

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Einfluss der TRIB3 Expression auf die Insulinsensitivität
von HepG2 Zellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Claudia Munker

aus Würzburg

Würzburg, Mai 2014

Referent: Prof. Dr. B. Allolio

Korreferent : Priv.-Doz. Dr. C. Jurowich

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 2015

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	TRIB3	1
1.2	TRIB3 und ER-Stress	2
1.2.1	Endoplasmatisches Retikulum (ER) und ER-Stress	2
1.2.2	ER-Stress in der Pathogenese von Erkrankungen	3
1.2.3	Die Rolle von TRIB3 im ER-Stress	3
1.3	TRIB3 und Insulinresistenz	4
1.3.1	Intrazellulärer Insulinsignalweg	5
1.3.2	Allgemeine molekulare Mechanismen der Insulinresistenz	7
1.3.2.1	Rezeptordefekte	7
1.3.2.2	Postrezeptordefekte	7
1.3.3	Molekularer Mechanismus von TRIB3 in der Insulinresistenz	9
1.4	Fragestellung	12
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>13</u>
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Zellbiologische Methoden	16
2.2.1	Zelllinie und Zellkultur	16
2.2.1.1	HepG2 Zellen	16
2.2.1.2	Zellkultur	16
2.2.1.3	Kultivierung der Zellen in Well-Plates	16
2.2.2	Transfektion der TRIB3-siRNA mittels Elektroporation	17
2.2.3	Chemische Transfektion der Plasmide	18
2.2.4	Stimulation der Zellen durch Fettsäure	19
2.2.4.1	Herstellung der Fettsäurelösung	19
2.2.4.2	Fettsäureinkubation	20

2.2.5	Stimulation der Zellen durch Insulin	20
2.2.5.1	Herstellung der Insulinlösung	20
2.2.5.2	Protokoll der Insulinstimulation	20
2.3	Molekularbiologische Methoden	21
2.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA	21
2.3.2	cDNA-Synthese	21
2.3.3	Real-time PCR	22
2.4	Immunoblotanalyse	25
2.4.1	Probenaufbereitung	25
2.4.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	26
2.4.3	Westernblot	28
2.4.4	Immunchemischer Antigennachweis und Chemolumineszenz	29
2.5	Methoden zur Herstellung und Isolierung der verwendeten Plasmide	30
2.5.1	Das TRIB3 Plasmid	30
2.5.1.1	Kultivierung und Selektion transfizierter Bakterien	30
2.5.1.2	Präparation der Plasmid-DNA	30
2.5.2	Herstellung des Kontroll-Plasmids	31
2.5.2.1	Spaltung des TRIB3-Plasmids durch Restriktionsendonukleasen	32
2.5.2.2	Agarosegel-Elektrophorese	32
2.5.2.3	Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Agarosegel	34
2.5.2.4	Ligation des DNA-Fragmentes	34
2.5.2.5	Transformation des Kontroll-Plasmids in kompetente Bakterien	35
2.5.2.6	Präparation der Plasmid-DNA	36
2.6	Statistik	36
3	<u>Ergebnisse</u>	<u>37</u>
3.1	Einfluss einer TRIB3 Überexpression auf die Insulinsensitivität von HepG2 Zellen	37
3.1.1	Etablierung der chemischen Plasmidtransfektion	37
3.1.2	Nachweis der TRIB3 Überexpression im Zeitverlauf	38
3.1.3	Insulinstimulation nach TRIB3 Überexpression in HepG2 Zellen	40

3.2 Einfluss eines TRIB3 Knockdowns auf die Insulinsensibilität von HepG2 Zellen	42
3.2.1 Knockdown von TRIB3 durch den Einsatz von siRNA	42
3.2.2 Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown in HepG2 Zellen	43
3.3 TRIB3 Knockdown in insulinresistenten HepG2 Zellen und dessen Einfluss auf die Insulinsensibilität	45
3.3.1 Schaffung einer Insulinresistenz mit TRIB3 Anstieg in HepG2 Zellen	46
3.3.2 Knockdown von TRIB3 in insulinresistenten HepG2 Zellen	48
3.3.3 Insulinstimulation insulinresistenter HepG2 Zellen nach TRIB3 Knockdown	49
3.4 Einfluss von ER-Stress auf das Expressionsniveau von TRIB3	51
3.4.1 Palmitinsäure induziert TRIB3 möglicherweise via ER-Stress	51
<u>4 Diskussion</u>	<u>53</u>
4.1 TRIB3 Überexpression	53
4.2 TRIB3 Knockdown	55
4.3 TRIB3 Knockdown in der Insulinresistenz	57
<u>5 Zusammenfassung</u>	<u>62</u>
<u>6 Literaturverzeichnis</u>	<u>64</u>
<u>7 Abbildungsverzeichnis</u>	<u>71</u>
<u>8 Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>72</u>

1 Einleitung

Dem Diabetes mellitus wird für ganz Europa ein epidemieartiger Anstieg vorhergesagt [1] und weltweite Hochrechnungen ergeben, dass sich die Prävalenz von 2,8% im Jahr 2000 auf 4,4 % im Jahr 2030 steigern wird. Damit werden im Jahr 2030 circa 366 Millionen Menschen an Diabetes leiden [2]. Da der Diabetes mellitus Typ 2, mit einem Anteil von 90-95% aller Diabeteserkrankungen, die weitaus häufigste Entität dieser Erkrankungsgruppe darstellt [3], ist es von entscheidender Bedeutung neue Therapien für dieses Krankheitsbild zu finden.

Obwohl die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 bis heute noch nicht in allen Einzelheiten verstanden ist, ist man sich einig, dass die Insulinresistenz einen wesentlichen Pathomechanismus darstellt. Sie ist ein sehr frühes Ereignis in der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 und kann bereits nachgewiesen werden, lange bevor das Krankheitsbild in Erscheinung tritt. Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, die zellulären Mechanismen, die zu einer Insulinresistenz führen können, zu untersuchen und auf diesem Weg neue Ansatzpunkte für eine kausale Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zu finden.

Tribbles pseudokinase 3 (TRIB3) (siehe 1.1) könnte eine Rolle in der Entstehung beziehungsweise Aufrechterhaltung einer Insulinresistenz spielen und wurde aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.1 TRIB3

In Säugetieren sind drei homologe Isoformen des Tribblesgens beschrieben, das ursprünglich als mitoseinhibierendes Protein in der *Drosophila* entdeckt wurde [4]. Obwohl die Tribbles-Isoformen zu der Familie der Proteinkinasen gezählt werden, sind sie doch nicht in der Lage Substrate zu phosphorylieren, da sie strukturelle Veränderungen in der Kinasedomäne des katalytischen Zentrums aufweisen. Sie werden deswegen auch als Pseudoproteinkinasen bezeichnet [5]. Ohne andere Proteine phosphorylieren zu

können, greifen die Tribbles-Isoformen regulierend durch direkte Protein-Proteininteraktion in intrazelluläre Signalwege ein.

TRIB3 ist das bis jetzt am besten untersuchte Protein der Tribblesfamilie. Es kann unter anderem die zelluläre Differenzierung [6], aber auch deren Apoptose [7] beeinflussen. Daneben greift es in den Lipidmetabolismus ein, indem es den Abbau der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), dem Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese, während des Fastens fördert und damit die Lipolyse im Fettgewebe anregt [8]. Weitere wichtige Mechanismen, in die TRIB3 involviert ist, sind der Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) und die Insulinresistenz. Da beide Vorgänge für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, sollen sie im Folgenden ausführlicher behandelt werden.

1.2 TRIB3 und ER-Stress

1.2.1 Endoplasmatisches Retikulum (ER) und ER-Stress

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird durch ein ausgedehntes Membransystem gebildet, das sich über die ganze Zelle erstreckt. Hauptaufgabe dieses Zellorganells ist die Synthese, Modifikation und korrekte Faltung von sekretorischen Proteinen [9]. Zahlreiche Faktoren, wie zum Beispiel eine gestörte Calcium-Homeostase oder eine massiv gesteigerte Synthese sekretorischer Proteine, können die korrekte Faltung der Proteine beeinträchtigen und zu einem Zustand führen, den man ER-Stress nennt [10]. Um der Anhäufung der falsch gefalteten Proteine entgegen zu wirken, werden in der Zelle drei Kompensationsmechanismen eingeleitet. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Unfolded protein response, UPR. Zum einen wird die Produktion von Chaperonen in Gang gesetzt, die die Faltungskapazität des ERs vergrößern. Hierfür werden die beiden ER-Transmembranproteine IRE1 und ATF6 proteolysiert und damit aktiviert, wandern in den Kern und induzieren dort die Transkription der Chaperone [11]. Zum anderen wird durch die Aktivierung des ER-Transmembranproteins PERK die Translation in der Zelle inhibiert, indem es die Assoziation der mRNAs mit den Untereinheiten der Ribosomen verhindert. Auf diesem Weg wird einer weiteren Anhäu-

fung von Proteinen entgegengewirkt [11]. Als dritter Mechanismus werden falsch gefaltete Proteine durch Translocons aus dem ER ins Zytosol transportiert, wo sie ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut werden [11]. Besteht die UPR jedoch über einen längeren Zeitraum und die Kompensationsmechanismen können den ER-Stress nicht maßgeblich reduzieren, löst die Zelle Apoptose aus. Auch hier gibt es wieder verschiedene intrazelluläre Signalwege, die letztendlich den Zelltod einleiten, wobei vor allem die Aktivierung des proapoptotischen Proteins CHOP (C/EBP homologes Protein) bedeutsam ist [10].

1.2.2 ER-Stress in der Pathogenese von Erkrankungen

ER-Stress spielt auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine bedeutende Rolle. So wird zum Beispiel die Pathogenese von Alzheimer oder Parkinson zum Teil mit der Aktivierung der UPR erklärt, die letztendlich zum Zelltod führt [10]. Außerdem kann CHOP in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 zur Apoptose von pankreatischen β -Zellen führen [12]. Daneben scheint der ER-Stress auch bei der Entstehung einer peripheren Insulinresistenz mitzuwirken. Ozcan et al. [13] konnten beispielsweise nachweisen, dass Übergewicht im Mausmodell ER-Stress in Fett- und Lebergewebe erzeugt. Der ER-Stress kann in der Leber zur Insulinresistenz beitragen, indem die intrazelluläre Signalkaskade von Insulin blockiert wird. Darüber hinaus wurde berichtet, dass eine Reduktion von ER-Stress im diabetischen Mausmodell den intrazellulären Insulinsignalweg normalisiert, den Blutglukosespiegel und die endogene Glukoseproduktion senkt und die Insulinsensitivität verbessert [14, 15].

1.2.3 Die Rolle von TRIB3 im ER-Stress

Zahlreiche Quellen belegen, dass TRIB3 durch verschiedene ER-Stress Induktoren, wie zum Beispiel Thapsigargin oder Tunicamycin, induziert wird [16-20]. Die Transkription von TRIB3 soll hierbei durch CHOP und seinen Dimerisierungspartner ATF4 in Gang gesetzt werden, indem der Komplex an den TRIB3 Promoter bindet und dessen Aktivi-

tät fördert [16]. Interessanterweise wurde eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen CHOP und TRIB3 gefunden, die zwar nicht die Expression von CHOP, wohl aber dessen transkriptionelle Aktivität herabreguliert [16]. Darüber hinaus inhibiert TRIB3 auch die transkriptionelle Aktivität von ATF4. Jousse et al. [21] stellten die These auf, dass TRIB3 die transkriptionelle Aktivität von ATF4 hemmt, indem es die Assoziation oder Rekrutierung von Koaktivatoren an die DNA verhindert. Durch die negativen Feedbacks auf CHOP und ATF4 könnte TRIB3 seine eigene Induktion während des ER-Stresses begrenzen.

