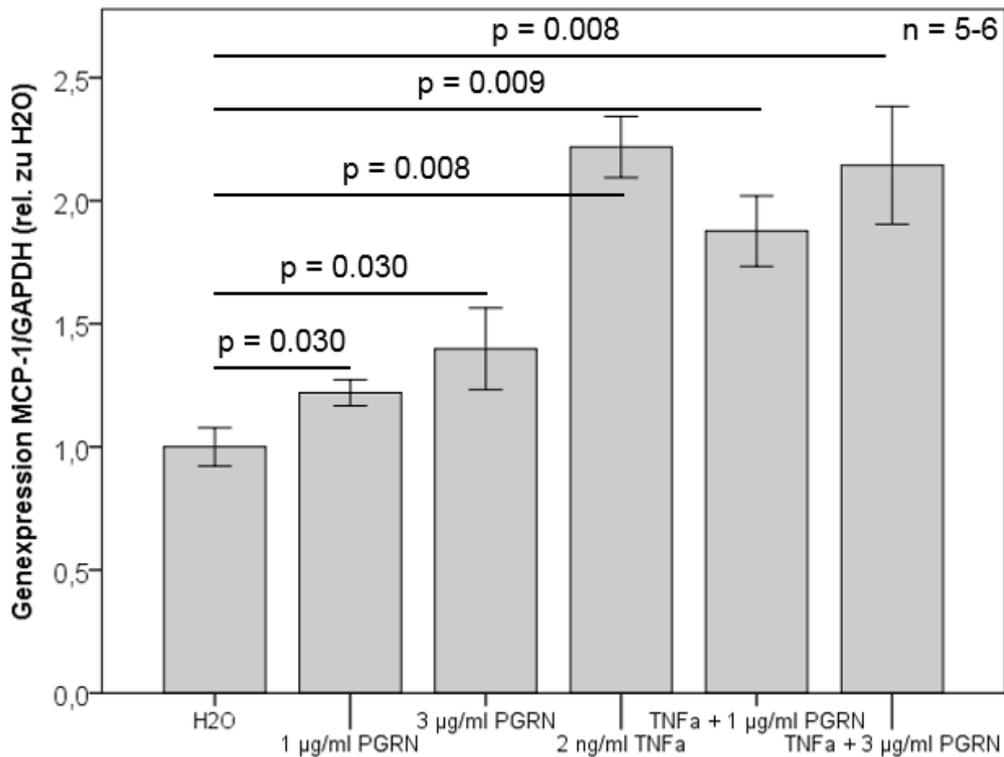


Abbildung 27: Relative MCP-1 Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1 und 3 µg/ml PGRN, 2 ng/ml TNFα und einstündiger Vorinkubation mit 1 und 3 µg/ml PGRN und Co-Stimulation mit 2 ng/ml TNFα. Bei Anwendung der Bonferroni-Kurzformel (p-korrigiert = p/n Gruppen) für multiples Testen ergibt sich ein entsprechend niedrigeres Signifikanz-Niveau von 0,008.

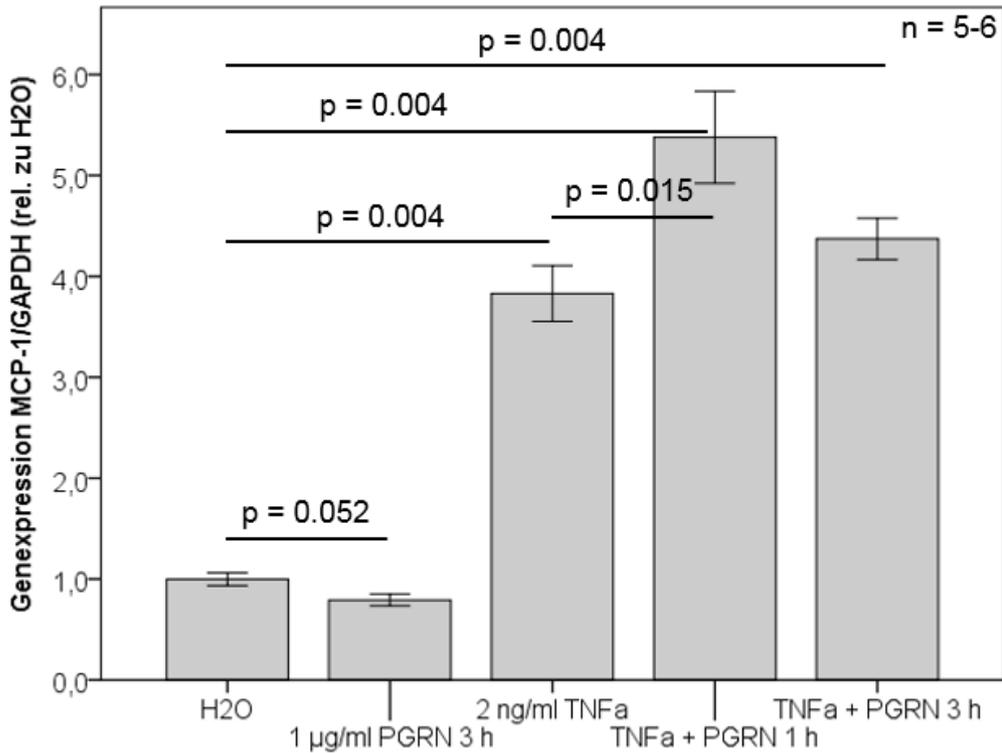


Abbildung 28: Relative MCP-1 Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten unter serumarmen Bedingungen nach Stimulation mit 1 µg/ml PGRN und 2 ng/ml TNFα und ein- oder dreistündiger Vorinkubation mit 1 µg/ml PGRN und Co-Stimulation mit 2 ng/ml TNFα. Bei Anwendung der Bonferroni-Kurzformel (p-korrigiert = p/n Gruppen) für multiples Testen ergibt sich ein entsprechend niedrigeres Signifikanz-Niveau von 0,01.

Neben den Genexpressionsanalysen von MCP-1 in der Co-Stimulation von PGRN und TNFα wurde auch die Proteinexpression untersucht. Die 3T3-L1 Zellen wurden für 18 Stunden mit 0,5 µg/ml PGRN und 10 ng/ml TNFα stimuliert, sowie mit beiden Substanzen in den genannten Konzentrationen gemeinsam. Anschließend wurde die MCP-1 Konzentration im Überstand unter Verwendung des ELISA bestimmt. Die Stimulation mit PGRN zeigte keine Unterschiede in der MCP-1 Konzentration im Vergleich zur Kontrollstimulation. Bei der Stimulation mit TNFα hingegen war eine starke, signifikante Erhöhung der MCP-1 Konzentration zu verzeichnen. Die Co-Stimulation beider Substanzen wies keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen Stimulation mit TNFα auf. Diese Daten sind hier nicht gezeigt.

4.4.2 Einfluss von CTRP-3 auf die Poly(I:C)-induzierte PGRN-Expression

Zellen der Linie 3T3-L1 wurden mit 10 µg/ml CTRP3 30 Minuten vorinkubiert, und anschließend in separaten Ansätzen mit 1 µg/ml oder mit 10 µg/ml Poly(I:C) für 18 Stunden stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen nur mit 1 und 10 µg/ml Poly(I:C) stimuliert und ebenfalls eine Kontroll-Stimulation mit Wasser durchgeführt. Bei der Stimulation mit 1 µg/ml Poly(I:C) war eine vermehrte Genexpression von PGRN normiert auf den GAPDH im Vergleich zur Wasser-Kontrolle zu messen (p-Wert=0,002) (Abb.29). Bei der Co-Stimulation mit CTRP-3 wurde dieser Effekt nochmals verstärkt und zeigte signifikante Unterschiede sowohl zur Wasser-Kontrolle mit einem p-Wert von 0,002 als auch zur alleinigen Poly(I:C) Stimulation mit einem p-Wert von 0,015 (Abb.29). Der Ansatz mit 10 µg/ml Poly(I:C) zeigte im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls einen deutlichen Anstieg der PGRN Genexpression, der mit einem p-Wert von 0,065 jedoch nicht statistisch signifikant war (Abb.30). Die Co-Stimulation mit CTRP-3 zeigte in diesem Ansatz eine signifikante Verstärkung der Genexpression von PGRN im Vergleich zur Wasser-Kontrolle (p-Wert=0,026), jedoch nicht im Vergleich zur Stimulation mit 10 µg/ml Poly(I:C) (Abb.30). Allerdings ist hier nach Bonferroni-Korrektur nicht länger von einem signifikanten Effekt auszugehen.

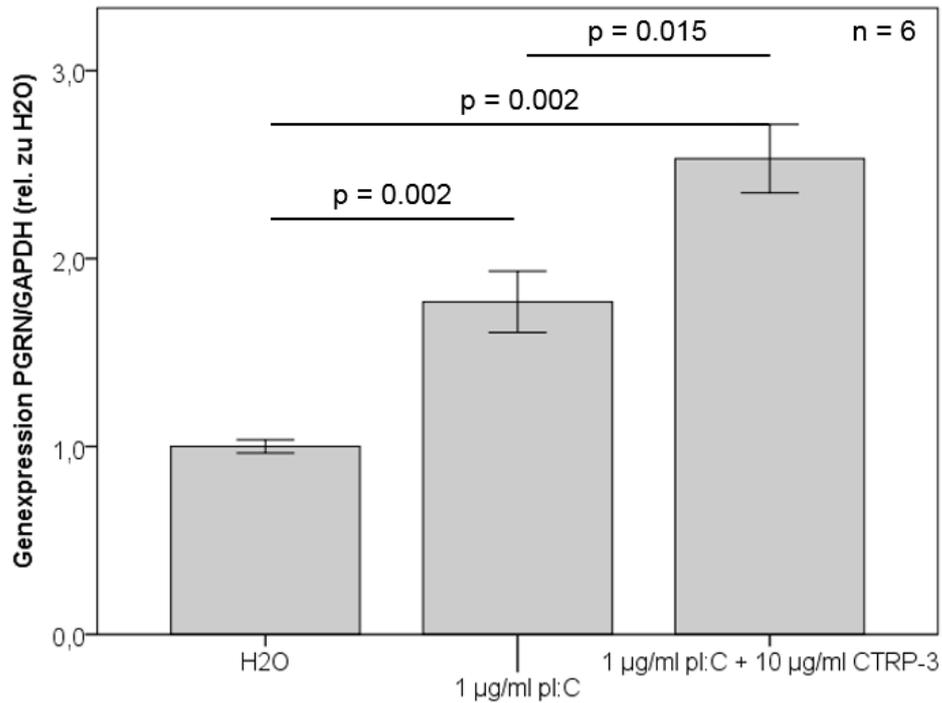


Abbildung 29: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1 µg/ml Poly(I:C) und 30-minütiger Vorinkubation mit CTRP-3 und Co-Stimulation mit Poly(I:C). Bei Anwendung der Bonferroni-Kurzformel (p -korrigiert = p/n Gruppen) für multiples Testen ergibt sich ein entsprechend niedrigeres Signifikanz-Niveau von 0,016.