Verschiedene Autoren schreiben TRIB3 im ER-Stress eine Rolle in der CHOP-vermittelten Apoptose zu. So stellten Zou et al. [18] die Hypothese auf, dass TRIB3, durch CHOP und ATF4 induziert, die Bildung des proapoptotischen Proteins PUMA induziert und auf diese Weise zum ER-Stress vermittelten Zelltod in Nervenzellen führt. TRIB3 soll hierbei über die Hemmung der Phosphorylierung von AKT die transkriptionelle Aktivität von Foxo3a, dem Schlüsseltranskriptionsfaktor von PUMA, fördern. Des Weiteren stellten Ohoka et al. [16] fest, dass TRIB3-Knockdown-Zellen resistenter gegenüber Tunicamycin induzierter Apoptose sind, während eine Überexpression von TRIB3 diese fördert. TRIB3 scheint aber im ER-Stress nicht nur in die Apoptosekaskade involviert zu sein. Vielmehr könnte es auch über die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CHOP [16] und ATF4 [19, 21] die Stressantwort der Zelle begrenzen und somit eine überschießende Reaktion verhindern.

1.3 TRIB3 und Insulinresistenz

Inzwischen gibt es zahlreiche Arbeiten, die TRIB3 eine mögliche Rolle bei der Insulinresistenz und der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 zuschreiben.

So wurden in verschiedenen diabetischen Mausmodellen, aber auch in übergewichtigen insulinresistenten Menschen und Typ 2 Diabetikern [22, 23], bis auf das 10-fache erhöhte TRIB3 Spiegel gemessen [24]. Des Weiteren sind Missense Polymorphismen von TRIB3 beim Menschen beschrieben, die eine verringerte Insulinsensitivität [25, 26] und

das Auftreten von kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Dyslipidämie und Hypertonie, fördern [25]. Es wurde bislang aber nicht nur gezeigt, dass TRIB3 bei bestehender Insulinresistenz überexprimiert wird, sondern auch, dass TRIB3 seinerseits, durch Hyperglykämie und massive Nahrungszufuhr, 2 wichtige Faktoren, die die Entstehung einer Insulinresistenz fördern, induziert wird [22, 27, 28].

Auch der intrazelluläre Mechanismus, wie TRIB3 zu einer Insulinresistenz führen kann, wurde bereits in mehreren Arbeiten untersucht und beschrieben. Um diesen, sowie die generellen molekularen Mechanismen einer Insulinresistenz, besser zu verstehen, soll an dieser Stelle der intrazelluläre Insulinsignalweg nochmals skizziert werden.

1.3.1 Intrazellulärer Insulinsignalweg

Der Insulinrezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, die wiederum jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt sind. Die β -Untereinheit befindet sich überwiegend intrazellulär und weist eine Tyrosinkinaseaktivität auf. Bindet Insulin extrazellulär an die α -Einheit, wird die Tyrosinkinase aktiviert und es kommt zur Autophosphorylierung des Insulinrezeptors an der β -Untereinheit. An die entstandenen Phosphorylgruppen können dann zahlreiche Substrate binden und Kinasekaskaden aktivieren. Ein Substrat, über dessen Signalweg zahlreiche metabolische Prozesse in Gang gesetzt werden, ist das Insulinrezeptorsubstrat, IRS. Es aktiviert die Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-K), die anschließend das Membranprotein Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung der PDK1, einer PIP₃ abhängigen Proteinkinase, die PKB/AKT vom Zytosol zur Plasmamembran rekrutiert [29]. Hier wird AKT an 2 Stellen, Serin 473 und Threonin 308, phosphoryliert und damit aktiviert [30]. Über AKT werden metabolische Prozesse, wie die Hemmung der Glukoneogenese und Lipolyse, Stimulation der Glykogen- und Proteinsynthese, sowie antiapoptotische Mechanismen initiiert (vgl. Abbildung 1). Somit stellt die Phosphorylierung und damit Aktivierung von AKT eine zentrale Schlüsselrolle in der intrazellulären Insulinsignalkaskade dar. Daneben setzt Insulin

über 2 verschiedene Mechanismen die sogenannte MAP-Kinase-Kaskade (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade) in Gang. Zum einen kann das Adapterprotein Grb2 im Komplex mit SOS an die phosphorylierten Tyrosinreste des IRS-1 binden und anschließend die MAP-Kaskade initiieren. Zum anderen kann der Komplex aus Grb2 und SOS über das Adapterprotein Shc, das direkt an den Insulinrezeptor bindet, aktiviert werden. In beiden Fällen wird hierdurch die MAP-Signalkaskade in Gang gesetzt, die aus den 3 zytoplasmatischen Proteinkinasen Raf, MEK und ERK besteht. ERK transloziert abschließend in den Kern und katalysiert die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung fördern [29, 31].

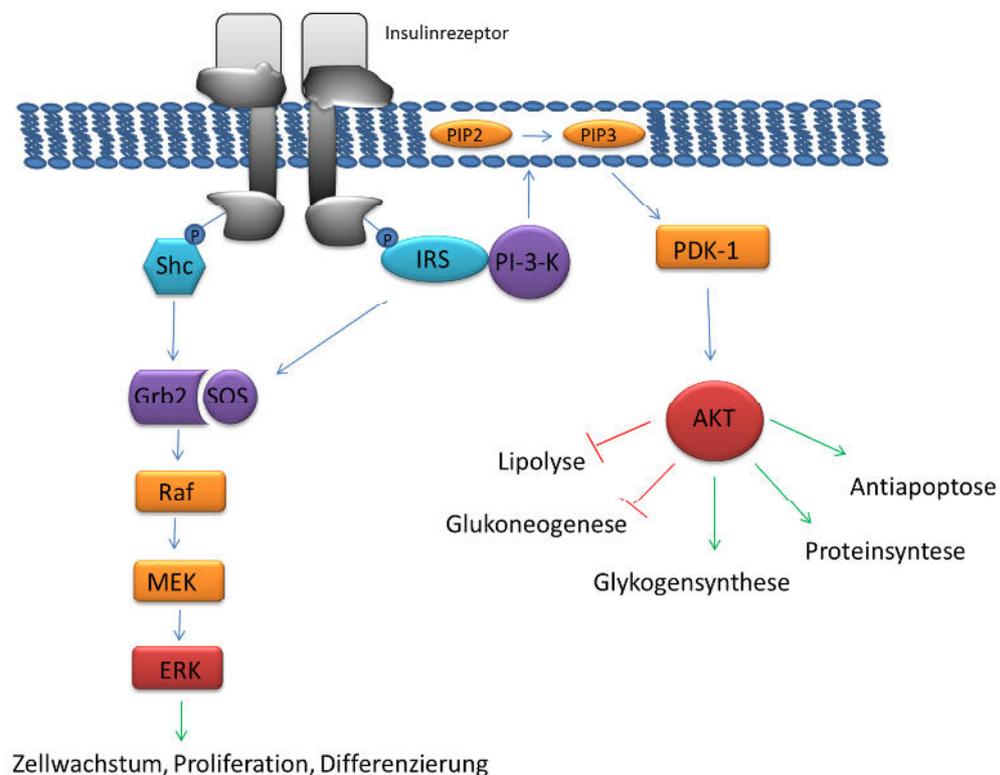


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des intrazellulären Insulinsignalweges

Durch Bindung von Insulin an seinen Rezeptor wird die Tyrosinkinase aktiv und die Autophosphorylierung an Tyrosinresten in Gang gesetzt. Durch Aktivierung des IRS werden letztendlich über AKT v.a. metabolische Prozesse initiiert, während über die MAP-Kinase-Kaskade (Raf, MEK, ERK) v.a. Proliferation und Differenzierung reguliert werden.

Der intrazelluläre Insulin/AKT-Signalweg kann an verschiedenen Stellen blockiert werden und so zu einer Insulinresistenz führen. Hierbei wird zwischen Rezeptor- und Postrezeptordefekt unterschieden. Im Folgenden soll ein Überblick über potenzielle molekulare Mechanismen, die auf diese Weise zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen können, gegeben werden.

1.3.2 Allgemeine molekulare Mechanismen der Insulinresistenz

1.3.2.1 Rezeptordefekte

Verschiedene Arbeitsgruppen haben, im Sinne eines Rezeptordefektes, eine reduzierte Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors in diabetischen Patienten gefunden [31]. Darüber hinaus wurde über Phosphatasen, wie die Proteintyrosinphosphatase 1B berichtet, die eine Dephosphorylierung der Tyrosinreste des Insulinrezeptors bewirkt [32]. Betrachtet man die Signalkaskade, so wird damit schon der erste Schritt des Insulinsignalweges, die Autophosphorylierung, gestört.

1.3.2.2 Postrezeptordefekte

Insulinrezeptorsubstrat (IRS)

Normalerweise führt eine Hyperinsulinämie zu einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors und des Insulinrezeptorsubstrates um 150-200%. In Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 kann jedoch zum Teil kein Anstieg dieser Phosphorylierung nach Insulinstimulation nachgewiesen werden [31]. Inzwischen sind verschiedene Mechanismen postuliert worden, die die Tyrosinphosphorylierung des IRS verhindern. Zum einen können die Tyrosinreste durch Phosphatasen, wie zum Beispiel die Phosphotyrosin Phosphatase 1B, dephosphoryliert werden [32]. Zum anderen reduziert eine Serin- oder Threoninphosphorylierung des IRS, zum Beispiel durch die atypische Proteinkinase C oder die C-JUN-Kinase, die Möglichkeit des IRS als Substrat für die Tyrosin-

kinase des Insulinrezeptors zu agieren. In beiden Fällen wird durch die verminderte Phosphorylierung der Tyrosinreste, die Bindung an nachfolgende Elemente, wie die PI-3-Kinase, verhindert und der intrazelluläre Insulinsignalweg blockiert [32]. Zu den Mechanismen, die auf diese Weise den intrazellulären Insulinsignalweg blockieren können, gehört unter anderem eine akute Erhöhung der Plasmakonzentration an freien Fettsäuren. Dies führt zu einer Konzentrationserhöhung von Acetyl-CoA und Diacylglycerin (DAG) im Muskel, die über die Aktivierung der Proteinkinase C das IRS an Serinresten phosphoryliert [33].

Neben einer verminderten Tyrosinphosphorylierung kann auch durch den vermehrten Abbau des IRS eine Insulinresistenz erzeugt werden. Mitglieder der sogenannten SOCS Familie (Suppressor of cytokine signaling) leiten hierbei die Ubiquitylierung und damit den Abbau des IRS im Proteasom ein [32].

PIP3

Durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5,-bisphosphat (PIP₂) entsteht im intrazellulären Insulinsignalweg PIP₃. Die Weiterleitung des intrazellulären Signals kann an dieser Stelle durch die Dephosphorylierung von PIP₃ unterbrochen werden. Pten (Phosphatase and tensin homologue), eine Phosphatase, die ursprünglich als Tumorsuppressorgen entdeckt wurde, ist auf diese Weise als negativer Regulator des PI-3-K/AKT Signalweges bekannt geworden [34]. Dass Pten durchaus eine Rolle in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zukommen kann, zeigt der muskelspezifische Knock-down im Mausmodell von Wijesekara et al. [35]. Dieser schützte die Mäuse vor einer Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2, der durch eine hochkalorische Diät erzeugt werden sollte.

AKT

Im Menschen sind 3 Isoformen der Proteinkinase B/AKT bekannt. Versuche im Tiermodell konnten zeigen, dass ein Knockdown von AKT2, im Gegensatz zu AKT1, zu einer Insulinresistenz führt und einen Phänotyp hervorbringt, der dem Diabetes mellitus des Menschen ähnelt [36]. Passend dazu wurde auch in einer Familie, die über Generationen hinweg an einer schweren Form der Insulinresistenz und Diabetes mellitus litt, eine Missense Mutation von AKT2 als Verursacher dieses Krankheitsbildes gefunden [37]. Dies zeigt, dass eine Unterbrechung des intrazellulären Insulinsignalweges auf Höhe von AKT, eine schwere Insulinresistenz verursachen kann. Darüber hinaus wurde bei insulinresistenten Patienten und Typ 2 Diabetikern eine verminderte Phosphorylierung von AKT, beziehungsweise eine verringerte Kinaseaktivität von AKT, gefunden [38, 39], was dessen pathophysiologische Relevanz unterstreicht. Interessanterweise konnten diese Mechanismen in den 3 Hauptgeweben der Insulinresistenz, Fett- [38] Muskel- [39] und Lebergewebe [23], nachgewiesen werden. Als möglicher Verursacher einer AKT-abhängigen Insulinresistenz wird eine Akkumulation von Ceramiden, eine Untergruppe der Sphingolipide, diskutiert. Sie sollen zum einen die Protein-Phosphatase 2A aktivieren, die ihrerseits zu einer Dephosphorylierung von AKT führt. Auf der anderen Seite aktivieren Ceramide die atypische Proteinkinase PKC zeta, die AKT an einem Threoninrest phosphoryliert und damit die Bindung von AKT an Plasmamembranproteine verhindert [40]. Damit wird auch die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT unterbunden.

Neben den Ceramiden kann auch TRIB3 die Phosphorylierung von AKT verhindern und so zu einer Insulinresistenz führen.

1.3.3 Molekularer Mechanismus von TRIB3 in der Insulinresistenz

Auf zellulärer Ebene wird die TRIB3-vermittelte Insulinresistenz auf eine verminderte Phosphorylierung von AKT, dem Schlüsselprotein des intrazellulären Insulinsignalweges, zurückgeführt. Hierbei scheint TRIB3 durch direkte Protein-Protein Interaktion mit

AKT die Phosphorylierung sowohl an Serin 473 als auch an Threonin 308 [22, 24, 28] vermindern zu können. Da dieser Mechanismus bereits in Fett-, Muskel-, und Lebergewebe, den drei Hauptvermittlern einer Insulinresistenz, postuliert wurde, kann TRIB3 eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Insulinresistenz zukommen.

Fettgewebe

Insulin hemmt in den Adipozyten physiologischerweise die Lipolyse und reguliert damit den Fettsäurespiegel herab. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sind die Adipozyten jedoch gegenüber der Insulinwirkung resistent und somit kann der erhöhte Fettsäurespiegel im Plasma nicht effizient gesenkt werden. Die daraus resultierende chronische Erhöhung an freien Fettsäuren kann ihrerseits wieder zur Entstehung des Diabetes mellitus beitragen. So können Fettsäuren, als Beispiel für Lipotoxizität, die Insulinresistenz in Muskel- und Lebergewebe fördern und die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas vermindern. [33]

Xiu Ping et al. [27] stellten fest, dass die TRIB3-Spiegel im Fettgewebe von Ratten unter Fruktose reicher Diät anstiegen. Dabei korrelierten die TRIB3 Spiegel im Fettgewebe mit dem Ausmaß der Insulinresistenz. Außerdem zeigte sich die Phosphorylierung von AKT im Fettgewebe der insulinresistenten Individuen vermindert. Auf diesem Weg könnte TRIB3 die Insulinresistenz in Adipozyten fördern und durch die damit verbundene erhöhte Lipolyse zu einem Anstieg der freien Fettsäuren führen.

Muskel

Physiologischerweise senkt Insulin den Blutglukosespiegel, indem es die Glukoseaufnahme in Muskelzellen fördert. Bei Typ 2 Diabetikern zeigt sich jedoch, als Ausdruck der Insulinresistenz, eine verminderte Glukoseaufnahme und eine reduzierte Glykogensynthese [41].

In den Versuchen von Liu et al. [22] konnte im Muskelgewebe von diabetischen Mäusen und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erhöhte TRIB3 Spiegel gemessen werden. Der Grad der Insulinresistenz korrelierte hier ebenfalls mit der Höhe der TRIB3 Spiegel. Des Weiteren verminderte eine TRIB3 Überexpression in L6 Myoblasten die Glukoseaufnahme in die Muskelzellen. Dies konnte durch eine verminderte Phosphorylierung von AKT und der damit verbundenen geringeren Translokation des Glukosetransporters an die Zelloberfläche erklärt werden [22]. Durch diesen Mechanismus könnte TRIB3 zur Insulinresistenz im Muskelgewebe beitragen und eine Hyperglykämie fördern.

Leber

Insulin senkt den Plasmaglukosespiegel unter anderem durch Hemmung der hepatischen Glukoneogenese und Stimulierung der Glykogensynthese. Sind die Zellen jedoch, wie bei einem Typ 2 Diabetiker, gegenüber Insulin resistent, kann die daraus resultierende überschießende Glukoseproduktion maßgeblich zur Entstehung einer Hyperglykämie beitragen [32]. Dies demonstrierten beispielsweise DeFronzo et al. [41]. Sie zeigten durch Versuche mit radioaktiv markierter Glukose, dass Typ 2 Diabetiker nach nächtlichem Fasten erhöhte hepatische Glukoseproduktionsraten, sowie erhöhte Blutglukosespiegel aufwiesen. Als Ausdruck der bestehenden Insulinresistenz waren die Insulinpiegel zu diesem Zeitpunkt auf das 2,5-fache bis 3-fache angestiegen.

Die Leber ist wohl das am besten untersuchte Organ bezüglich TRIB3 und Insulinresistenz. Auch hier wurden sowohl im diabetischen Tiermodell, als auch in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, erhöhte TRIB3 Spiegel gefunden [23, 24, 42]. Außerdem sind bereits einige Faktoren postuliert, wie zum Beispiel PGC-1 oder Homocystin, die in der Leber zu einer Induktion von TRIB3 und über die Hemmung der Phosphorylierung von AKT, zu einer Insulinresistenz führen könnten [43, 44]. Es wurde aber nicht nur berichtet, dass TRIB3 in einer diabetischen Stoffwechsellage vermehrt exprimiert wird, son-

dern auch, dass eine TRIB3 Überexpression in Leberzellen zu einer Insulinresistenz führen kann. In HepG2 Zellen äußerte sich dies durch eine verminderte Phosphorylierung von AKT und GSK3 (Glykogen synthase kinase 3), dem zentralen Enzym der Glykogensynthese, das normalerweise durch AKT phosphoryliert und damit aktiviert wird [24]. Auch eine TRIB3 Überexpression im Tiermodell konnte diesen Mechanismus bestätigen [44]. Auf der anderen Seite zeigen Arbeiten im Zellmodell, dass ein TRIB3 Knockdown zu einer erhöhten Phosphorylierung von AKT und nachfolgend auch von GSK3 führt [24]. Zudem verbesserte ein Adenoviral vermittelter TRIB3 Knockdown im Tiermodell die Glukosetoleranz, was die Autoren vor allem auf die erniedrigten TRIB3 Spiegel in der Leber zurückführten [43]. Fasst man diese Arbeiten zusammen, kann man zu dem Schluss kommen, dass einer TRIB3 Erhöhung in der Leber eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Insulinresistenz zukommt und dass im Umkehrschluss ein Knockdown die Insulinsensitivität verbessert und damit einen möglichen Angriffspunkt in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 darstellt. Aber trotz all dieser Beobachtungen bleibt die Bedeutung von TRIB3 bei der Entstehung einer Insulinresistenz unklar. So konnten Iynedjian et al. [45] beispielsweise nicht belegen, dass eine Überexpression von TRIB3 in Leberkulturzellen zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT und GSK3 führt. Außerdem demonstrierten Okamoto et al. [46], dass eine genetische Deletion von TRIB3 in insulinsensitiven Mäusen keinen Einfluss auf die Glukosehomeostase oder die Insulinsensibilität von Lebergewebe hat.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von TRIB3 bei der Entstehung einer hepatischen Insulinresistenz näher untersucht werden. Hierzu wurden sowohl TRIB3 Überexpressionsversuche, als auch TRIB3 Knockdownversuche durchgeführt und die Insulinsensitivität der HepG2 Zellen gemessen.

Um die Rolle von TRIB3 als mögliches Target in der Therapie des Diabetes mellitus zu klären, wurde in HepG2 Zellen eine Insulinresistenz erzeugt und TRIB3 ausgeknockt, um anschließend die Insulinempfindlichkeit der HepG2 Zellen zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Firma
Brutschrank: Forma Series 3111	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Blot Apperatur: Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Ecomax X-Ray Film Processor	Protec (Oberstenfeld, Deutschland)
Elektrophorese Geräte: 1. Power Pac Basic 2. Power Pac 200 3. EPS 301 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) GE Healthcare Life sciences (München, Deutschland)
Elektrophoresekammern: 1. Electrophorese Joule Box 2. Mini Protean Tetra Cell	Stratagene (Heidelberg, Deutschland) Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Gene Pulser Xcell Electroporation System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Heizblöcke: 1. Thriller 2. Techne Dri-Block DB2D	PeqLab (Erlangen, Deutschland) Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Magnetrührer: Bio Magnetic Stirrer MMS-3000	Biosan, (Riga, Lettland)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbanken: 1. MSC Advantage 1.2 2. MSC Advantage 1.8	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland) Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Mikroskop: Leica DM IL	Leica (Wetzlar, Deutschland)
MikrowelleQuick Cookmate	Daewoo (Berkshire, UK)
PCR - Gerät: Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
PH-Meter: InoLab pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Präzisionswaage SBA 32	Scaltec (Göttingen, Deutschland)
Realtime PCR Gerät: CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)

Schüttler: Rotary shaker KS10 swip + TH10	Edmund Bühler GmbH (Tübingen, Deutschland)
Spectralphotometer: Nanodrop 2000c	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Taumelschüttler: Polymax 1040	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
UV Transilluminator UVT 400-M	International Biotechnologies (New Haven, USA)
Vortexer: MS1 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)
Zentrifugen: 1. Biofuge Fresco 2. Megafuge 1.0 R 3. Mini Zentrifuge „Sprout“ 4. Spectrafuge Minicentrifuge	Heraeus (Buckinghamshire, UK) Heraeus (Buckinghamshire, UK) Omnilab (Bremen, Deutschland) Labnet (Oakham, UK)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	Firma
Tween 20 Biochemika	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Gene Pulser Cuvettes 0,4cm electrode gab, Sybr Green Supermix, 30% Acrylamid/ Bis Solution, Temed, Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Glycerin, Hefeextrakt, Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Fuji Super RX Röntgenfilme	Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
AmpuWA Spüllösung	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland)
Hybond-ECL, ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (München, Deutschland)
L-Glutamin, PenStrep, BenchMark Prestained Protein Ladder, Trypan blau	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
NukleoSpin RNA II Kit, NucleoSpin Plasmid QuickPure, NucleoBond Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel GmbH + Co.KG (Düren, Deutschland)
Fatty acid free Albumin Bovine Serum	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Foetal Bovine Serum, DPBS	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
X-Treme Gene HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Insuman Rapid 40 I.E./ml	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

	(Frankfurt, Deutschland)
APS, Bromphenolblau, Ethanol , EDTA, Duplecco´s modified eagle´s medium mixture F-12 Ham, -Glycin for electrophoresis, Trypsin-EDTA Solution (1x), 2-Mercaptoethanol, Methanol, Ponceau-S Solution, Phosphate Buffered Saline, BSA, Palmitic acid, Agarose, SDS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
1 kb DNA Ladder, 6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (Fermentas) (Langenselbold, Deutschland)
QIAs shredder, QuantiTect Reverse Transcription Kit, TRIB3 siRNA, AllStars Negative Control siRNA	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
Enzyme und deren Puffer	Firma
Xho I, Sal I-HF, T4 Ligase, NE Buffer 4, 10x Buffer for T4 Ligase	New England BioLabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Primer und Sonden	Firma
TRIB3	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
β -Aktin	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
TRIB3-/CHOP-/ β -Aktin Sonde	AppliedBioSyst (Darmstadt, Deutschland)
Antikörper	Firma
Phospho-AKT (Ser 473), AKT, anti-rabbit IgG HRP linked	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
Monoclonal β -Aktin Clone AC-15 , TRIB3 (N-terminal)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Anti-mouse IgG HRP linked	GE Healthcare (München, Deutschland)
Zellline	Firma
HepG2	Cell line service (Eppenheim, Deutschland)

Die übrigen, nicht aufgelisteten Chemikalien, wurden im höchsten Reinheitsgrad von AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zelllinie und Zellkultur

2.2.1.1 HepG2 Zellen

Bei HepG2 Zellen handelt es sich um humane Leberzellen, die erstmals 1975 aus einem hepatozellulärem Karzinom eines 15-jährigen Jungen isoliert wurden. Sie sind sehr gut differenziert und besitzen das biosynthetische Potenzial normalen Leberparenchyms [47]. Die HepG2 Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in DMEM F-12 Ham Medium mit 10% FCS, 1% Glutamin und 1% PenStrep kultiviert.