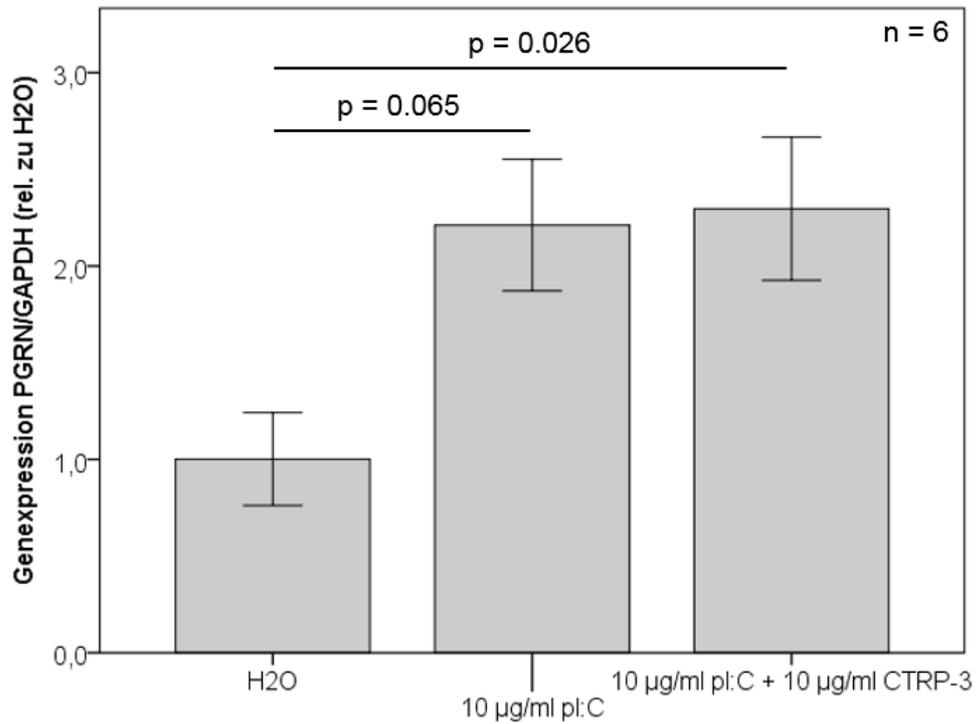


Abbildung 30: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 10 µg/ml Poly(I:C) und 30-minütiger Vorinkubation mit CTRP-3 und Co-Stimulation mit Poly(I:C). Bei Anwendung der Bonferroni-Kurzformel (p -korrigiert = p/n Gruppen) für multiples Testen ergibt sich ein entsprechend niedrigeres Signifikanz-Niveau von 0,016.

4.4.3 Einfluss von CAMP auf die ODN1585-induzierte PGRN-Expression

Es erfolgte eine Stimulation über 18 Stunden der Zellen der Linie 3T3-L1 mit 3 µg/ml CAMP und mit 20 µg/ml ODN 1585. Neben den beiden Einzelstimulationen wurden beide Substanzen in den genannten Konzentrationen zuvor gemischt und wurden nach gemeinsamer Vorinkubation (eine Stunde bei 37°C) auf die Zellen geben. Die Messung der PGRN Genexpression (normiert auf GAPDH) zeigte weder bei der Einzelstimulation mit CAMP noch mit dem ODN 1585 einen signifikanten Unterschied zur Wasser-Kontrolle (Abb.31). Auch bei der Kombinationsstimulation mit beiden Substanzen wurde keine wesentliche Veränderung der PGRN Genexpression beobachtet (Abb.31).

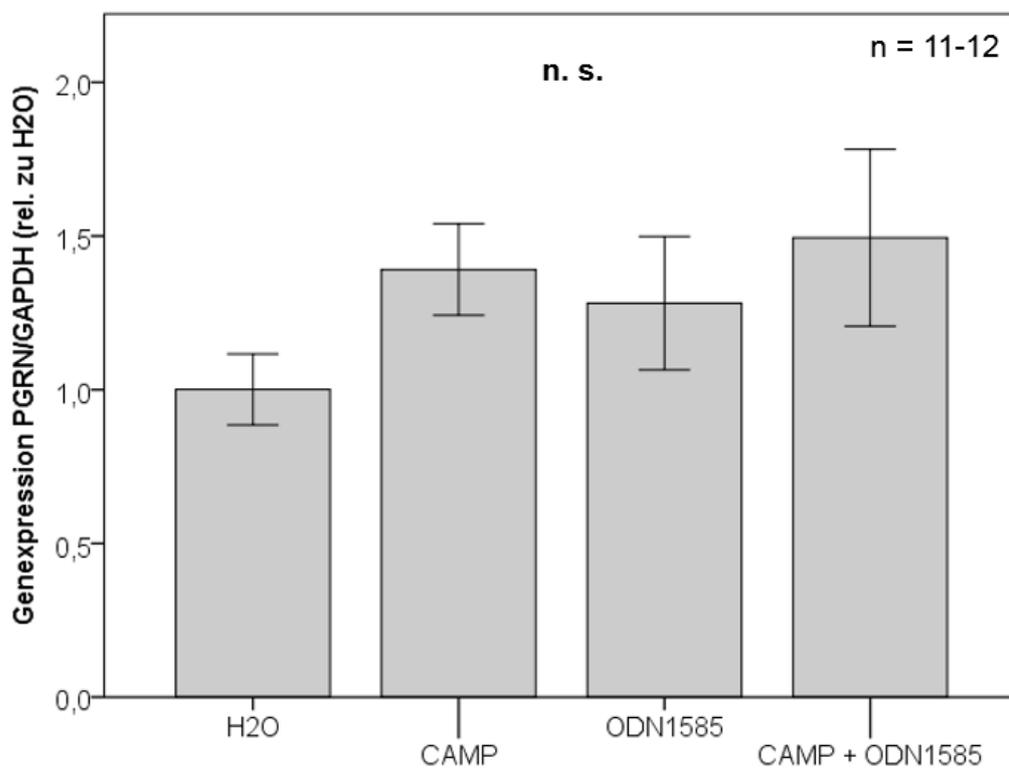


Abbildung 31: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 3 µg/ml CAMP, 20 µg/ml ODN 1585 und Co-Stimulation von CAMP und ODN1585

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Diskussion

Übergewicht stellt einen Risikofaktor für Typ 2 Diabetes, Bluthochdruck, Kardiovaskuläre Erkrankungen und Tumorerkrankungen dar. Ursächlich dafür ist unter anderem eine durch Übergewicht -bedingte Veränderung des Fettgewebes (Ballak et al. 2015; Kern et al. 2018). Dabei kommt es bei Übergewicht zu einer Hypertrophie der Fettzellen, zur Infiltration von Immunzellen (u.a. Makrophagen) in das Fettgewebe sowie zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Adipokinen. Durch diesen Zustand chronischer Entzündung entsteht zusätzlich eine veränderte Stoffwechsellage, die dann als Metaflammation bezeichnet werden kann (Hotamisligil 2017). Diese Metaflammation verstärkt die Adipoflammation (den Entzündungszustand im Fettgewebe), und es folgen Auswirkungen auf den Metabolismus und das Immunsystem, wie beispielsweise die Entstehung von Insulinresistenzen und Tumorerkrankungen (Ballak et al. 2015; Kern et al. 2018; Hotamisligil 2017).

PGRN stellt einen Wachstumsfaktor dar, der beteiligt ist an Zellzyklus, Wundheilung, Angiogenese und Tumorentstehung (Smitka und Marešová 2015). PGRN als endokrin wirksamer Faktor wird u.a. auch von Fettzellen produziert und stellt somit ein Adipokin dar, das bei Patienten mit Übergewicht und Typ 2 Diabetes vermehrt im Serum auftritt (Qu et al. 2013). Da ebenfalls gezeigt wurde, dass PGRN über IL-6 an der Entstehung von Hochfett-induzierter Insulinresistenz beteiligt ist (Matsubara et al. 2012), kommt PGRN im Kontext von Fettgewebe und Inflammation eine besondere Rolle zu, die noch in vielen Aspekten ungeklärt, für künftige therapeutische Anwendungen im Bereich metabolischer Erkrankungen jedoch von großem Interesse ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem murinen Zellkulturmodell die PGRN Genexpression nach Stimulation mit verschiedenen metabolischen und inflammatorischen Substanzen untersucht. Dies erlaubt Rückschlüsse darauf zu ziehen, unter welchen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen Adipozyten PGRN exprimieren. Da besonders die Rolle von PGRN im entzündlichen Zustand des Fettgewebes von Interesse ist, wurden in diesem Zusammenhang die Auswirkungen von verschiedenen TLRs auf PGRN untersucht, da TLRs bekanntlich an inflammatorischen Signalwegen bei Infekten

und Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Zusätzlich wurde gezeigt, dass TLRs auf Adipozyten exprimiert werden und dort aktiv sind. Am bekanntesten ist dabei der Effekt von LPS auf die adipozytäre TLR-4-Aktivierung. (Hotamisligil 2017; Kopp et al. 2010).

Des Weiteren wurde die PGRN Genexpression während der adipozytären Differenzierung der murinen 3T3-L1 Zellen gemessen, sowie in den beiden Fettgewebszellfraktionen, bestehend aus der SVF und Adipozyten, jeweils im SAT und VAT analysiert. Um die verschiedenen Effekte der Einzelstimulationsversuche besser zu untersuchen und die Wirkung von PGRN im Fettgewebe genauer zu verstehen, wurden Co-Stimulationen mit mehreren Substanzen durchgeführt. Das generell sowohl anti-als auch proinflammatorisch wirksame PGRN, scheint im Fettgewebe eher eine proinflammatorische Rolle einzunehmen, da die Genexpression durch inflammatorische Stimuli hochreguliert wird und eine von Tang et al. beschriebene Inhibition der TNF α -Bindung in Chondrozyten an den TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 durch PGRN im verwendeten Zellmodell nicht gezeigt werden konnte.

Neben den in vitro Experimenten wurde PGRN in vivo als Protein im Serum sowie als mRNA im Fettgewebe von Mäusen mit einem Adipozyten-spezifischen CTRP-3 Knockout bestimmt. CTRP-3 stellt ein gut charakterisiertes anti-inflammatorisches Adipokin dar, das gemeinsam mit PGRN auf seinen Zusammenhang mit Entzündung, Atherosklerose und dem Metabolischen Syndrom untersucht wurde. Aus der Literatur sind gegenteilige Effekte von PGRN und CTRP-3 bekannt, so ist PGRN positiv korreliert mit Entzündungsparametern wie IL-6 und CRP sowie mit Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms, währenddessen CTRP-3 negative Korrelationen aufweist (Yoo et al. 2013). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell soll dazu beitragen, den Zusammenhang zwischen CTRP-3 und PGRN besser zu verstehen. Da beide Parameter auch im Zusammenhang der Atherosklerose diskutiert werden (Kojima et al. 2009; Yoo et al. 2013; Berghoff et al. 2016), wurde PGRN im Serum und im Fettgewebe eines anderen Mausmodells bestimmt, das durch einen LDL-Rezeptor Knockout und einen zusätzlichen CTRP-3 Knockout charakterisiert war.