2.2.1.2 Zellkultur

Alle 2-3 Tage wurde im Wechsel das Medium erneuert oder die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet. Zum Passagieren wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit 9 ml DPBS gespült und mit 2 ml Trypsin-EDTA Solution bei 37 °C für 2,5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Beklopfen der Kulturflasche abgelöst und das Trypsin unverzüglich durch 10 ml Medium neutralisiert.

2.2.1.3 Kultivierung der Zellen in Well-Plates

2.2.1.3.1 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Vor der eigentlichen Auszählung wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff kann die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen und so erscheinen sie unter dem Mikroskop hell. Avitale Zellen hingegen weisen eine veränderte Membranpermeabilität auf und Trypanblau kann sich in ihnen anreichern; sie färben sich dunkelblau. Nach dem Anfärben wird ein Aliquot der Zellsuspension durch Kapillarkräfte in den Spalt der Zählkammer gesaugt und 4 eckbildende Großquadrate zu je 1 mm² unter dem

Mikroskop ausgezählt. Da nach Auflegen des planen Deckgläschens ein Spalt von 0,1mm entsteht, kann die Konzentration der Zellen pro ml mit folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{ausgezählte Teilchen}}{\text{ausgezählt Fläche (mm}^2) \cdot \text{Kammertiefe (0,1mm)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}} \cdot 1000$$

Durchführung

Die HepG2 Zellen wurden, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, mittels Trypsin aus der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Falcon überführt. Dieses wurde bei 800 rpm für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 4 ml frisches Medium pro abgelöster Zellkulturflasche zugegeben. Nach gründlicher Resuspension des Zellpellets wurden 10µl der Suspension im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau vermischt und ein Aliquot von 10µl auf die Zählkammer gegeben. Die Auszählung der vitalen Zellen erfolgte wie oben beschrieben unter dem Mikroskop.

2.2.1.3.2 Aussäen der Zellen

Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau und Probenanzahl in 6- bzw. 12-Well-Plates kultiviert. Pro 6-Well wurden 2 Millionen Zellen in 2 ml Medium ausgesät, pro 12-Well 1 Million Zellen in 1 ml Medium.

2.2.2 Transfektion der TRIB3-siRNA mittels Elektroporation

Die Elektroporation stellt eine effiziente Methode dar, um Nukleinsäuren, Proteine oder andere Moleküle, in unterschiedlichste Zellen zu transfizieren. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Zellmembran vorübergehend durchlässig gemacht und die Moleküle werden aus dem umliegenden Medium aufgenommen.

SiRNAs interferieren mit RNA, wodurch die Proteinexpression von Zielgenen herabreguliert werden kann. Die siRNA bindet an einen Multiproteinkomplex, den sogenannten RISC („RNA induced silencing complex“). Nach Bindung an RISC wird die siRNA entwunden, sodass ein siRNA-Einzelstrang anschließend sequenzspezifisch an die komplementäre Ziel-mRNA binden kann. Schließlich wird die Ziel-mRNA enzymatisch durch RISC abgebaut. Dieser Vorgang wird auch als posttranskriptionelles Gensilencing bezeichnet [48].

Durchführung

Es wurden 1 Million Zellen eingesetzt und in 100 µl DMEM Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Transformationsküvette überführt und pro 100µl (1 Million Zellen) 0,665µl TRIB3-siRNA (5nmol) bzw. Kontroll-siRNA (5nmol) dazu gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit 340V für 10msec durch eine square wave. Anschließend ruhten die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur in den Küvetten und wurden dann in die Wells ausgesät.

Sequenz der TRIB3-siRNA

Zielsequenz	5`-TACCATGAGTATGTATGTTTA-3`
Sense Strang	5`-CCAUGAGUAUGUAUGUUUATT-3`
Antisense Strang	5`-UAAACAUACAUCUCAUGGTA-3`

2.2.3 Chemische Transfektion der Plasmide

Plasmide sind kleine doppelsträngige DNA-Moleküle, die unter anderem in Bakterien als extrachromosomales Erbgut vorkommen. Sie können als Vektoren genutzt werden, um beliebige DNA-Abschnitte in Wirtszellen zu transportieren, die daraufhin das ge-

wünschte Genprodukt produzieren. Vektoren werden auf unterschiedliche Weise in Zellen transfiziert, z.B. mit Hilfe der Elektroporation oder der chemischen Transfektion.

Durchführung

Die chemische Transfektion der HepG2 Zellen erfolgte mit Hilfe des X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 2,6 Millionen Zellen pro 6-Well und 1,3 Millionen Zellen pro 12-Well ausgesät, um bei der Transfektion eine Konfluenz von ca. 90% zu erreichen. Pro 6-Well wurden 200µl DMEM Medium ohne Zusätze mit 2µg Plasmid-DNA versetzt und 4µl Transfektionsreagenz dazu pipettiert. Die Lösung wurde gut durchmischt und für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal vorsichtig mit DPBS gewaschen und mit Medium ohne Antibiotika versetzt, da dieses die Transfektion stören könnte. Anschließend wurde je 200µl des Transfektionskomplexes tropfenweise in ein 6-Well pipettiert und die Platte vorsichtig geschwenkt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24, 48 oder 72 Stunden. Analog dazu wurde bei den 12-Wells mit der Hälfte der Ansatzmenge gearbeitet.

2.2.4 Stimulation der Zellen durch Fettsäure

2.2.4.1 Herstellung der Fettsäurelösung

Zur Stimulation der Zellen wurde eine Fettsäurelösung mit 0,8 mmol/l Fettsäure und 1% BSA verwendet. Die Fettsäuren wurden dabei nach einer modifizierten Methode von Cousin et al. [49] gelöst. Zunächst erfolgte die Herstellung einer Stocklösung mit 8 mmol/l Fettsäure und 10% BSA. Hierfür wurde eine 160 mM Fettsäure-Lösung in Natronlauge (500µl 0,25M) erstellt. Die Fettsäuren wurden bei 70°C und 350 rpm bis zur kompletten Lösung in Natronlauge geschüttelt. Gleichzeitig wurde fettsäurefreies BSA in destilliertem Wasser mit einer Konzentration von 10% bei 55°C gelöst. Anschließend wurde 50µl der Fettsäure-Lösung tropfenweise zu 950µl BSA-Lösung pipettiert, um die

oben genannten Konzentrationen der Stocklösung zu erhalten. Diese wurde für 10 Sekunden mit maximaler Drehzahl gevortext, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 10 Minuten bei 55°C und 350 rpm. Der so gebildete Fettsäure-BSA Komplex wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, im Verhältnis 1:10 mit FCS-freiem Medium verdünnt und abschließend durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert.

2.2.4.2 Fettsäureinkubation

Die HepG2 Zellen wurden wie unter 2.2.1.3.2 beschrieben in Wells kultiviert. Nachdem die Zellen über Nacht festgewachsen waren, wurden sie mit DPBS gewaschen und in FCS-freiem Zellmedium gehungert. 24 Stunden später wurde das Medium abgenommen, die Zellen wiederum mit DPBS gespült und die Fettsäurelösung mit der Konzentration von 0,8 mmol/l dazu gegeben. Nach einer 6-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet oder zunächst mit Insulin stimuliert.

2.2.5 Stimulation der Zellen durch Insulin

2.2.5.1 Herstellung der Insulinlösung

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit einem humanem Insulin (Insuman rapid) in einer Konzentration von 50 nmol/l. Zunächst wurde eine Stocklösung der Konzentration $1,05 \times 10^{-10}$ M hergestellt, indem Insuman rapid mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Im Anschluss wurde die Stocklösung durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert.

2.2.5.2 Protokoll der Insulinstimulation

Die HepG2 Zellen wurden wie unter 2.2.1.3.2 beschrieben kultiviert und vor der Insulinzugabe elektroporiert, mit Fettsäure stimuliert oder mit einem Plasmid transfiziert. Um die Zellen mit Insulin zu stimulieren, wurde pro 6-Well 100µl und pro 12-Well 50µl der Insulinlösung tropfenweise zugegeben, sodass in den Wells eine Insulinkonzentration von 50 nmol/l vorlag. Die Platten wurden für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Um die Reaktion zu stoppen wurde das Medium abgenommen, zweimal mit DPBS gewaschen und die Zellen unverzüglich weiter verarbeitet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kits der Firma Macherey-Nagel. Die Zellen wurden geerntet und die Zellsuspension bei 8000 rpm für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit β -Mercaptoethanol versetztem Lysis-Buffer RA1 resuspendiert. So erfolgte die unverzügliche Inaktivierung der RNAsen. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation in QUIAshreddern homogenisiert. In den folgenden Schritten wurde die RNA an eine Silikatmembran gebunden, kontaminierende DNA durch eine rDNase eliminiert und die RNA durch die Anwendung von verschiedenen Waschpuffern gereinigt. Zuletzt konnte die RNA mit 50 μ l RNase freiem Wasser aus der Silikatmembran eluiert werden. Die Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer gemessen und der Reinheitsgrad durch das Verhältnis A_{260}/A_{280} überprüft.

2.3.2 cDNA-Synthese

Durch reverse Transkription kann RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) stellt zunächst einen RNA-DNA Hybrid her. Im Anschluss wird die RNA-Matrize durch RNAse H Aktivität der reversen Transkriptase abgebaut, sodass die DNA als Einzelstrang vorliegt. Es erfolgt die Synthese des DNA Doppelstranges durch eine DNA Polymerase.

Durchführung

Für die cDNA Synthese wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet. Zunächst wurden 500ng RNA in 12µl RNase freies Wasser aufgenommen, 2µl gDNA Wipeout Buffer dazu pipettiert und gut gemischt. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 42°C, in der Reste genomischer DNA durch den gDNA Wipeout Buffer eliminiert wurden. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gestellt und folgender Ansatz zugegeben:

Quantiscript Reverse Transkriptase	1µl
Quantiscript RT Buffer	4µl
RT Primer Mix	1µl

Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 42°C. Während dieser Inkubation wurde die cDNA synthetisiert und die RNA-Matrize durch RNase H Aktivität der reversen Transkriptase eliminiert. Auf diese Weise entstand die einsträngige cDNA. Bei der abschließenden 3-minütigen Inkubation mit einer Temperatur von 95°C wurde die Quantiscript Reverse Transkriptase inaktiviert.

2.3.3 Real-time PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation eines spezifischen DNA Abschnittes [50]. Sie umfasst 20-40 Zyklen, wobei sich jeder Zyklus in drei Teilschritte untergliedert: Bei der Denaturierung wird die DNA Matrize durch Erhitzen auf ca. 95°C in ihre Einzelstränge aufgespalten. Im Schritt des Annealings lagern sich die beide Oligonukleotid-Primer an ihre komplementären DNA-Bereiche an und begrenzen damit die zu amplifizierende Sequenz. Dies geschieht bei einer Temperatur von 40-70°C. Im letzten Schritt, der Elongation, verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die freien Primerenden am 3'-OH-Ende bei ca. 70°C.

Die Realtime-PCR beruht auf dem eben beschriebenen Prinzip der PCR, bietet jedoch die Möglichkeit das PCR Produkt quantitativ zu bestimmen. Zur Quantifizierung wurde unter anderem SYBR-Green I eingesetzt, ein Fluoreszenzfarbstoff, der beim Binden an doppelsträngige DNA grünes Licht emittiert. Da in jedem Elongationsschritt doppelsträngige DNA-Fragmente entstehen, steigt die Fluoreszenzintensität mit jedem Zyklus an und kann von dem Realtime-PCR Gerät detektiert werden.

Für einen Teil der Proben wurden TaqMan-Sonden verwendet. Diese Sonden bestehen aus sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die an von Primern flankierte DNA-Abschnitte binden. Sie besitzen am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff („Reporter“), dessen Fluoreszenzeigenschaft zunächst durch einen „Quencher“ (Löschsubstanz) am 3'-Ende unterdrückt wird. Während der PCR spaltet die TaqMan-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität den Reporter von der Sonde ab, sodass eine steigende Fluoreszenzintensität gemessen werden kann.

Durchführung

Der Reaktionsansatz wurde mit Hilfe des iQ SYBR Green Supermixes der Firma Bio-Rad aus folgenden Komponenten hergestellt:

iQ SYBR Green Supermix	12,5µl
Primer for (Konz: 10pmol/µl)	1µl
Primer rev (Konz: 10 pmol/µl)	1µl
Destilliertes Wasser	8,5µl

Zu je 23µl dieses Mastermixes wurde 2µl cDNA in eine 96-Well Plate pipettiert, sodass ein Reaktionsvolumen von 25µl entstand.

Die Realtime-PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

- | | | | | |
|----|------|----------|---------------|--------|
| 1. | 95°C | 3:00 min | Denaturierung | |
| 2. | 95°C | 0:15 min | Schmelzen | } 39 x |
| 3. | 65°C | 0:15 min | Annealing | |
| 4. | 72°C | 0:15 min | Elongation | |
| 5. | 95°C | 0:10 min | | |

Der Reaktionsansatz für die TaqMan-Sonden setzte sich wie folgt zusammen:

TaqMan Master Mix	12,5µl
Sonden Primer Mix	1,25µl
Destilliertes Wasser	9,25µl

Zu je 23µl des Ansatzes wurden 2µl cDNA in eine Well-Plate pipettiert und mit folgendem Programm amplifiziert:

- | | | | | |
|----|------|-----------|--------------------------|--------|
| 1. | 50°C | 2:00 min | | |
| 2. | 95°C | 10:00 min | initiale Denaturierung | |
| 3. | 95°C | 0:15 min | Schmelzen | } 44 x |
| 4. | 55°C | 1:00 min | Annealing und Elongation | |

Bei der Auswertung der PCR Ergebnisse wurde die Expression des Zielgens mit Hilfe des Referenzgens β -Aktin normalisiert. Da β -Aktin in den Zellen ein weitgehend stabiles Expressionsniveau aufweist, können auf diese Weise Schwankungen bei der RNA-Extraktion und Realtime-PCR ausgeglichen werden.

Verwendete Primer:

TRIB 3	for	5`-AGT ATG GAC CTG GGA TTG TGG A-3`
	rev	5`-ATT AGG CAG GGT CTG TCC TGT G-3`
β-Aktin	for	5`-CCA GAT CAT GTT TGA GAC CTT C-3`
	rev	5`-CAT GAG GTA GTC TGT CAG GTC C-3`

2.4 Immunoblotanalyse

2.4.1 Probenaufbereitung

Zur Aufbereitung der Proben wurde die Methode nach Laemmli [51] verwendet. Die in Wells kultivierten Zellen wurden mit DPBS gespült und danach mit 100µl Laemmli-Puffer pro 1 Million Zellen überschichtet. Durch gründliches Resuspendieren wurden die Zellen in den Laemmlipuffer aufgenommen und anschließend in ein Eppendorf Tube überführt. Es erfolgte eine Erhitzung der Proben für 5-10 Minuten auf 95°C. Das im Puffer enthaltene β-Mercaptoethanol sorgte dabei für eine Reduzierung der Disulfidbrücken, während SDS und die Hitze die Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur der Proteine zerstörten. Durch die Anlagerung von SDS erhielten die Proteine eine stark negative Ladung, sodass sie in der anschließenden Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden konnten.

Laemmli-Puffer (5x):

Tris pH 6,8	50 mM
SDS	2%
β-Mercaptoethanol	840 mM
Glycerin	20 %
Bromphenolblau	0,04 %
Destilliertes Wasser	Ad 100 ml

2.4.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die sogenannte SDS Page wird dazu genutzt, die denaturierten Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, während sie im elektrischen Feld Richtung Kathode wandern. Bei der hier durchgeführten diskontinuierlichen Elektrophoresemethode nach Laemmli [51] durchlaufen die Proteine 2 Gele, die sich in ihrer pH und Acrylamidkonzentration unterscheiden. Im ersten Gel, dem sogenannten Sammelgel, werden die Proteine aufgrund des schwach sauren pHs und der relativ großen Porengröße in einer schmalen Bande konzentriert. Erreichen sie dann das leicht alkalische Trenngel, dessen Porengröße geringer ist, werden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Gele an sich entstehen aus einer radikalischen Polymerisation von Acrylamid und n,n' -Methylenbisacrylamid.

Durchführung

Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System von BioRad verwendet. Die Glasplatten wurden zunächst mit Ethanol gereinigt und in das Ständersystem eingespannt. Bei der Herstellung des Trenngels wurde darauf geachtet, dass APS und Temed als letzte Komponenten zugefügt wurden, da diese die Polymerisation des Gels in Gang setzen. Anschließend wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert und sogleich mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach einer Aushärtungszeit von einer halben Stunde konnte das Wasser abgegossen werden. Daraufhin wurde das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und die Kämme zur Taschenbildung eingesteckt. Nach 20-30 Minuten konnten die Kämme entfernt und die Gele in die Elektrophoresekammer überführt werden. Es erfolgte die Füllung der Kammer mit Elektrophorese-Running-Buffer und die Beladung der Proben. Als Proteingrößenstandart wurde der BenchMark Prestained Protein Ladder der Firma Invitrogen verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 80V im Sammelgel und mit 180V im Trenngel durchgeführt.

Zusammensetzung der benötigten Puffer und Gele:

Trenngel:

Anleitung für 2 10%ige Mini-Gele der Dicke 1,5mm

Destilliertes Wasser	6,25 ml
30% Acrylamid/ Bis Solution	5 ml
4x Lower-Buffer	3,75 ml
APS	150 µl
Temed	15 µl

Sammelgel:

Anleitung für 2 5%ige Mini-Gele der Dicke 1,5mm

Destilliertes Wasser	5,7 ml
30% Acrylamid/ Bis Solution	1,3 ml
4x Upper-Buffer	2,25 ml
APS	100 µl
Temed	10 µl

4x Lower-Buffer: pH=8,8

SDS	4 g
Tris	181,72 g
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

4x Upper-Buffer: pH=6,8

SDS	2 g
Tris	30,28 g
Destilliertes Wasser	Ad 1000 ml

10 x Elektrophorese-Buffer:

Tris	15,1 g
Glycin	94 g
10% SDS Lsg.	50 ml
Destilliertes Wasser	Ad 1000 ml

2.4.3 Westernblot

Im Westernblotverfahren werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, sodass sie für die spätere Detektion durch Antikörper zugänglich sind.

Durchführung

Der Westernblot wurde mit der Semidry Blotting Methode in einer Transblot SD Kammer von BioRad durchgeführt. Whatman Paper und Nitrocellulosemembran wurden in Semidry-Blotting-Buffer getränkt und nach folgendem Schema in der Apparatur angeordnet:

10 Whatman Paper	Plus Pol
Nitrocellulosemembran	
SDS-Polyacrylamidgel	
10 Whatman Paper	Minus Pol

Der Transfer der Proteine erfolgte bei 25V für 1,5 Stunden. Um den Erfolg zu überprüfen, wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau-S Solution gefärbt, welche die transferierten Banden sichtbar macht. Anschließend wurde die Membran mit 0,1% PBS-Tween entfärbt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5%iger Magermilchlösung inkubiert. Hierdurch wurden die freien unspezifischen Banden blockiert.

Semidry-Blotting-Buffer:

Glycin	2,93 g
Tris	5,82 g
10% SDS Lsg.	3,7 ml
Methanol	200 ml
Destilliertes Wasser	Ad 1000 ml

2.4.4 Immunchemischer Antigennachweis und Chemolumineszenz

Der Antigennachweis erfolgte mittels Immunodetektion. Hierbei wird das freiliegende Protein von einem spezifischen Erstantikörper gebunden, an den sich wiederum ein enzymgekoppelter Zweitantikörper anlagert.

Nach Blockierung der unspezifischen Banden wurde die Magermilchlösung abgenommen, die Membran mit 0,1% PBS-Tween gewaschen und mit dem Erstantikörper übergossen. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 mal 10 Minuten mit 0,1% PBS- Tween gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach weiteren 3 10-minütigen Waschschrritten erfolgte die Sichtbarmachung der Antikörperbindungen unter Verwendung der ECL Detection Reagents der Firma GE Healthcare. Das System beruht auf der Oxidation von Luminol durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Horse Radish Peroxidase. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht kann auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden. So wurde die Nitrocellulosemembran laut Herstelleranweisung mit zwei Reagenzien überschichtet und 1 Minute darin geschwenkt. Anschließend wurde die Membran in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer erfolgte schließlich die Belichtung und Entwicklung des Films.

Antikörper	Verdünnung	Lösungsmedium
pAKT	1:1000	5% BSA in H ₂ O
AKT	1:1000	5% BSA in H ₂ O
TRIB3	1:1000	5% Magermilchlösung
β-Aktin	1:1000	5% Magermilchlösung

2.5 Methoden zur Herstellung und Isolierung der verwendeten Plasmide

2.5.1 Das TRIB3 Plasmid

2.5.1.1 Kultivierung und Selektion transfizierter Bakterien

Verwendet wurde eine E-coli-Stichkultur der Firma imaGenes, die einen Plasmid-Klon mit TRIB3 cDNA beinhaltet. Um die Bakterien zu kultivieren und das enthaltene Plasmid zu vervielfältigen, wurde mit einer Pipettenspitze eine Probe des Kulturagars abgekratzt und in ein 15ml Falcon überführt. Nach Zugabe von 5 ml LB-Medium und 5µl Ampicillinlösung einer Konzentration von 50 mg/ml, erfolgte eine Inkubation über Nacht im Schüttler bei 175 rpm und 37°C. Durch die Antibiotikazugabe konnten sich nur die Bakterien vervielfältigen, die das Plasmid aufgenommen und damit Ampicillin resistent waren.

LB-Medium:

(Bacto-) Tryptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Wasser	Ad 1000 ml

2.5.1.2 Präparation der Plasmid-DNA

2.5.1.2.1 Miniprep

Dieses Verfahren ermöglicht es Plasmid-DNA in analytischem Maßstab aus Bakterien zu isolieren. Die Miniprep wurde mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. 4 ml der in 2.5.1.1 hergestellten LB Kultur wurden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten in ein Eppendorf-Tube überführt und bei 11 000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in

250µl A1 Buffer aufgenommen. In den folgenden Schritten wurde die DNA an eine Silikatmembran gebunden, durch einen Waschschrift von Verunreinigungen befreit und schließlich durch Zugabe von 50µl destilliertem Wasser aus der Membran eluiert.

Um den Einbau der TRIB3-cDNA zu überprüfen, wurde das aufgereinigte Plasmid für eine Sequenzanalyse an die Firma Eurofins mwg/operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Nach positivem Testergebnis konnte der Plasmidklon für die Experimente eingesetzt werden.

2.5.1.2.2 Maxiprep

Dieses Verfahren dient ebenso wie die Miniprep dazu, Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren. Allerdings kann hier durch Einsatz einer erhöhten Bakterienzahl eine größere Menge an Plasmid gewonnen werden. Die Maxiprep wurde mit Hilfe des NucleoBond Xtra Maxi Kits der Firma Macherey Nagel durchgeführt. Um eine große Über-Nacht-Kultur zu generieren, wurde 1 ml der LB-Kultur aus 2.5.1.1 zu 500ml LB-Medium pipettiert, das mit 500µl Ampicillinlösung der Konzentration 50 mg/ml versetzt war. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 175rpm und 37°C im Schüttler. Anschließend wurden die 500ml LB-Kultur bei 6000rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 12 ml Buffer RES lysiert. Im Folgenden wurde die Plasmid-DNA an eine Säule, die als Anionen-Austauscher fungiert, gebunden, durch mehrmaliges Waschen von Verunreinigungen befreit und schließlich mit Isopropanol ausgefällt. Im letzten Schritt wurde das getrocknete DNA-Pellet in 100µl H₂O aufgenommen und die Konzentration der Lösung mit dem Spektrophotometer bestimmt.