Die vorliegende Arbeit soll mit Hilfe von grundlagenwissenschaftlichen Experimenten zur Aufklärung der PGRN Expression in Adipozyten und im Fettgewebe beitragen.

5.2 Spezielle Diskussion

Die PGRN Genexpression wurde während der Differenzierung von murinen 3T3-L1 Fibroblasten zu reifen Adipozyten gemessen. Dabei ist eine bimodale Entwicklung der Expressionslevel zu vermerken, mit einem Maximum an Tag 3, also eher zu Beginn der Differenzierung, und einem weiteren Maximum an Tag 9, am Ende der Differenzierung in voll ausgereiften lipidbeladenen Adipozyten. Dies zeigt, dass PGRN während der Differenzierung von murinen Adipozyten reguliert ist. Dies ist plausibel, da PGRN initial als Wachstumsfaktor identifiziert wurde (Mendsaikhan et al. 2019). PGRN könnte somit auch als Wachstumsfaktor im Fettgewebe wirken. Um zu klären, wie genau PGRN als Wachstumsfaktor wirkt, werden in Zukunft mechanistische Untersuchungen zur Signaltransduktion erforderlich sein. Auf Grund des bimodale Expressionsmusters könnte PGRN auch als mittlerer und sehr später Marker der Adipozyten-Differenzierung betrachtet werden. Darüber könnten Genexpressionsanalysen Klarheit verschaffen, in denen während der adipozytären Differenzierung sowohl PGRN als auch bereits bekannte Marker der Adipozyten Differenzierung vergleichend quantifiziert werden (Schäffler et al. 2006) (vgl. 1.2.3). Ebenfalls wäre eine Messung an einer humanen Zelllinie von Interesse. Um zu untersuchen, wie groß der Anteil des spezifisch von den Adipozyten produzierten PGRN im Vergleich zum PGRN ist, das vom gesamten Fettgewebe produziert wird, wurde die PGRN Genexpression in Zellen der SVF und Adipozyten sowohl in murinem epididymalem als auch in murinem subkutanem Fettgewebe bestimmt. Dabei fiel auf, dass in beiden Fettgeweben die Zellen der SVF deutlich mehr PGRN mRNA exprimieren als Adipozyten. Dies untermauert, dass PGRN zwar ein Adipokin ist, jedoch kein vorwiegend von Adipozyten exprimiertes sekretorisches Protein ist, da es auch von anderen Zellen als Adipozyten produziert wird. In welchem der beiden Fettgewebetypen (VAT oder SAT) hierbei die PGRN-Expression stärker ist, wurde bislang noch nicht geklärt. Eine Studie von Youn et al. beschrieb eine vermehrte PGRN Genexpression im VAT, während eine neuere Studie von Brock et al. eine höhere PGRN Genexpression im SAT feststellte (Youn et al. 2009; Brock et al. 2019). Anzumerken ist hierbei jedoch der Unterschied in den beiden Studienkollektiven, da Youn et al. die Genexpression sowohl in übergewichtigen als auch normalgewichtigen Probanden bestimmten, Brock et al. hingegen ausschließlich in adipösen Probanden. Auch die Auswirkungen der PGRN Sekretion des Fettgewebes auf die systemischen PGRN Level sind umstritten. Zwar werden in vielen Studien höhere PGRN Werte im Serum von übergewichtigen Patienten beschrieben

(Youn et al. 2009; Qu et al. 2013), und Youn et al. beschreibt auch eine positive Korrelation zwischen der PGRN Genexpression im VAT mit systemisch zirkulierendem PGRN, wohingegen Brock et al. eine solche Korrelation zwischen der PGRN Genexpression im Fettgewebe und systemischem PGRN im Serum nicht feststellen konnten. Um genauer zu klären, welches Fettgewebe mehr PGRN produziert und welche Auswirkungen dies auf PGRN Serumwerte hat, und ob dies in Abhängigkeit von Gewicht und Verteilung zwischen VAT und SAT steht, müssen in Zukunft weitere Studien mit entsprechenden Patientenkollektiven erfolgen. Unabhängig davon ist unzweifelhaft, dass PGRN vom Fettgewebe und hier auch von Adipozyten synthetisiert wird und eine wichtige, wenngleich noch nicht in allen Aspekten klare, Rolle in der Fettgewebsinflammation spielt.

Mehr Einigkeit herrscht in der Literatur über die häufig beschriebenen positiven Korrelationen zwischen PGRN und HbA1c und IL-6 (Youn et al. 2009; Matsubara et al. 2012; Yoo et al. 2013; Brock et al. 2019). Dies passt zu den ebenfalls häufig festgestellten erhöhten PGRN Werten bei Typ 2 Diabetikern (Qu et al. 2013; Youn et al. 2009) und legt eine mögliche Beteiligung von PGRN bei der Entstehung oder Progression dieser Erkrankung nahe. Durch Matsubara et al. wurde gezeigt, dass PGRN über IL-6 einen Mediator der Diät-induzierten Insulinresistenz darstellt und somit die Untersuchung von PGRN im Fettgewebe, das ebenfalls durch seine Veränderungen bei Adipositas an der Entstehung von Insulinresistenzen beteiligt ist, von großem Interesse ist. Stimulationsversuche mit niedrigen und hohen Glucosekonzentrationen, auch in Kombination mit Insulin, zeigten bei murinen 3T3-L1 Adipozyten keine Auswirkungen auf die PGRN Genexpression oder Proteinexpression (Schmid et al. 2019a). Eine direkte Wirkung von hohen Blutzuckerspiegeln bei Diabetikern auf die PGRN Expression im Fettgewebe scheint somit nicht ausschlaggebend für die erhöhten PGRN Serumwerte zu sein. Inkretine wie GLP-1 und GIP werden nach Nahrungsaufnahme im Gastrointestinaltrakt ausgeschüttet, hemmen die Gluconeogenese in der Leber sowie die weitere Nahrungsaufnahme und fördern die Insulinausschüttung und Proliferation von β -Zellen im Pankreas (González-García et al. 2019). Eine normale Inkretin-Ausschüttung wirkt daher protektiv gegen die Entstehung von Diabetes und ist bei Diabetikern häufig erniedrigt. Um zu untersuchen, wie Inkretine auf PGRN im Fettgewebe wirken, wurden murine 3T3-L1 Adipozyten mit 100 nM GLP-1 und 100 nM GIP stimuliert. Beide Substanzen inhibierten die PGRN Genexpression nur diskret und halten einer Korrektur für multiples Testen bei niedrigen Fallzahlen (noch)

nicht stand. Daher sollen künftig diese Versuche mit höheren Fallzahlen wiederholt werden. Inkretine könnten über die Hemmung von PGRN protektiv bei der Entstehung von Insulinresistenz wirken. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch metabolische Substanzen Einfluss auf die PGRN Genexpression in Adipozyten haben. 3T3-L1 Adipozyten wurden mit verschiedenen Gallensäuren stimuliert (100 μ M CA, 10 μ M DCA und 50 μ M UDCA), da diese durch Binden an den Farnesoid X Rezeptor (FXR) und den Takeda G Protein-gekoppelten Rezeptor (TGR5) beteiligt sind am Fett- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel und an Entzündungen. Des Weiteren tritt häufig bei Übergewicht und Diabetes eine Veränderung des Gallensäure-Metabolismus auf (Chávez-Talavera et al. 2017). In den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zeigten CA und UDCA ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die PGRN Genexpression. Dass DCA hingegen keinen Effekt auf die PGRN Genexpression zeigte, könnte ein Hinweis auf die Bedeutung der unterschiedlichen Strukturen der Gallensäuren für ihre spezifischen regulatorischen Funktionen sein. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass DCA eine sekundäre Gallensäure darstellt und CA zu der Gruppe der primären und UDCA zu den tertiären Gallensäuren gehört. Andere Arbeiten mit Gallensäuren und deren Wirkung auf Entzündungsreaktionen im Fettgewebe haben gezeigt, dass Gallensäuren funktional an Adipozyten wirken und dabei anti-inflammatorische Effekte aufweisen (Schmid et al. 2019b). Da Gallensäuren die PGRN Genexpression in Fettzellen zu hemmen scheinen, stimmt dies mit der Hypothese überein, dass PGRN aus Adipozyten vermehrt pro-inflammatorisch wirkt und bei Inflammation verstärkt ausgeschüttet wird. Durch die Gallensäure- und Inkretin-Stimulationen konnte ferner gezeigt werden, dass PGRN in Adipozyten durch metabolische Stimuli reguliert wird. Diese Tatsache könnte ein möglicher Grund für die erhöhten PGRN-Werte bei Diabetikern sein.

Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) erkennen sogenannte pathogen associated molecular patterns (PAMP) und danger associated molecular pattern (DAMP) und aktivieren als Komponenten des angeborenen Immunsystems bei Infektionen oder Entzündungen Signalwege, welche die Expression von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen induzieren. TLRs gehören zu der Klasse der PRRs und sind bekannt für ihre inflammatorischen Signalwege bei Infekten und Entzündungsreaktionen. Im Menschen sind zur Zeit 10 Rezeptoren der TLR-Familie bekannt (Ballak et al. 2015). Es wurde gezeigt, dass TLRs auf Adipozyten exprimiert werden und deren Aktivierung auf diesen einen Entzündungszustand in den Zellen hervorruft, wodurch Adipozyten auch eine Rolle im innaten Immunsystem zukommt (Kopp et al. 2010). Es wird diskutiert, inwieweit die

TLRs durch ihre proinflammatorische Wirkung an der chronischen Entzündung des Fettgewebes, wie sie bei Adipositas und dem Metabolischen Syndrom auftritt, und somit auch an der Entstehung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes beteiligt sind. Da PGRN nachweislich an Insulinresistenz-Bildung mitwirkt (Matsubara et al. 2012) und auch mit Fettgewebsentzündungen und dem Metabolischen Syndrom in Verbindung gebracht wird (Qu et al. 2013), wurden zur Prüfung der Hypothese, dass PGRN durch TLRs in Adipozyten induziert wird, murine 3T3-L1 Adipozyten mit verschiedenen TLR-Agonisten stimuliert. Tatsächlich zeigten fast alle TLR-Agonisten mit Ausnahme des TLR-9 Agonisten ODN1585 eine zumeist statistische signifikante Induktion der PGRN Genexpression, wodurch ein Hinweis auf eine Rolle von PGRN im innate Immunsystem und der Fettgewebsentzündung gegeben ist. Der TLR-3, welcher virale mRNA und mRNA apoptotischer Zellen erkennt, wurde stimuliert mit 10 µg/ml Poly(I:C) und zeigte eine starke und signifikante (p-Wert=0,002) Induktion der PGRN Genexpression. In vitro Versuche haben gezeigt, dass TLR-3 während der Differenzierung von Adipozyten exprimiert wird und bei Aktivierung für die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-8 und MCP-1, verantwortlich ist (Ballak et al. 2015). Zusätzlich wurde festgestellt, dass TLR-3 stärker auf Adipozyten als auf Zellen der SVF exprimiert wird, TLR-3 defiziente Mäuse jedoch nicht geschützt sind vor Hochfett-induziertem Übergewicht, Insulinresistenz oder Makrophagen-Infiltration in das Fettgewebe (Ballak et al. 2015). Die Studienlage passt zu der Entdeckung von PGRN als ein durch TLR-3 induziertes proinflammatorisches Adipokin und zeigt eine Möglichkeit, wie PGRN während der Differenzierung von Adipozyten induziert werden könnte. Dazu müssten in Zukunft weitere Versuche laufen, um zu überprüfen, ob der TLR-3 die PGRN Genexpression während der Differenzierung beeinflusst. Der TLR-5 erkennt Flagellin und wurde mit seinem Liganden (Flagellin 100ng/ml) stimuliert, das ein wichtiges Protein in der Geißel von Bakterien darstellt (Hug et al. 2018). Der Effekt auf die PGRN Genexpression bestand in einer sehr moderaten Verstärkung. Auch dies spricht für die Beteiligung von Adipozyten durch PGRN im innate Immunsystem, die jedoch nicht Schwerpunkt dieser Arbeit war, und daher in künftigen Studien untersucht werden sollte. Imiquimod (IMQ) stellt einen bekannten Aktivator des TLR-7 dar, der auf Immunzellen bei Aktivierung zu einer vermehrten Produktion von IFN α und TNF α führt, sowie von IL-6 und IL-8 (Voiculescu et al. 2019). Deshalb und weil IMQ die Apoptose von Tumorzellen fördert, wird es bei der Therapie von Hauttumoren verwendet (Voiculescu et al. 2019). Auf Adipozyten scheint

der TLR-7 ebenfalls über Imiquimod aktivierbar zu sein, und sorgt hier für eine signifikante Induktion (p -Wert $<0,001$) der PGRN Genexpression. Da TLR-7 für seine entzündungsmodulierenden Effekte durch die gesteigerte Produktion proinflammatorischer Stoffe wie beispielweise Interleukinen bekannt ist, bestätigt dies die Sicht auf PGRN als ein über TLR-7 induzierbares eher proinflammatorisch wirkendes Adipokin. Ebenfalls bei der Krebstherapie auf Grund seiner Wirkung über TLR-7 eingesetzt wird Gardiquimod (GARD), welches die Zellproliferation hemmt und die Apoptose fördert (Chi et al. 2017). Die Stimulation der Adipozyten mit $1\mu\text{g/ml}$ GARD zeigte statistisch nicht signifikante Tendenzen einer Induktion von PGRN. Der molekulare Strukturunterschied zwischen IMQ und GARD könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse ursächlich sein. Insgesamt zeigt sich eine Bestätigung der Hypothese von PGRN als proinflammatorisches Adipokin, welches über TLR-7 induziert wird. Auch der TLR-9, welcher freie bakterielle, nicht methylierte DNA erkennt (Thomalla et al. 2019), wurde auf murinen und humanen Adipozyten festgestellt und als funktional beschrieben. In vitro konnte gezeigt werden, dass der TLR-9 schon während der Differenzierung von murinen Adipozyten exprimiert wird und eine Stimulation des TLR-9 von murinen Adipozyten zu einer Inhibierung der Genexpression von Resistin und MCP-1 führt und somit TLR-9 in Adipozyten eher anti-inflammatorische Effekte vermittelt (Thomalla et al. 2019). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Effekten der TLR-9 Stimulation auf PGRN, da ab einer höheren Dosis ($20\mu\text{g/ml}$) des Agonisten ODN 1585 eine Inhibierung der PGRN Genexpression beobachtet wurde. Allerdings muss dieses interessante Ergebnis noch durch höhere Fallzahlen in seiner Signifikanz bestätigt werden.

CTRP-3 ist ein Adipokin, das zur Familie der CTRPs gehört und insbesondere für seine anti-inflammatorischen Eigenschaften bekannt ist, wie das Abschwächen von inflammatorischen Signalwegen, Erhöhung der Adipokinsekretion und Steigerung der Zellproliferation (Li et al. 2017). Die Beteiligung von CTRP-3 an Metabolismus und metabolischen Erkrankungen wie Adipositas und Typ 2 Diabetes wird diskutiert. Mehrere Studien haben erniedrigte CTRP-3 Level bei Typ 2 Diabetikern (Moradi et al. 2019) und negative Korrelationen von CTRP-3 zu Cholesterinwerten und Hüftumfang (Yoo et al. 2013) berichtet. Zudem besteht eine negative Assoziation von CTRP-3 mit proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-6, wie auch im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass CTRP-3 einen LPS-induzierten Entzündungszustand mildern kann (Li et al. 2017). Da in Zellkulturversuchen festgestellt wurde, dass CTRP-3 die Sekretion von proinflammatorischen

Adipokinen aus Adipozyten inhibiert (Moradi et al. 2019), wurde die Hypothese aufgestellt, dass CTRP-3 auch einen inhibitorischen Effekt auf die Sekretion von PGRN in Adipozyten hat. Dazu wurden in einem Adipozyten-spezifischen CTRP-3 Knockout Mausmodell die Serumspiegel sowie die Genexpression von PGRN im subkutanen und gonadalen AT bestimmt. Im Serum von 6 Monaten alten Tieren wiesen weibliche CTRP-3 Knockout-Tiere signifikant (p -Wert=0,019) mehr PGRN auf als die weiblichen Kontroll-Tiere, überdies hatten weibliche Knockout-Tiere höhere PGRN-Spiegel (p -Wert=0,001) als männliche Knockout-Tiere. In den meisten Studien wurden in weiblichen Probanden oder Tieren höhere CTRP-3 Spiegel festgestellt als in männlichen (Li et al. 2017). Dies könnte erklären, warum kein Unterschied zwischen männlichen Knockout- und Kontroll-Tieren zu erkennen war, da aufgrund der generell geringeren basalen CTRP-3 Expression der Knockout-Effekt nicht ausreichte, um Serumspiegel von PGRN signifikant zu verändern. Ebenso wurden auch für PGRN in weiblichen Mäusen höhere Spiegel sowohl im gonadalen AT als auch im SAT im Vergleich zu männlichen Mäusen beobachtet (Schmid et al. 2019a). Dieser geschlechtsspezifische Effekt konnte nicht in den 6 Monate alten Kontroll-Tieren, jedoch in den 12 Monate alten Kontroll-Tieren festgestellt werden, hier zeigten sich signifikant höhere PGRN Werte (p -Wert=0,015) bei den Weibchen als bei den Männchen. In Zellkulturversuchen mit 3T3-L1 Adipozyten konnten keine direkten Auswirkungen von Testosteron oder Estradiol auf die PGRN Expression festgestellt werden (Schmid et al. 2019a), sodass ein direkter Effekt der Geschlechtshormone zumindest auf die adipozytäre Expression unwahrscheinlich ist und noch nicht bekannte Faktoren für die teilweise geschlechtsunterschiedlichen PGRN Level beeinflussend wirken. Für humane Kollektive ist die Datenlage zu Geschlechtsunterschieden von systemischen PGRN-Level nicht eindeutig (Brock et al. 2019), jedoch wurden beispielsweise bei weiblichen Patienten mit Alzheimer auch höhere PGRN Spiegel festgestellt (Piscopo et al. 2013). In den 12 Monate alten Mäusen wurden sowohl bei den Kontroll-Tieren (p -Wert=0,015) als auch bei den Knockout-Tieren (p -Wert=0,001) höhere PGRN Serum Werte bei den Weibchen als bei den Männchen festgestellt. Diese Beobachtung bekräftigt die teilweise beschriebenen Geschlechtsunterschiede bei CTRP-3 und PGRN und ist weniger durch die Auswirkungen vom CTRP-3-Knockout auf die PGRN Expression entstanden, da sich bei Betrachtung der nur männlichen und weiblichen 12 Monate alten Tiere kein Unterschied zwischen Kontroll- und Knockout-Tieren ergab. In einer humanen Studie mit übergewichtigen Probanden, in der PGRN im Serum und Fettgewebe bestimmt wurde, konnte kein Zusammenhang zwischen den PGRN Serum-Werten und

der Expression im Fettgewebe bestimmt werden (Brock et al. 2019). Auch im CTRP-3-Knockout Maus-Modell wurde die PGRN Genexpression zusätzlich im gonadalen AT, das in seiner Funktion dem VAT entspricht, und SAT bestimmt. Hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren, und auch keine nennenswerten zwischen Knockout- und Kontroll-Tieren, wodurch auch hier kein Zusammenhang zwischen der Genexpression von PGRN im Fettgewebe und PGRN Serumwerten gezeigt werden konnte. Insgesamt konnte kein eindeutiger Effekt des CTRP-3 Knockouts in Adipozyten auf PGRN weder auf Genexpressionsniveau noch systemisch im Serum festgestellt werden. Obwohl bei 6 Monate alten Weibchen signifikant höhere PGRN-Level in den Knockout- im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen beobachtet wurden, konnte die Hypothese, dass CTRP-3 PGRN inhibiert nicht hinreichend belegt werden und ist noch nicht eindeutig geklärt. Es zeigten sich zugleich Tendenzen dahingehend, dass weibliche Knockout-Tiere mehr PGRN im Serum aufwiesen als Männchen, jedoch muss in weiteren Versuchen geklärt werden, ob dieser Effekt tatsächlich durch den CTRP-3 Knockout zustande gekommen ist, oder durch andere geschlechtsspezifische Wirkungen von CTRP-3 und PGRN überlagert wurde.