2.5.2 Herstellung des Kontroll-Plasmids

Um die Überexpression von TRIB3, die durch Transfektion des TRIB3-Plasmids hervorgerufen wird, zu quantifizieren, muss in gleich behandelten Zellen ein Kontroll-Plasmid eingebracht werden. Die Reaktionsbedingungen sind dabei am besten ver-

gleichbar, wenn sich das Kontroll-Plasmid nur durch das Fehlen der TRIB3-Sequenz von dem eigentlichen Plasmid unterscheidet. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Schritten aus dem TRIB3-Plasmid die TRIB3-Sequenz eliminiert und so ein entsprechender Leervektor generiert.

2.5.2.1 Spaltung des TRIB3-Plasmids durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind bakterielle Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und den DNA-Doppelstrang an diesen Stellen durch Hydrolyse spalten. Die hier verwendeten Restriktionsendonukleasen Xho I und Sal I spalten das TRIB3-Plasmid beidseits der TRIB3-cDNA Sequenz. So wird die TRIB3-cDNA aus dem Vektor eliminiert und die Plasmid-DNA liegt in linearisierter Form vor. Für den Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert:

- x μ l Plasmidlösung (entspricht 1 μ g Plasmid)
- 2 μ l 10x BSA
- 2 μ l NEBuffer 4
- 0,5 μ l Xho I
- 0,5 μ l Sal I-HF
- x μ l destilliertes Wasser um das Reaktionsvolumen auf 20 μ l zu bringen

2.5.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese dient dazu, Nucleinsäuren nach ihrer Größe aufzutrennen. Die negativ geladenen DNA- oder RNA-Fragmente wandern dabei im elektrischen Feld zur Anode, wobei kleinere Fragmente eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen als größere. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration der Agarose bestimmt. Je höher diese ist, umso kleiner sind die Poren. Auf diese Weise kann je nach Nucleinsäuregröße durch Anpassen der Agarosekonzentration ein passender Trenn-

bereich im Gel geschaffen werden. Um die DNA- bzw. RNA-Banden sichtbar zu machen, wird das Gel mit Ethidiumbromid inkubiert, einer interkalierenden Substanz, die nach Einlagerung in die Nukleinsäuren durch Anregung mit Ultraviolettem Licht fluoresziert.

Durchführung

Um den Erfolg des unter 2.5.2.1 durchgeführten Restriktionsverdau zu überprüfen, wurde mit dem geschnittenen Plasmid eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein 1%iges Agarosegel aus 0,5g Agarose und 50ml TAE-Puffer hergestellt. Die beiden Substanzen wurden so lange in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose komplett gelöst hat. Anschließend wurden Gelschlitten mit der Lösung befüllt und mit Kämmen versehen. Nach einer Aushärtungszeit von ca. 30 Minuten wurden die Kämmen gezogen, das Gel in eine TAE-gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und komplett mit TAE-Puffer überschichtet. Daraufhin wurde die unter 2.5.2.1 hergestellte DNA-Lösung mit 6x DNA-Loading Dye versetzt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Um die Eliminierung der TRIB3-cDNA zu kontrollieren, wurde als Referenz 1µg unverdautes TRIB3-Plasmid mit entsprechender Menge Ladepuffer versetzt und ebenfalls in eine Tasche beladen. Als Größenstandart wurde der 1kb DNA Ladder der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V. Anschließend wurde das Gel für 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad der Konzentration 0,5µg/ml inkubiert und die DNA-Banden unter Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht. War der Restriktionsverdau erfolgreich, so konnte eine DNA-Bande bei ca. 4356bp detektiert werden, die der Plasmidgröße ohne TRIB3 Sequenz entspricht. Im Vergleich dazu war bei dem unverdauten TRIB3-Plasmid eine DNA-Bande bei ca. 6678bp sichtbar.

50 x TAE-Puffer, pH 8,0

Tris	242,28 g
Na Acetat	68,05 g
EDTA	18,61 g
Destilliertes Wasser	Ad 1000 ml

2.5.2.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Agarosegel

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits der Firma Macherey Nagel. Hierzu wurde zunächst die entsprechende DNA-Bande bei 4356bp mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und das Gewicht des Gelstückes ermittelt. Pro 100mg Agarosegel wurden 200µl NT Buffer aus dem Kit zugefügt und so lange bei 50°C unter gelegentlichem Vortexen erwärmt, bis sich das Gel komplett verflüssigt hat. In den folgenden Schritten wurde die DNA an eine Silikatmembran gebunden, durch einen Waschpuffer gereinigt und schließlich mit 50µl destilliertem Wasser aus der Membran eluiert. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde mit dem Spektrophotometer ermittelt.

2.5.2.4 Ligation des DNA-Fragmentes

Die lineare Plasmid-DNA wurde unter Einsatz der T4 DNA-Ligase zu einem zirkulären Plasmid ligiert. Die T4 DNA-Ligase fügt die sogenannten Sticky ends, die durch die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen entstanden sind, enzymatisch zusammen. Zur Ligation wurde 100ng Kontroll-Plasmid in folgendem Ansatz bei 14°C über Nacht inkubiert:

x μ l	Plasmid-DNA (entspricht 100ng Plasmid-DNA)
1 μ l	T4 DNA-Ligase
2 μ l	T4 Ligasepuffer
x μ l	destilliertes Wasser, um das Reaktionsvolumen auf 20 μ l zu bringen

2.5.2.5 Transformation des Kontroll-Plasmids in kompetente Bakterien

Die Transformation beschreibt einen Vorgang, durch den Bakterien Plasmid-DNA aufnehmen können. Besitzt die aufgenommene Plasmid-DNA einen sogenannten ORI (origin of replication), der von einer bakteriellen Polymerase erkannt wird, so wird das Plasmid parallel zum eigenen Erbgut der Bakterien vermehrt. Von den verschiedenen Methoden einer Transformation wurde hier der Hitzeschock gewählt.

Kompetente Bakterien, d.h. Bakterien die durch chemische Vorbehandlung in der Lage sind Plasmid-DNA aufzunehmen, waren in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden bei -80°C gelagert.

Durchführung

Die kompetenten DH5 α Bakterien eines E.coli Stammes wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde zu 100 μ l Bakteriensuspension 250ng Plasmid-DNA pipettiert und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgte ein 2-minütiger Hitzeschock bei 42°C, woraufhin unverzüglich 500 μ l kaltes LB-Medium zugegeben und die Suspension für 10 Minuten auf Eis gestellt wurde. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Bakterienlösung für 45 Minuten bei 37°C im Schüttler, was in etwa einer Verdopplungszeit von E. coli Bakterien entspricht. Schließlich wurde 50 μ l der Suspension auf eine mit Ampicillin versetzte LB-Agarplatte ausgestrichen und der Rest der Bakterienlösung bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Bakterienpellet in 100 μ l LB-Medium aufgenommen und ebenfalls auf einen mit Ampicillin versetzten LB-Agar ausplattiert. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 37°C bebrütet.

Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte dabei durch die Ampicillinresistenz. Um die Bakterien, die das Kontrollplasmid aufgenommen haben zu vermehren, wurden 4 Klone mit einer Pipettenspitze von den Agarplatten abgenommen, zu 5 ml LB Medium gegeben und anschließend mit 5µl einer Ampicillinlösung der Konzentration von 50 mg/ml versetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler.

2.5.2.6 Präparation der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit den Methoden der Mini- und Maxiprep, die schon unter 2.5.1.2 beschrieben wurden. Um die Elimination der TRIB3-Sequenz in einem sensitiveren Verfahren als der Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen, wurde mit einem Teil der unter 2.5.2.5 hergestellten LB-Kultur eine Miniprep durchgeführt und das aufgereinigte Plasmid einer Sequenzanalyse unterzogen. Nach positivem Testergebnis konnte der Rest der LB-Kultur vermehrt und das Kontroll-Plasmid durch eine Maxiprep isoliert werden. Die Konzentration des aufgereinigten Kontroll-Plasmids wurde mit dem Spektrophotometer ermittelt und ein Aliquot, wie unter 2.2.3 beschrieben, in HepG2 Zellen transfiziert.

2.6 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert (M) ± Standardfehler (SE) angegeben. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde der Student's t-Test angewendet. Ein p-value < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Analysen wurden mit Microsoft Excel 2010 durchgeführt.

Die semiquantitative Auswertung der Westernblots erfolgte mit ImageJ, einem Graphikprogramm, das von „National Institutes of Health“ (NIH) herausgebracht wurde. Die anschließende graphische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel 2010.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss einer TRIB3 Überexpression auf die Insulinsensitivität von HepG2 Zellen

Zunächst wurde in vitro ein Zellmodell etabliert, in dem die in vivo beschriebene Insulinresistenz nach TRIB3 Überexpression reproduziert werden konnte.

3.1.1 Etablierung der chemischen Plasmidtransfektion

Die chemische Transfektion des TRIB3-Plasmides erfolgte mit Hilfe des X-treme Gene HP DNA Transfection Reagents. Da sich unterschiedlich zusammengesetzte Transfektionskomplexe in ihrer Transfektionseffektivität unterscheiden können, wurde zunächst das Verhältnis der TRIB3-Plasmid-DNA zum X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent variiert. Die HepG2 Zellen wurden mit verschiedenen Transfektionskomplexen transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. Die Ermittlung der TRIB3 Expression erfolgte auf RNA-Ebene mittels Realtime-PCR.

Es konnte gezeigt werden, dass erst ein Verhältnis von 1:2 (TRIB3-Plasmid-DNA zu HP DNA Transfection Reagent) eine Überexpression von TRIB3 ermöglicht. Eine weitere Steigerung der Überexpression konnte durch vermehrten Reagenzeinsatz nicht erzielt werden (s. Abbildung 2). Aufgrund dessen wurde in den Folgeexperimenten ein Transfektionskomplex mit 2µg TRIB3-Plasmid-DNA und 4µl X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent verwendet.

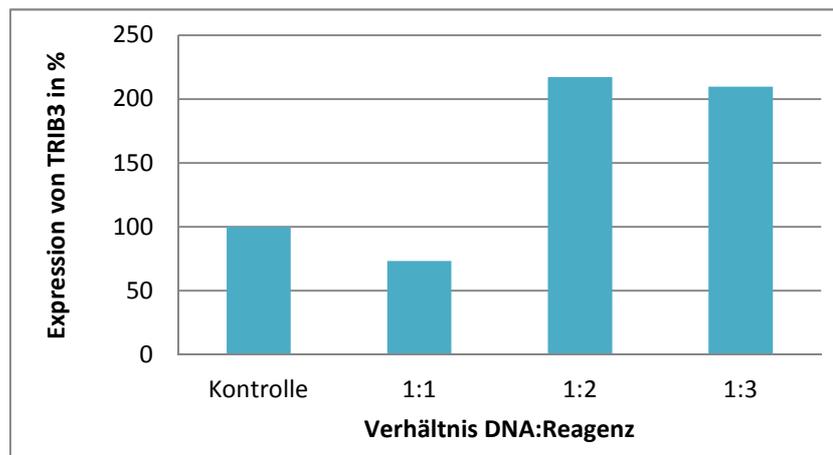


Abbildung 2: Austestung verschiedener Transfektionskomplexe

Es wurden 2 Millionen HepG2 Zellen/ 6-Well eingesetzt und für 24 Stunden mit den unterschiedlichen Transfektionskomplexen inkubiert. Das Verhältnis 1:1 entspricht 2µg DNA + 2µl Reagenz. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne DNA Zusatz verwendet. Die quantitative Erfassung der TRIB3 Expression erfolgte durch die Realtime-PCR. n=1

3.1.2 Nachweis der TRIB3 Überexpression im Zeitverlauf

Nach Etablierung der chemischen Transfektion wurde die TRIB3 Überexpression im Zeitverlauf bestimmt. HepG2 Zellen wurden mit dem TRIB3-Plasmid transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Die Überexpression wurde zum einen auf RNA-Ebene mittels Realtime-PCR und zum anderen auf Proteinebene mittels Westernblot ermittelt.

Die Expression von TRIB3 stieg sowohl auf RNA-Ebene (s. Abbildung 3) als auch auf Proteinebene (s. Abbildung 4) kontinuierlich und signifikant an. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Expression von TRIB3 auch in den Kontrollen über die Zeit zunimmt. 72 Stunden nach der Transfektion zeigte sich bei diesen im Mittel ein Anstieg von TRIB3 auf 368%. Da TRIB3 im Zuge von Glukose- oder Aminosäuremangel indu-

ziert wird [52], könnte sich dieser Anstieg auf einen Mangel an diesen Substraten zurückführen lassen. Aus diesem Grund wurden die weiteren Experimente 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war die TRIB3 Überexpression signifikant und das Expressionsniveau in den Kontrollen stabil.

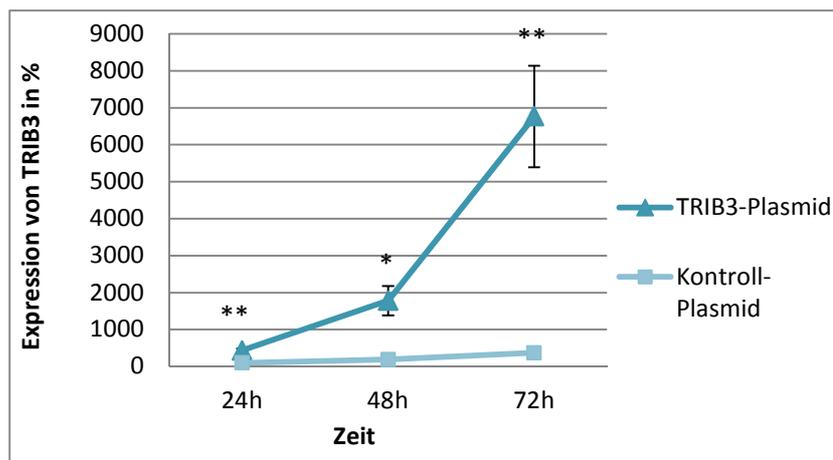


Abbildung 3: Überexpression von TRIB3 auf RNA-Ebene im Zeitverlauf

Je 2,6 Millionen HepG2 Zellen/6- Well wurden mit dem Plasmid transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Die quantitative Erfassung der TRIB3 Expression erfolgte durch die Realtime-PCR. Die Daten sind auf den 24 Stunden Wert des Kontrollplasmides bezogen und als Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE) angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 8$. Aufgrund des hohen Expressionsniveaus von TRIB3 sind einzelne Fehlerbalken nicht darstellbar.

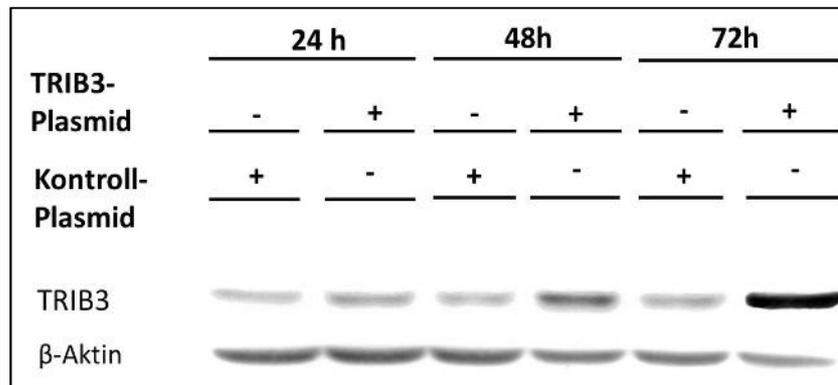


Abbildung 4: Überexpression von TRIB3 auf Proteinebene im Zeitverlauf

Je 2,6 Millionen HepG2 Zellen/ 6-Well wurden mit dem TRIB3-Plasmid bzw. dem Kontroll-Plasmid transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Anschließender Proteinnachweis im Westernblot.

3.1.3 Insulinstimulation nach TRIB3 Überexpression in HepG2 Zellen

Um zu prüfen, ob eine TRIB3 Überexpression zu einer Insulinresistenz führt, wurden HepG2 Zellen mit dem TRIB3-Plasmid transfiziert und nach 48 Stunden für 20 Minuten mit Insulin (50nmol/l) stimuliert. Als Maß für die Insulinsensibilität wurde die Phosphorylierung von AKT im Westernblot bestimmt. Da die Phosphorylierung von AKT einen essentiellen Bestandteil des intrazellulären Insulinsignalweges darstellt, lässt die Menge des gebildeten pAKTs Rückschlüsse auf die Insulinempfindlichkeit der Zellen zu.

Die Insulinstimulation führte in TRIB3 überexprimierenden Zellen zu einem geringeren Anstieg an pAKT als in den Kontrollen (s. Abbildung 5). Damit erzeugt eine TRIB3 Überexpression eine erhöhte Insulinresistenz. In der semiquantitativen Auswertung erwies sich die verminderte Phosphorylierung von AKT als signifikant (s. Abbildung 6). Außer pAKT (Ser 473) wurde im Westernblot auch die Gesamtmenge an AKT untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Expressionsniveau von AKT weder von der Insulin-

stimulation noch von der TRIB3 Überexpression beeinflusst wird (s. Abbildung 5). Hieraus lässt sich schließen, dass die Überexpression von TRIB3 zwar zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT führt, jedoch die Gesamtmenge an vorhandenem AKT nicht maßgeblich beeinflusst.

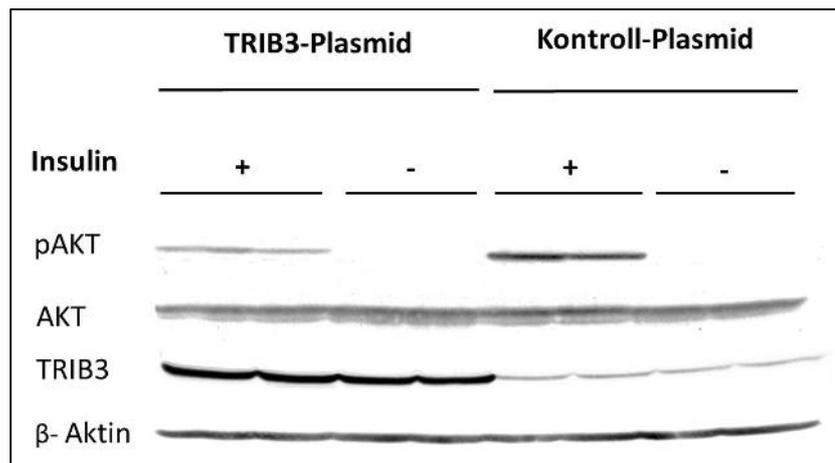


Abbildung 5: Insulinstimulation nach TRIB3 Überexpression

Je 2,6 Millionen HepG2 Zellen/ 6-Well wurden mit dem TRIB3-Plasmid bzw. dem Kontroll-Plasmid transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte bei der Hälfte der Wells eine 20-minütige Insulinstimulation (50nmol/l). Anschließender Proteinnachweis im Westernblot.

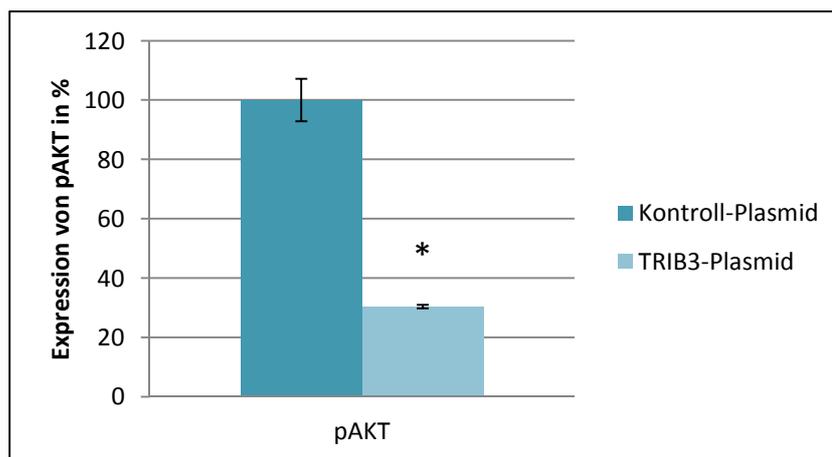


Abbildung 6: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach TRIB3 Überexpression: pAKT

Die Daten wurden unter Einbeziehung von β -Aktin normiert und sind auf die Werte des Kontroll-Plasmides bezogen. Angegeben wurden Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). * $p < 0,05$ $n=2$.

3.2 Einfluss eines TRIB3 Knockdowns auf die Insulinsensibilität von HepG2 Zellen

Im vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass eine TRIB3 Überexpression zu einer erhöhten Insulinresistenz führt. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob im Umkehrschluss ein Knockdown von TRIB3 die Insulinsensibilität verbessern kann.

3.2.1 Knockdown von TRIB3 durch den Einsatz von siRNA

Die Versuche zur Etablierung des Knockdowns von TRIB3 in HepG2 Zellen wurden von N. Pfeifroth durchgeführt. Für experimentelle Details verweise ich auf ihre Doktorarbeit „Untersuchungen zur TRIB3 abhängigen Modulation des hepatischen HDL-Stoffwechsels“. Der Knockdown von TRIB3 erfolgte durch den Einsatz von siRNA, die durch Elektroporation in die Zellen transfiziert wurde. Um einen möglichst hohen

Knockdown zu erzielen, wurden 3 Elektroporationsprotokolle untersucht und der Knockdown auf RNA Ebene mittels Realtime-PCR nachgewiesen.

Das Protokoll, das mit Rechteckspannung, 340V und 10msec durchgeführt wurde, erzielte den größten Knockdown mit einer TRIB3 Restexpression von 27% nach 24 Stunden und 19% nach 48 Stunden. Aufgrund dessen wurde in den folgenden Experimenten mit diesem Protokoll gearbeitet.

Um den bestmöglichen Zeitpunkt für die Experimente zu eruieren, wurde die Restexpression von TRIB3 12, 24 und 48 Stunden nach siRNA-Transfektion mittels Realtime-PCR gemessen. Die geringste Restexpression zeigte sich 48 Stunden nach Transfektion mit 16%, sodass die folgenden Experimente zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden.

3.2.2 Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown in HepG2 Zellen

Um zu überprüfen, ob ein TRIB3 Knockdown die Insulinsensibilität von HepG2 Zellen ohne vorher induzierte Insulinresistenz verbessern kann, wurden diese mit siRNA transfiziert und nach 48 Stunden für 20 Minuten mit Insulin (50 nmol/l) stimuliert. Die Ermittlung der Insulinsensibilität erfolgte durch die Darstellung von pAKT (Ser 473) im Westernblot.

Nach Insulinstimulation stieg pAKT (Ser 473) in TRIB3 Knockdown Zellen im gleichen Maß an wie in den Kontrollen (s. Abbildung 7). Demzufolge kann ein Knockdown von TRIB3 die Insulinsensibilität in HepG2 Zellen nicht verbessern. In der semiquantitativen Darstellung zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung von AKT (s. Abbildung 8). Im Westernblot wurde außerdem die Gesamtmenge an AKT untersucht. Diese wies, unabhängig vom TRIB3 Knockdown, ein stabiles Expressionsniveau auf (s. Abbildung 7).