CTRP-3 und PGRN werden auch im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose diskutiert, da bei Adipositas und dem Metabolischen Syndrom durch den veränderten Fettstoffwechsel und die Veränderungen des Fettgewebes ein erhöhtes Risiko für solche Erkrankungen entsteht. In einer Studie von Yoo et al. war CTRP-3 negativ korreliert mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Gesamtcholesterin und Blutfetten, während PGRN mit Risikofaktoren positiv korreliert war (Yoo et al. 2013). Passend dazu wird CTRP-3 als kardioprotektiv beschrieben, da es die Endothelzellenproliferation und die Angiogenese fördert. Zudem verbessert exogen zugeführtes CTRP-3 nach Myokardinfarkt bei Mäusen das Überleben der Tiere und die Herzfunktion und inhibiert das pathologische Remodeling (Li et al. 2017). In Bezug auf Atherosklerose kann CTRP-3 möglicherweise die inflammatorische Antwort und die endotheliale Dysfunktion minimieren (Chen et al. 2019). Da gezeigt wurde, dass Serum PGRN positiv korreliert ist mit LDL-Werten im Blut (Berghoff et al. 2016) und PGRN von glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen in atherosklerotischen Plaques exprimiert wird (Kojima et al. 2009), scheint PGRN eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und dem Verlauf der Atherosklerose zu spielen. Während allgemein vermehrt PGRN in Zusammenhang mit Risikofaktoren für die Atherosklerose beschrieben wird, haben Kojima et al. in

ihrer Studie eine entzündungshemmende Wirkung von PGRN festgestellt und erst seine Spaltung in Granuline als progressionsfördernd für die Atherosklerose beschrieben (Kojima et al. 2009). Alles in allem ist die Rolle von PGRN bei der Atherosklerose nicht vollständig klar. Um zu untersuchen, ob CTRP-3 in einem atherosklerotischen Zustand Auswirkungen auf die PGRN Expression in Adipozyten hat, wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von PGRN im thorakalen Fett und weißem Bauchfett von männlichen Mäusen gemessen, die durch einen LDL-Rezeptor Knockout und eine 6- oder 12-wöchige HFD eine Atherosklerose entwickelt hatten. Dabei wurden Tiere mit ausschließlichem LDL-Rezeptor Knockout mit solchen verglichen, die zusätzlich einen Adipozyten-spezifischen CTRP-3 Knockout aufwiesen. In der Gruppe der 6-wöchigen HFD lag bei den Tieren mit zusätzlichem CTRP-3 Knockout eine erhöhte PGRN Genexpression im WAT vor. Dass bei den Tieren nach einer 12-wöchigen HFD kein diesbezüglicher Unterschied festzustellen war, könnte darauf hinweisen, dass PGRN vermehrt zu Beginn einer Atherosklerose bzw. eines entzündlichen Zustandes exprimiert wird und dies durch CTRP-3 moduliert wird. Schmid et al haben gezeigt, dass ein zellulärer knockdown von CTRP-3 mit Hilfe von siRNA in 3T3-L1 Zellen eine Verminderung der Sekretion von proinflammatorischen Adipokinen wie Resistin bewirkt hat, ebenso wie eine schlechtere Differenzierungskapazität (Schmid et al. 2012). Dies lässt die Überlegung zu, dass ein CTRP-3 Knockout auch zu einer Verminderung des proinflammatorischen PGRN in den Mäusen führen könnte. Möglicherweise ist dies auch der Grund dafür, dass in den älteren Mäusen kein Effekt auf die PGRN Genexpression zu sehen war, da die Adipozyten auf Grund des Knockouts zu schlecht differenziert waren. Die genaue Natur eines solchen regulatorischen Zusammenhangs sowie zugrunde liegende Mechanismen sind noch unklar und bedürfen der Aufklärung durch künftige Versuche. Ergänzend wäre insbesondere eine Untersuchung von PGRN in gesunden Kontroll-Tieren von Interesse, um zu untersuchen, ob eine generelle Steigerung der PGRN Genexpression im WAT bei Atherosklerose auftritt. Im TAT konnte keine Veränderung der PGRN Genexpression festgestellt werden. Das TAT ist ein Fettgewebe, das hauptsächlich in der Nähe von Gefäßen lokalisiert ist und in seiner Funktion eher dem braunen Fettgewebe ähnelt. So ist es etwa an der Thermogenese und zusätzlich lokalisationsbedingt an der Weitstellung von Gefäßen beteiligt, im Gegensatz zum WAT, das endokrin aktiver ist (van Dam et al. 2017). Voneinander abweichende Effekte der CTRP-3-Defizienz auf die PGRN Expression in TAT und WAT erscheinen vor diesem Hintergrund nicht ungewöhnlich. Andererseits

verändert sich auch das TAT bei Übergewicht und verliert seine gefäßrelaxierende Wirkung und produziert vermehrt proinflammatorische Zytokine, jedoch in geringerem Ausmaß als das abdominale Fettgewebe (van Dam et al. 2017). Möglicherweise war die Dauer der HFD lediglich nicht ausreichend genug, um auch im TAT eine Wirkung auf die PGRN Genexpression zu zeigen. Bezüglich der PGRN-Serumkonzentrationen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu erkennen, lediglich eine für die untersuchte Stichprobe nicht signifikante Tendenz höherer PGRN Werte in Mäusen ohne zusätzlichen CTRP-3 Knockout nach 6 Wochen HFD. In diesem Tiermodell konnte somit kein eindeutiger auf Ebene der systemischen Konzentrationen effektiver Zusammenhang zwischen CTRP-3 und PGRN hergestellt werden. Die beobachteten Effekte im weißen Fettgewebe sind allerdings geeignet, die Hypothese eines auto- oder parakrinen inhibitorischen Effekts von CTRP-3 auf die adipozytäre PGRN Expression auch im entzündlichen Kontext der Atherosklerose zu unterstützen.

Zur weiteren Untersuchung der Effekte von CTRP-3 und anderer immunmodulierender Substanzen auf PGRN, wurden Co-Stimulationsversuche mit murinen 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt. Die Stimulation des TLR-3 auf murinen Adipozyten zeigte eine besonders deutliche Induktion der PGRN Genexpression. In einem weiteren Versuch sollte die Hypothese geprüft werden, ob eine Zugabe von exogenem CTRP-3 (10µg/ml) diese Induktion inhibiert. Hier wurde kein inhibitorischer, sondern ein zusätzlicher induzierender Effekt von CTRP-3 auf die TLR-3-vermittelte PGRN Genexpression festgestellt. Die Zugabe von CTRP-3 zur Stimulation mit dem TLR-3-Agonisten Poly(I:C) (1µg/ml) zeigte eine signifikante Induktion sowohl zur Vektor-Kontrolle (p-Wert=0,002) als auch zur alleinigen Stimulation mit Poly(I:C). Da CTRP-3 bislang fast ausschließlich für seine antiinflammatorischen Eigenschaften bekannt ist, könnte diese Induktion zeigen, dass PGRN aus Adipozyten nicht nur proinflammatorischen Charakter hat, sondern möglicherweise auch antiinflammatorisch und somit als Modulator von Entzündungen wirken kann. Da TLRs an der Infektabwehr beteiligt sind und Effekte auf PGRN zeigten, sollte in einem Co-Stimulationsversuch der TLR-9 genauer untersucht werden, welcher als einziger inhibitorische Effekte auf PGRN zeigte. Es wurde die Hypothese getestet, dass dieser inhibitorische Effekt durch Zugabe eines sekretorischen Proteins, das bekanntlich von Adipozyten zur Infektabwehr ausgeschüttet wird, verstärkt wird. Zusätzlich zur Stimulation mit ODN1585 wurden murine 3T3-L1 Adipozyten mit 3µg/ml CAMP co-stimuliert, für

welches gezeigt wurde, dass es bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* von Adipozyten produziert wird und wesentlich an der Infektabwehr mitwirkt (Zhang et al. 2015). Hier wurden *in vitro* keine Auswirkungen auf die PGRN Genexpression beobachtet, weder durch CAMP allein noch in Verbindung mit ODN1585. Die Hypothese konnte daher nicht bestätigt werden.

PGRN wird in der Literatur bezüglich seiner antiinflammatorischen Eigenschaften kontrovers diskutiert. Eine davon ist die von Tang et al. beschriebene inhibitorische Wirkung von PGRN auf TNF α in Chondrozyten, indem es an den TNFR1 und TNFR2 bindet und diesen blockiert (Tang et al. 2011). In der Studie von Tang et al. wurde PGRN daher als wichtiger Modulator von Entzündungen bei Arthritis diskutiert. Um die Hypothese zu prüfen, dass PGRN in Adipozyten hingegen proinflammatorisch wirkt, sollte dieser Effekt von PGRN auf murinen 3T3-L1 Adipozyten untersucht werden. Hierbei diente als Marker für die inflammatorische Antwort der Adipozyten die Genexpression von MCP-1, welches als proinflammatorisches, chemotaktisch wirkendes Zytokin für die Einwanderung von Monozyten in das Fettgewebe und die Aktivierung von Makrophagen verantwortlich ist (Shimobayashi et al. 2018). Bereits eine alleinige Stimulation mit PGRN zeigte eine dosisabhängige Induktion der MCP-1 Genexpression, was die proinflammatorische Wirkung von PGRN in Adipozyten bestätigt. Allerdings müssen hier diese ersten Ergebnisse noch durch höhere Fallzahlen in der biostatistischen Signifikanz untermauert werden. Die Stimulation mit TNF α bewirkte ebenfalls eine Induktion der MCP-1 Genexpression. Durch eine Vorinkubation mit zwei verschiedenen Konzentrationen von PGRN konnte dieser Effekt von TNF α auf die MCP-1 Genexpression nicht verändert werden. Für Adipozyten konnte der inhibitorische Effekt von PGRN auf TNF α -induzierte Signalwege somit nicht bestätigt werden, sondern es wurde eher ein zusätzlicher MCP-1 induzierender Effekt von PGRN beobachtet. Da nicht geklärt ist, in welcher Form PGRN im Organismus wirkt, könnte PGRN auch gespalten als Granuline am TNFR1 oder TNFR2 binden, obwohl diese im Gegensatz zu ihrem Vorläuferprotein PGRN für ihre fast ausschließlich proinflammatorischen Eigenschaften bekannt sind (Mendsaikhan et al. 2019; Park et al. 2011). Um zu untersuchen, ob die Blockierung von TNF α durch Granuline an Adipozyten ausgelöst wird, wurde der Versuch unter serumarmen (1% FCS) statt komplett serumfreien Bedingungen durchgeführt, wodurch eine Spaltung von PGRN in Granuline unter den Inkubationsbedingungen ermöglicht wurde. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte die Stimulation mit PGRN allein keine Induktion der MCP-1 Genexpression und somit keine Auswirkungen im Vergleich zur Kontrollstimulation, obwohl

Granuline generell als proinflammatorisch gelten. Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ zeigte wie erwartet eine Induktion von MCP-1, die durch Vorinkubation mit PGRN für eine Stunde grenzwertig signifikant erhöht wurde. Dieses Ergebnis könnte die proinflammatorischen Eigenschaften der Granuline bestätigen und gegen einen inhibitorischen Effekt an TNFR1 und TNFR2 sprechen. Die 3-stündige Vorinkubation mit PGRN zeigte den gleichen Effekt wie die alleinige $\text{TNF}\alpha$ Stimulation. Dies könnte daraufhin deuten, dass der Effekt der Granuline zeitlich begrenzt ist bzw. diese nach längerer Zeit weiter abgebaut werden. Klarheit hierüber können künftige weitere Signaltransduktionsversuche schaffen. Insgesamt konnte in Adipozyten kein inhibitorischer Effekt von PGRN auf die $\text{TNF}\alpha$ vermittelte Inflammation gezeigt werden, hingegen wurde eine proinflammatorische Wirkung in Adipozyten zumindest bezüglich der MCP-1 Expression bestätigt, sowie eine mögliche proinflammatorische Wirkung von Granulinen in Adipozyten beobachtet.

6. Zusammenfassung

Adipositas und das Metabolische Syndrom sind weltweit verbreitet und gehören zu den wichtigsten Faktoren bei der Entstehung von Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2, Hypertonie und Atherosklerose und sind somit entscheidend bei der Entstehung von Herzinfarkten und Schlaganfällen, welche zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen. Da das Fettgewebe und seine Adipokine eine entscheidende Rolle bei Adipositas und dem Metabolischen Syndrom spielen, sind die Erforschung der Fettgewebsentzündung und immunmodulierender Adipokine von besonders großem Interesse. PGRN stellt ein solches Adipokin dar, das im Serum von Patienten mit Übergewicht und Typ 2 Diabetes vermehrt auftritt und über IL-6 an der Entstehung von Hochfett-induzierter Insulinresistenz beteiligt ist. Mit Hilfe von quantitativer Real Time PCR und ELISA wurden zum einen in Zellkultur die Genexpression von PGRN unter verschiedenen Bedingungen in murinen Adipozyten (der Zelllinie 3T3-L1) und zum anderen in vivo Serum-PGRN-Level in transgenen Mäusen bestimmt, um die Regulation der PGRN-Expression in Adipozyten zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass PGRN sowohl von Adipozyten als auch von Zellen der stromal-vaskulären Funktion (SVF) in murinem subkutanem und epididymalen Fettgewebe produziert wird und bereits während der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen eine Genexpression von PGRN als möglicher Wachstumsfaktor stattfindet. Kurz erwähnt sei, dass dabei die Zellen der SVF mehr PGRN exprimierten als Adipozyten. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die PGRN Genexpression in murinen Adipozyten durch metabolische und inflammatorische Stimuli beeinflusst wird. So bewirkt die Stimulation von TLRs (TLR-3,-5,-7), die allgemein inflammatorische Signalwege bei Infekten und Entzündungsreaktionen induzieren, eine signifikante Verstärkung der Genexpression von PGRN. Anti-inflammatorisch wirkende Gallensäuren und Inkretine, die protektiv gegen Insulinresistenz wirken, inhibieren hingegen die PGRN-Genexpression. Eine Stimulation der murinen Adipozyten mit exogenem PGRN sorgte für eine erhöhte Genexpression des inflammatorischen Adipokins MCP-1, wohingegen kein inhibitorischer Effekt von PGRN auf die Wirkung von TNF α auch unter verschiedenen Versuchsbedingungen gezeigt werden konnte. In Mäusen mit Adipozyten-spezifischem Knockout des antiinflammatorischen Adipokins CTRP-3 wurden in 6 Monate alten Weibchen höhere PGRN Serum-Level festgestellt als in den weiblichen Kontroll-Tieren. Ferner wurden innerhalb Gruppen gleichen Genotyps (Kontroll- bzw.

Knockout-Tiere) bei Weibchen höhere PGRN-Serum-Level als bei Männchen beobachtet. In einem Maus-Modell mit Diät induzierter Atherosklerose bestehen ebenfalls Tendenzen in Richtung einer vermehrten PGRN-Genexpression in Mäusen mit CTRP-3-Knockout.

Insgesamt konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass adipozytäres PGRN vermehrt unter pro-inflammatorischen Bedingungen produziert wird und seine Wirkung in Adipozyten eher als pro-inflammatorisch zu bewerten ist. Eine bedeutende Rolle von PGRN bei der Fettgewebsentzündung - und so der Entstehung von Insulinresistenz und Atherosklerose im Rahmen des Metabolischen Syndroms - ist daher wahrscheinlich. Entscheidende Signalwege und Wirkungen von PGRN in diesem Kontext sind bislang weitgehend noch unklar und sind in zukünftigen experimentellen Ansätzen von fundamentalem Interesse.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Genexpression von PGRN in Adipozyten unter inflammatorischen Stimuli stark ansteigt. Da besonders eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen vorliegt, könnte PGRN eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen (Metaflammation und Adipoflammation) des Fettgewebes bei Adipositas spielen und somit auch bei der Entstehung von Typ 2 Diabetes und anderen Adipositas assoziierten Erkrankungen (Atherosklerose) wesentlich beteiligt sein. Die Ergebnisse dieser grundlagenwissenschaftlichen Arbeit zeigen das Potenzial von PGRN als mögliches Ziel-Protein bei der Therapie von Adipositas und Typ 2 Diabetes. Somit haben diese Forschungsarbeiten ein translationales Potential.

Summary

Obesity and the metabolic syndrome are spread worldwide and are the most important factors in the development of diseases such as type 2 diabetes mellitus, hypertension and atherosclerosis. Therefore, they are crucial in the development of coronary artery disease and strokes, which are among the most common causes of death in Germany. Because adipose tissue and its adipokines play a causative role in obesity and the metabolic syndrome, investigation of inflammatory process of the adipose tissue and immunomodulating adipokines are of particular interest. PGRN is such an adipokine, which occurs in higher concentrations in serum of patients with obesity and type 2 diabetes and is involved in the development of obesity-induced insulin resistance via IL-6. By using quantitative real time PCR and ELISA, gene expression of PGRN was determined under various conditions in murine adipocytes (cell line 3T3-L1) in cell culture. In vivo, serum PGRN levels in transgenic mice were determined in order to investigate the regulation of PGRN secretion in adipocytes.

In the present work it was shown that PGRN is produced by adipocytes as well as by cells of the stromal-vascular function in murine subcutaneous and epididymal adipose tissue and that gene expression of PGRN might function as a possible growth factor during the differentiation of preadipocytes to mature fat cells. It was also observed that PGRN gene expression in murine adipocytes is regulated by metabolic and inflammatory stimuli. For example, stimulation of TLRs (TLR-3, -5, -7) significantly enhances PGRN gene expression. In contrast, anti-inflammatory bile acids and incretins, which have a protective effect against insulin resistance, inhibit PGRN gene expression. Stimulation of murine adipocytes with exogenous PGRN resulted in an increased gene expression of the inflammatory adipokine MCP-1, whereas no inhibitory effect of PGRN on TNF α could be shown even under different experimental conditions. In mice with adipocyte-specific knockout of the anti-inflammatory adipokine CTRP-3, higher PGRN serum levels were found in 6-month-old females than in the female control animals. Furthermore, within groups of the same genotype (control or knockout animals), higher PGRN serum levels were observed in females than in males. Also, in a mouse model with diet-induced atherosclerosis, there are tendencies towards increased PGRN gene expression in mice with CTRP-3 knockout.

Taken together, the results of this work showed that adipocytic PGRN is increasingly produced under pro-inflammatory conditions and that its effect in adipocytes can be

interpreted as mainly pro-inflammatory. Therefore, an important role of PGRN in adipose inflammation, in the development of insulin resistance and atherosclerosis and in the context of the metabolic syndrome is likely. So far, decisive signaling pathways and effects of PGRN in this context are largely unknown and will be of fundamental interest in future experiments.

This work has shown that the gene expression of PGRN in adipocytes increases sharply under inflammatory stimuli. Furthermore, PGRN could play a central role in the inflammation process (metaflammation and adipoflammation) of adipose tissue in obesity and may also play a major role in the development of type 2 diabetes and other obesity-associated diseases (atherosclerosis). The results of this basic scientific work show the potential of PGRN as a possible target protein in the therapy of obesity and type 2 diabetes. Thus, there is some translational potential of the work presented here.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung der murinen 3T3-L1 Zelllinie	28
Abbildung 2: Oil Red O Färbung an Tag 8 der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.....	29
Abbildung 3: Relative PGRN Genexpression während der Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie an Tag 0,3,5,7 und 9	45
Abbildung 4: Relative PGRN Genexpression in murinem epididymalem Fettgewebe von 12 Monate alten black-6 Mäusen (C57BL/6, Wildtyp) - Vergleich zwischen Zellen der SVF (SVC) und Adipozyten	46
Abbildung 5: Relative PGRN Genexpression in murinem subkutanem Fettgewebe von 12 Monate alten black.6 Mäusen (C57BL/6, Wildtyp) - Vergleich zwischen Zellen der SVF (SVC) und Adipozyten	47
Abbildung 6: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 100 μ M CA, 10 μ M DCA und 50 μ M UDCA.....	49
Abbildung 7: Relative PGRN Genexpression von 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 100 nM GLP-1 und 100 nM GIP	50
Abbildung 8: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 10 μ g/ml Poly(I:C) und 100 ng/ml Flagellin	52
Abbildung 9: Relative PGRN Genexpression nach Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten mit 5 μ g/ml Imiquimod (IMQ).....	53
Abbildung 10: Relative PGRN Genexpression von 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1 μ g/ml Gardiquimod (GARD).....	53
Abbildung 11: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1, 5 und 20 μ g/ml ODN1585	54
Abbildung 12: Serum PGRN Level in weiblichen 6 Monate alten CTRP-3 Knockout- und Kontroll-Tieren.....	56
Abbildung 13: Serum PGRN Level in männlichen 6 Monate alten CTRP-3 Knockout- und Kontroll-Tieren.....	56
Abbildung 14: Serum PGRN Level in weiblichen und männlichen 6 Monate alten Kontroll-Tieren.....	57
Abbildung 15: Serum PGRN Level in weiblichen und männlichen 6 Monate alten CTRP-3 Knockout-Tieren	57
Abbildung 16: Serum PGRN Level in 12 Monate alten weiblichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren	58

Abbildung 17: Serum PGRN Level in 12 Monate alten männlichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren.....	58
Abbildung 18: Serum PGRN Level in 12 Monate alten weiblichen und männlichen Kontroll-Tieren.....	59
Abbildung 19: Serum PGRN Level in 12 Monate alten weiblichen und männlichen CTRP-3 Knockout-Tieren	59
Abbildung 20: Relative PGRN Genexpression im gonadalen AT von 6 Monate alten weiblichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren	60
Abbildung 21: Relative PGRN Genexpression im gonadalen AT von 6 Monate alten männlichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren	61
Abbildung 22: Relative PGRN Genexpression im SAT von 6 Monate alten weiblichen Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren.....	61
Abbildung 23: Relative PGRN Genexpression im SAT von männlichen 6 Monate alten Kontroll- und CTRP-3-Knockout-Tieren.....	62
Abbildung 24: Relative PGRN Genexpression im WAT in LDL-Rezeptor KO Tieren sowie in CTRP-3 / LDL-Rezeptor Doppel-Knockout Tieren jeweils unterteilt in 6 Wochen und 12 Wochen HFD	64
Abbildung 25: Relative PGRN Genexpression im TAT in LDL-Rezeptor KO Tieren sowie in CTRP-3 / LDL-Rezeptor Doppel-Knockout Tieren jeweils unterteilt in 6 Wochen und 12 Wochen HFD	65
Abbildung 26: Serum PGRN Level in LDL-Rezeptor KO Tieren sowie in CTRP-3 / LDL-Rezeptor Doppel-Knockout Mäusen jeweils unterteilt in 6 Wochen und 12 Wochen HFD.....	66
Abbildung 27: Relative MCP-1 Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1 und 3 µg/ml PGRN, 2 ng/ml TNFα und einstündiger Vorinkubation mit 1 und 3 µg/ml PGRN und Co-Stimulation mit 2 ng/ml TNFα.....	68
Abbildung 28: Relative MCP-1 Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten unter serumarmen Bedingungen nach Stimulation mit 1 µg/ml PGRN und 2 ng/ml TNFα und ein- oder dreistündiger Vorinkubation mit 1 µg/ml PGRN und Co-Stimulation mit 2 ng/ml TNFα.....	69
Abbildung 29: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 1 µg/ml Poly(I:C) und 30-minütiger Vorinkubation mit CTRP-3 und Co-Stimulation mit Poly(I:C)	71

Abbildung 30: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 10 µg/ml Poly(I:C) und 30-minütiger Vorinkubation mit CTRP-3 und Co-Stimulation mit Poly(I:C).....	72
Abbildung 31: Relative PGRN Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 3 µg/ml CAMP, 20 µg/ml ODN 1585 und Co-Stimulation von CAMP und ODN1585	73

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	15
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	17
Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme	19
Tabelle 5: Verwendete ELISA-Kits	19
Tabelle 6: Medien für die Differenzierung der 3T3-L1 Zelllinie.....	19
Tabelle 7: Lösungen für die Oil Red O Färbung.....	20
Tabelle 8: Lösungen für die RNA-Isolierung	20
Tabelle 9: Lösungen für die Gelelektrophorese	21
Tabelle 10: Zusammensetzung des RIPA-Puffer	21
Tabelle 11: Lösungen und Puffer für den ELISA allgemein	21
Tabelle 12: Lösungen für den PGRN ELISA.....	22
Tabelle 13: Lösungen für den MCP-1 ELISA	22
Tabelle 14: Verwendete Enzyme	23
Tabelle 15: Primer für die Real-Time PCR mit spezifischer Schmelztemperatur und Zyklenzahl.....	23
Tabelle 16: Primer für die Amplifikation muriner Gene (PCR) mit Schmelztemperatur und Zyklenzahl.....	24
Tabelle 17: Stimulationsansätze der 3T3-L1 Zelllinie.....	30

9. Literaturverzeichnis

Alcalá, Martín; Calderon-Dominguez, María; Serra, Dolors; Herrero, Laura; Viana, Marta (2019): Mechanisms of Impaired Brown Adipose Tissue Recruitment in Obesity. In: *Frontiers in physiology* 10, S. 94. DOI: 10.3389/fphys.2019.00094.

Aldinucci, Donatella; Casagrande, Naike (2018): Inhibition of the CCL5/CCR5 Axis against the Progression of Gastric Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 19 (5). DOI: 10.3390/ijms19051477.

Arechavaleta-Velasco, Fabian; Perez-Juarez, Carlos Eduardo; Gerton, George L.; Diaz-Cueto, Laura (2017): Progranulin and its biological effects in cancer. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 34 (12), S. 194. DOI: 10.1007/s12032-017-1054-7.

Ballak, Dov B.; van Asseldonk, Edwin J. P.; van Diepen, Janna A.; Jansen, Henry; Hijmans, Anneke; Joosten, Leo A. B. et al. (2015): TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. In: *PloS one* 10 (4), e0123152. DOI: 10.1371/journal.pone.0123152.

Barbatelli, G.; Murano, I.; Madsen, L.; Hao, Q.; Jimenez, M.; Kristiansen, K. et al. (2010): The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298 (6), E1244-53. DOI: 10.1152/ajpendo.00600.2009.

Benomar, Yacir; Taouis, Mohammed (2019): Molecular Mechanisms Underlying Obesity-Induced Hypothalamic Inflammation and Insulin Resistance: Pivotal Role of Resistin/TLR4 Pathways. In: *Frontiers in endocrinology* 10, S. 140. DOI: 10.3389/fendo.2019.00140.

Berghoff, Martin; Hochberg, Alexandra; Schmid, Andreas; Schlegel, Jutta; Karrasch, Thomas; Kaps, Manfred; Schäffler, Andreas (2016): Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. In: *European journal of clinical investigation* 46 (1), S. 15–26. DOI: 10.1111/eci.12558.

- Bischoff, Stephan C.; Basrai, Maryam; Teufel, Martin; Zipfel, Stephan (2017a): 6. Pathophysiologie der Folgeerkrankungen. In: Stephan C. Bischoff und Stephan C. Bischoff (Hg.): Adipositas. Berlin, Boston: De Gruyter, S. 127–156.
- Bischoff, Stephan C.; Bischoff, Stephan C. (Hg.) (2017a): Adipositas. Berlin, Boston: De Gruyter.
- Bischoff, Stephan C.; Bischoff, Stephan C. (Hg.) (2017b): Adipositas. Berlin, Boston: De Gruyter.
- Bischoff, Stephan C.; Hinney, Anke; Swienty, Lydia; Hebestreit, Katrin; Nieß, Andreas; Thiel, Ansgar; Ströbele-Benschop, Nanette (2017b): 3. Ursachen der Adipositas. In: Stephan C. Bischoff (Hg.): Adipositas. Neue Forschungserkenntnisse und klinische Praxis. Berlin, Boston: De Gruyter, S. 43–81.
- Bischoff, Stephan C.; Holl, Reinhard (2017): 1. Definition und Klassifikation von Übergewicht und Adipositas. In: Stephan C. Bischoff und Stephan C. Bischoff (Hg.): Adipositas. Berlin, Boston: De Gruyter, S. 16–30.
- Brock, Judith; Schmid, Andreas; Karrasch, Thomas; Pfefferle, Petra; Schlegel, Jutta; Busse, Inga et al. (2019): Progranulin serum levels and gene expression in subcutaneous vs visceral adipose tissue of severely obese patients undergoing bariatric surgery. In: *Clinical endocrinology*. DOI: 10.1111/cen.14040.
- Chávez-Talavera, Oscar; Tailleux, Anne; Lefebvre, Philippe; Staels, Bart (2017): Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Gastroenterology* 152 (7), 1679-1694.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.01.055.
- Chen, Lei; Qin, Lijun; Liu, Xin; Meng, Xiangyun (2019): CTRP3 Alleviates Ox-LDL-Induced Inflammatory Response and Endothelial Dysfunction in Mouse Aortic Endothelial Cells by Activating the PI3K/Akt/eNOS Pathway. In: *Inflammation*. DOI: 10.1007/s10753-019-00996-1.
- Chi, Huju; Li, Chunman; Zhao, Flora Sha; Zhang, Li; Ng, Tzi Bun; Jin, Guangyi; Sha, Ou (2017): Anti-tumor Activity of Toll-Like Receptor 7 Agonists. In: *Frontiers in pharmacology* 8, S. 304. DOI: 10.3389/fphar.2017.00304.

Elena Nikiphorou and George E. Fragoulis: Inflammation, obesity and rheumatic disease: common mechanistic links. A narrative review.

Enerbäck, Sven (2013): Adipose tissue plasticity and new therapeutic targets. In: *Nature reviews. endocrinology* (9), S. 69–70.

Ferreira, João Pedro; Santos, Mário (2015): Heart failure and atrial fibrillation: from basic science to clinical practice. In: *International journal of molecular sciences* 16 (2), S. 3133–3147. DOI: 10.3390/ijms16023133.

González-García, Ismael; Milbank, Edward; Diéguez, Carlos; López, Miguel; Contreras, Cristina (2019): Glucagon, GLP-1 and Thermogenesis. In: *International journal of molecular sciences* 20 (14). DOI: 10.3390/ijms20143445.

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

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

Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL (2017): Prevalence of obesity among adults and youth: United States, 2015-2016. NCHS data brief, no 288. Hyattsville, MD: In: *National Center for Health Statistics*.

Hien, Peter; Böhm, Bernhard (2005): *Diabetes-Handbuch. Eine Anleitung für Praxis und Klinik. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.* Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-27623-8>.

Hotamisligil, Gökhan S. (2017): Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. In: *Nature* (542), S. 177–185.

Hug, Hubert; Mohajeri, M. Hasan; La Fata, Giorgio (2018): Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. In: *Nutrients* 10 (2). DOI: 10.3390/nu10020203.

Jacob, Stephan; Bischoff, Stephan C.; Schmid, Sebastian M. (2017): 5. Endogene Mechanismen. In: Stephan C. Bischoff und Stephan C. Bischoff (Hg.): *Adipositas.* Berlin, Boston: De Gruyter, S. 96–126.

Kern, Lara; Mittenbühler, Melanie J.; Vesting, Anna Juliane; Ostermann, Anna Lena; Wunderlich, Claudia Maria; Wunderlich, F. Thomas (2018): Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation-Driven Liver and Colorectal Cancers. In: *Cancers* 11 (1). DOI: 10.3390/cancers11010024.

Kim, Hyun-Kyong; Shin, Mi-Seon; Youn, Byung-Soo; Namkoong, Churl; Gil, So Young; Kang, Gil Myoung et al. (2011): Involvement of progranulin in hypothalamic glucose sensing and feeding regulation. In: *Endocrinology* 152 (12), S. 4672–4682. DOI: 10.1210/en.2011-1221.

Kojima, Yoji; Ono, Koh; Inoue, Katsumi; Takagi, Yasushi; Kikuta, Ken-ichiro; Nishimura, Masaki et al. (2009): Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque. In: *Atherosclerosis* 206 (1), S. 102–108. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.017.

Kopp, Andrea; Buechler, Christa; Bala, Margarita; Neumeier, Markus; Schölmerich, Juergen; Schäffler, Andreas (2010): Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. In: *Endocrinology* 151 (3), S. 1097–1108. DOI: 10.1210/en.2009-1140.

Kos, Claudine H. (2004): Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. In: *Nutrition reviews* 62 (6 Pt 1), S. 243–246. DOI: 10.1301/nr2004.jun243-246.

Latorre, Jèssica; Moreno-Navarrete, José M.; Sabater, Mónica; Buxo, Maria; Rodriguez-Hermosa, José I.; Girones, Jordi et al. (2018): Decreased TLR3 in Hyperplastic Adipose Tissue, Blood and Inflamed Adipocytes is Related to Metabolic Inflammation. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 51 (3), S. 1051–1068. DOI: 10.1159/000495487.

Li, Qiling; Xu, Wei; Xue, Xue; Wang, Qi; Han, Lu; Li, Wenzhi et al. (2016): Presence of multimeric isoforms of human C-reactive protein in tissues and blood. In: *Molecular medicine reports* 14 (6), S. 5461–5466. DOI: 10.3892/mmr.2016.5922.

- Li, Ying; Wright, Gary L.; Peterson, Jonathan M. (2017): C1q/TNF-Related Protein 3 (CTRP3) Function and Regulation. In: *Comprehensive Physiology* 7 (3), S. 863–878. DOI: 10.1002/cphy.c160044.
- Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2019): Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Luong, Quyen; Huang, Jun; Lee, Kevin Y. (2019): Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. In: *Biology* 8 (2). DOI: 10.3390/biology8020023.
- Matsubara, Toshiya; Mita, Ayako; Minami, Kohtaro; Hosooka, Tetsuya; Kitazawa, Sohei; Takahashi, Kenichi et al. (2012): PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. In: *Cell metabolism* 15 (1), S. 38–50. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.12.002.
- Mendsaikhan, Anarmaa; Tooyama, Ikuo; Walker, Douglas G. (2019): Microglial Progranulin: Involvement in Alzheimer's Disease and Neurodegenerative Diseases. In: *Cells* 8 (3). DOI: 10.3390/cells8030230.
- Moradi, Nariman; Fadaei, Reza; Khamseh, Mohammad Ebrahim; Nobakht, Ali; Rezaei, Mohammad Jafar; Aliakbary, Fereshteh et al. (2019): Serum levels of CTRP3 in diabetic nephropathy and its relationship with insulin resistance and kidney function. In: *PloS one* 14 (4), e0215617. DOI: 10.1371/journal.pone.0215617.
- Ouchi, Noriyuki; Parker, Jennifer L.; Lugus, Jesse J.; Walsh, Kenneth (2011): Adipokines in inflammation and metabolic disease. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (2), S. 85–97. DOI: 10.1038/nri2921.
- Park, Boyoun; Buti, Ludovico; Lee, Sungwook; Matsuwaki, Takashi; Spooner, Eric; Brinkmann, Melanie M. et al. (2011): Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. In: *Immunity* 34 (4), S. 505–513. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.01.018.
- Piscopo, Paola; Rivabene, Roberto; Galimberti, Daniela; Crestini, Alessio; Talarico, Giuseppina; Vanacore, Nicola et al. (2013): Gender effects on plasma PGRN levels in patients with Alzheimer's disease: a preliminary study. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 35 (2), S. 313–318. DOI: 10.3233/JAD-121606.

Qu, Hua; Deng, Huacong; Hu, Zhenping (2013): Plasma progranulin concentrations are increased in patients with type 2 diabetes and obesity and correlated with insulin resistance. In: *Mediators of inflammation* 2013, S. 360190. DOI: 10.1155/2013/360190.

Schäffler, A.; Müller-Ladner, U.; Schölmerich, J.; Büchler, C. (2006): Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. In: *Endocrine reviews* 27 (5), S. 449–467. DOI: 10.1210/er.2005-0022.

Schmid, A.; Kopp, A.; Hanses, F.; Bala, M.; Müller, M.; Schäffler, A. (2012): The novel adipokine C1q/TNF-related protein-3 is expressed in human adipocytes and regulated by metabolic and infection-related parameters. In: *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 120 (10), S. 611–617. DOI: 10.1055/s-0032-1323803.

Schmid, Andreas; Hochberg, Alexandra; Kreiß, Anja Franziska; Gehl, Jonas; Patz, Marissa; Thomalla, Miriam et al. (2019a): Role of progranulin in adipose tissue innate immunity. In: *Cytokine* 125, S. 154796. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154796.

Schmid, Andreas; Schlegel, Jutta; Thomalla, Miriam; Karrasch, Thomas; Schäffler, Andreas (2019b): Evidence of functional bile acid signaling pathways in adipocytes. In: *Molecular and cellular endocrinology* 483, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.mce.2018.12.006.

Schulze, Matthias B. (2019): Metabolic health in normal-weight and obese individuals. In: *Diabetologia* 62 (4), S. 558–566. DOI: 10.1007/s00125-018-4787-8.

Scudamore, Cheryl L. (2014): *A practical guide to the histology of the mouse*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell. Online verfügbar unter <http://lib.myilibrary.com?id=560288>.

Serrero, Ginette (2003): Autocrine growth factor revisited: PC-cell-derived growth factor (progranulin), a critical player in breast cancer tumorigenesis. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308 (3), S. 409–413. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)01452-9.

Shimobayashi, Mitsugu; Albert, Verena; Woelnerhanssen, Bettina; Frei, Irina C.; Weissenberger, Diana; Meyer-Gerspach, Anne Christin et al. (2018): Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (4), S. 1538–1550. DOI: 10.1172/JCI96139.

- Smitka, Kvido; Marešová, Dana (2015): Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. In: *Prague medical report* 116 (2), S. 87–111. DOI: 10.14712/23362936.2015.49.
- Srivastava, Shireesh; Veech, Richard L. (2019): Brown and Brite: The Fat Soldiers in the Anti-obesity Fight. In: *Frontiers in physiology* 10, S. 38. DOI: 10.3389/fphys.2019.00038.
- Tang, Wei; Lu, Yi; Tian, Qing-Yun; Zhang, Yan; Guo, Feng-Jin; Liu, Guang-Yi et al. (2011): The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6028), S. 478–484. DOI: 10.1126/science.1199214.
- Thomalla, Miriam; Schmid, Andreas; Neumann, Elena; Pfefferle, Petra Ina; Müller-Ladner, Ulf; Schäffler, Andreas; Karrasch, Thomas (2019): Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR 9) pathway in adipocytes. In: *The Journal of endocrinology* 240 (2), S. 325–343. DOI: 10.1530/JOE-18-0326.
- Trayhurn, Paul; Beattie, John H. (2001): Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. In: *Proc. Nutr. Soc.* 60 (03), S. 329–339. DOI: 10.1079/PNS200194.
- van Dam, Andrea D.; Boon, Mariëtte R.; Berbée, Jimmy F. P.; Rensen, Patrick C. N.; van Harmelen, Vanessa (2017): Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. In: *European journal of pharmacology* 816, S. 82–92. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.03.051.
- Voiculescu, Vlad Mihai; Lisievici, Cristina Victoria; Lupu, Mihai; Vajaitu, Cristina; Draghici, Carmen Cristina; Popa, Alexandra Victoria et al. (2019): Mediators of Inflammation in Topical Therapy of Skin Cancers. In: *Mediators of inflammation* 2019, S. 8369690. DOI: 10.1155/2019/8369690.
- Wang, Zhao V.; Scherer, Philipp E. (2016): Adiponectin, the past two decades. In: *Journal of molecular cell biology* 8 (2), S. 93–100. DOI: 10.1093/jmcb/mjw011.
- World Health Organization, Regional Office for Europe (2013): Methodology and summary Country profiles on nutrition, physical activity and obesity in the 28 European Union Member States of the WHO European Region. Summary document 53 MS country profile. Unter Mitarbeit von Caroline Bollars, João Breda, Tina Kiaer, Misha Kouzeh,

- Lauren McGale, Inês Lança de Morais, Stephen Whiting, Trudy Wijnhoven. Hg. v. World Health Organization. World Health Organization, Regional Office for Europe.
- Yin, Fangfang; Banerjee, Rebecca; Thomas, Bobby; Zhou, Ping; Qian, Liping; Jia, Ting et al. (2010): Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (1), S. 117–128. DOI: 10.1084/jem.20091568.
- Yoo, Hye Jin; Hwang, Soon Young; Hong, Ho Cheol; Choi, Hae Yoon; Yang, Sae Jeong; Choi, Dong Seop et al. (2013): Implication of progranulin and C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) on inflammation and atherosclerosis in subjects with or without metabolic syndrome. In: *PloS one* 8 (2), e55744. DOI: 10.1371/journal.pone.0055744.
- Youn, Byung-Soo; Bang, Sa-Ik; Klöting, Nora; Park, Ji Woo; Lee, Namseok; Oh, Ji-Eun et al. (2009): Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. In: *Diabetes* 58 (3), S. 627–636. DOI: 10.2337/db08-1147.
- Zhang, Ling-juan; Guerrero-Juarez, Christian F.; Hata, Tissa; Bapat, Sagar P.; Ramos, Raul; Plikus, Maksim V.; Gallo, Richard L. (2015): Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (6217), S. 67–71. DOI: 10.1126/science.1260972.

Eigene Publikationen und Kongress-Beiträge

1. Publikationen:

Schmid, Andreas; Hochberg, Alexandra; Kreiß, Anja Franziska; Gehl, Jonas; Patz, Marissa; Thomalla, Miriam et al. (2019a): Role of progranulin in adipose tissue innate immunity. In: Cytokine 125, S. 154796. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154796

Schmid, Andreas; Gehl, Jonas; Thomalla, Miriam; Hochberg, Alexandra; Kreiß, Anja Franziska; Patz, Marissa; Karrasch, Thomas; Schäffler, Andreas: Downregulation of CTRP-3 by Weight Loss In Vivo and by Bile Acids and Incretins in Adipocytes In Vitro. Int J Mol Sci. 2020 Oct 31;21(21):8168. DOI: 10.3390/ijms21218168

2. Vorträge:

22. März 2019, Göttingen, 62. Deutscher Kongress für Endokrinologie

Titel des Vortrags: „Progranulin in the context of inflammation in adipocytes“

1. November 2019, Gießen, Science Day 2019

Titel des Vortrags: „Die Rolle von PGRN in entzündlichen Prozessen des Fettgewebes“

Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den _____

Unterschrift

Danksagung

Mein großer Dank gilt als erstes meinem Betreuer Professor Dr. Andreas Schäffler für die Möglichkeit zur Promotion an seinem Institut, die durchgehend hervorragende Betreuung, die unterstützende Zusammenarbeit und das entgegengebrachte Vertrauen.

Dankend hervorheben möchte ich darüber hinaus die Möglichkeit und die Unterstützung bei der Kongressteilnahme mit eigenem Vortrag.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Herr Dr. Andreas Schmid für die besonders gute Betreuung und Hilfe im Labor bei der Planung und Durchführung der Versuche und ebenso für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen in meiner Dissertation.

Für die gute Einarbeitung im Labor und die Hilfestellung bei den Versuchen gilt mein Dank dem ganzen Team aber besonders Frau Lisa Maria Knüpfer.

Nicht zuletzt danke ich der gesamten Arbeitsgruppe, die mir durch die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit eine wunderbare Promotionszeit ermöglicht hat.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden. Sie alle haben mich bei der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt und ermutigt.