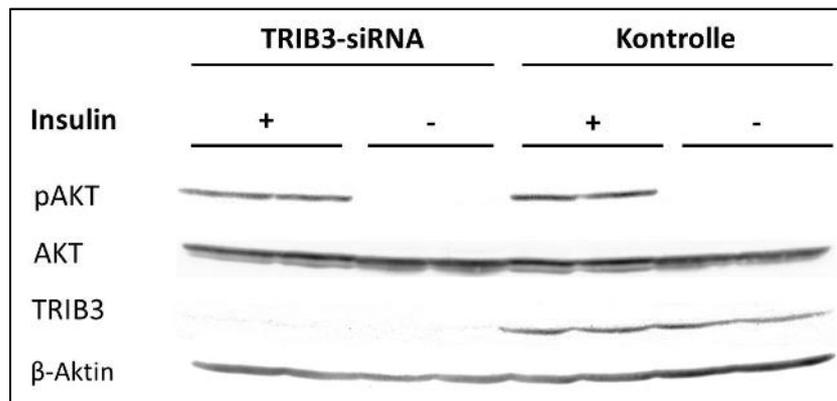


Abbildung 7: Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown

Die Zellen wurden durch Elektroporation mit siRNA (5nmol/l) transfiziert und in einer Konzentration von 1 Mio Zellen/ml in Wells kultiviert. Als Kontrolle wurde non-silencing siRNA eingesetzt. Nach 48 Stunden wurde die Hälfte der Proben für 20 Minuten mit Insulin (50nmol/l) stimuliert. Anschließender Proteinnachweis im Westernblot.

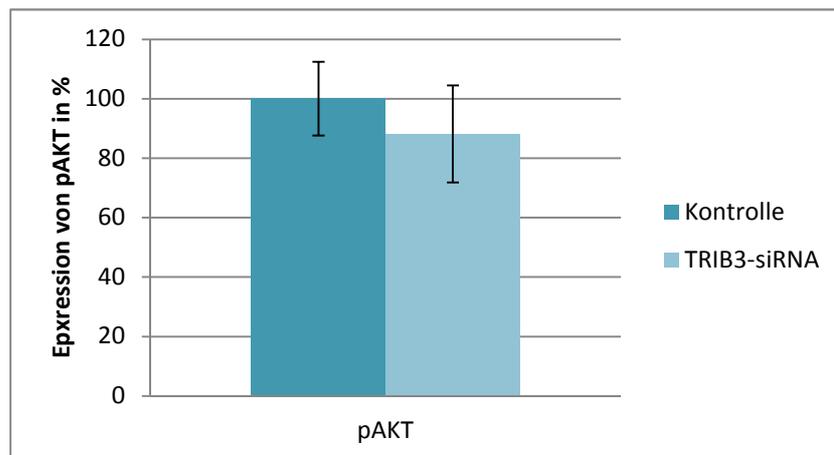


Abbildung 8: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown: pAKT

Die Daten wurden unter Einbeziehung von β-Aktin normiert und sind auf die Werte der Kontrolle (non-silencing siRNA) bezogen. Angegeben wurden Mittelwerte (M) ± Standardfehler (SE). n=2.

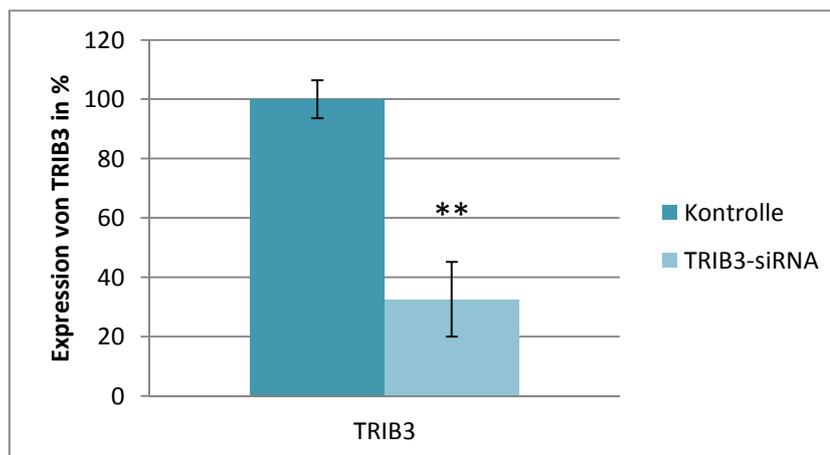


Abbildung 9: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown: TRIB3

Die Daten wurden unter Einbeziehung von β -Aktin normiert und sind auf die Werte der Kontrolle (non-silencing siRNA) bezogen. Angegeben wurden Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). $n=4$.

3.3 TRIB3 Knockdown in insulinresistenten HepG2 Zellen und dessen Einfluss auf die Insulinsensibilität

Im vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass ein TRIB3 Knockdown in insulinempfindlichen HepG2 Zellen keinen Einfluss auf deren Insulinsensibilität hat. Da aber in der Literatur beschrieben ist, dass ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Ratten die Insulinsensitivität verbessert [53], stellte sich die Frage, ob erst eine Insulinresistenz vorliegen muss, um einen Effekt des TRIB3 Knockdowns zu sehen. Aufgrund dessen wurde ein Modell insulinresistenter HepG2 Zellen etabliert und anschließend die Insulinsensibilität nach TRIB3 Knockdown untersucht.

3.3.1 Schaffung einer Insulinresistenz mit TRIB3 Anstieg in HepG2 Zellen

In der Literatur ist beschrieben, dass das Expressionsniveau von TRIB3 in der Leber von Mäusen mit Diabetes mellitus um ein 10-faches höher ist, als in Wildtypmäusen [24]. Darüber hinaus weisen übergewichtige, insulinresistente Patienten eine vermehrte TRIB3 Expression in der Leber auf [23]. Ebendiese Konstellation von Insulinresistenz und erhöhter TRIB3 Expression sollte in unserem Zellmodell geschaffen werden, um später den Einfluss eines TRIB3 Knockdowns in einer diabetesähnlichen Stoffwechsellage zu untersuchen.

Durch die Inkubation mit Palmitinsäure konnte laut J. Lee et al. [54] eine Insulinresistenz in HepG2 Zellen induziert werden. Im Folgenden wurde untersucht, ob dieses Ergebnis in unserem Zellmodell reproduziert werden kann. Vergleichend wurde das TRIB3 Expressionsniveau nach Inkubation mit Ölsäure gemessen, die, laut J. Lee et al., keine Insulinresistenz in HepG2 Zellen erzeugen kann. Diese ersten Versuche zur Induktion einer Insulinresistenz durch Palmitinsäure wurden von N. Pfeifroth durchgeführt. Für experimentelle Details verweise ich auf ihre Doktorarbeit „Untersuchungen zur TRIB3 abhängigen Modulation des hepatischen HDL-Stoffwechsels“. Zusammenfassend gelang es durch die Inkubation von Palmitinsäure, im Gegensatz zu Ölsäure, eine Induktion von TRIB3 zu erzielen. Ein signifikanter Anstieg von TRIB3 auf 235% konnte jedoch erst durch Erhöhung der Palmitinsäurekonzentration von 0,08 mmol/l auf 0,8 mmol/l verzeichnet werden.

Nachdem von N. Pfeifroth gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation mit Palmitinsäure zu einer TRIB3 Induktion führt, wurde nun überprüft, ob diese auch in unserem Zellmodell eine Insulinresistenz erzeugt. Hierfür wurden HepG2 Zellen in Wells kultiviert und für 6 Stunden mit Palmitinsäure (0,8 mmol/l) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Insulinstimulation (50 nmol/l). Als Maß für die Insulinsensibilität wurde die Phosphorylierung von AKT im Westernblot bestimmt.

Die Insulinstimulation führte in Zellen, die mit Palmitinsäure behandelt wurden, zu einer geringeren Phosphorylierung von AKT als in den Kontrollen (s. Abbildung 10). Infolgedessen induziert Palmitinsäure eine Insulinresistenz in HepG2 Zellen. In der semiquantitativen Auswertung stellte sich der verminderte Anstieg von pAKT als signifikant dar (s. Abbildung 11). Des Weiteren wurde in diesem Experiment TRIB3 im Westernblot nachgewiesen. Hier konnte bestätigt werden, dass TRIB3 nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene durch Palmitinsäure induziert wird (s. Abbildung 10). Ebenfalls untersucht wurde die Gesamtmenge an AKT. Diese erwies sich, unabhängig von der gebildeten Menge an pAKT und der Palmitinsäureinkubation, als konstant (s. Abbildung 10).

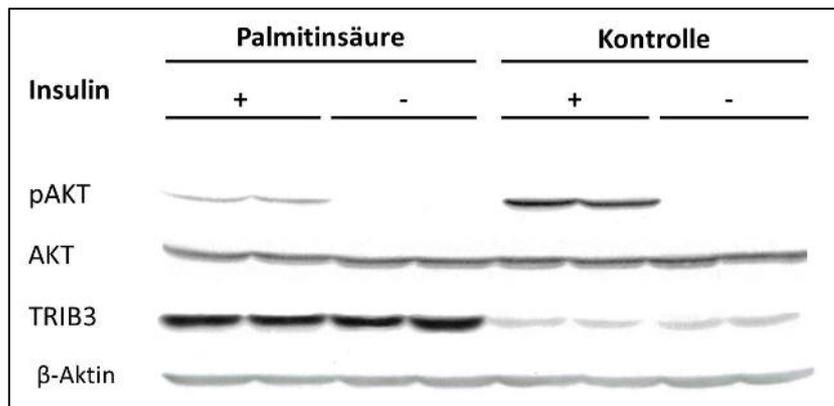


Abbildung 10: Insulinstimulation nach Palmitinsäureinkubation

Je 2 Millionen Zellen wurden über Nacht in Wells kultiviert und fasteten anschließend für 24 Stunden FCS. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit Palmitinsäure (0,8 mmol/l) für 6 Stunden und eine 20-minütige Insulinstimulation (50 nmol/l) bei der Hälfte der Wells. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer Lösung versehen, die die gleiche Menge Natronlauge und BSA enthielt, die zur Herstellung der Fettsäurelösung notwendig war. Anschließender Nachweis der Proteine im Westernblot.

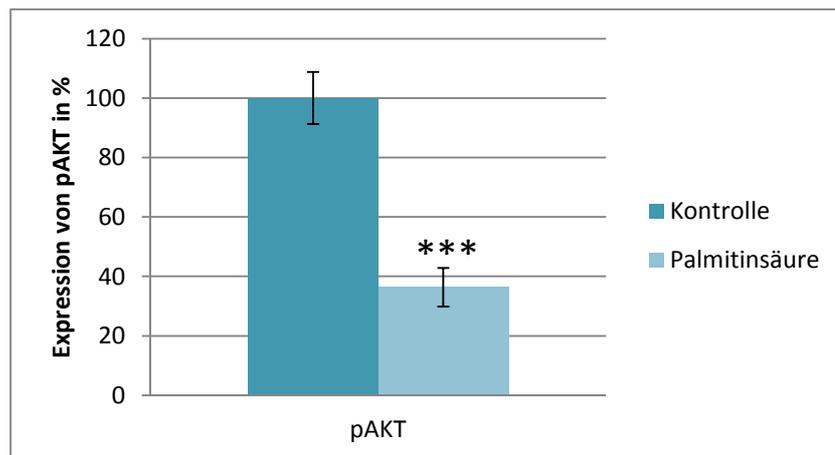


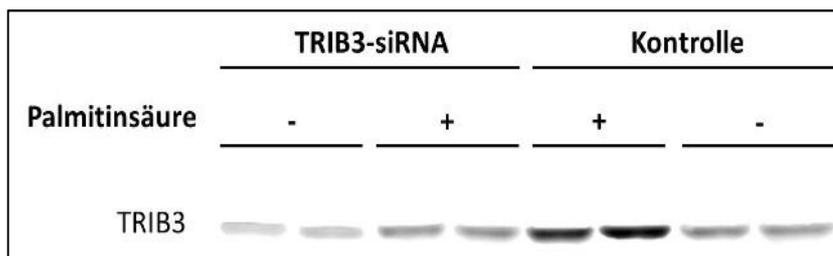
Abbildung11: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach Palmitinsäureinkubation: pAKT

*Die Daten wurden unter Einbeziehung von β -Aktin normiert und sind auf die Werte der Kontrolle (Lösung, die die gleiche Menge Natronlauge und BSA enthielt, die zur Herstellung der Fettsäurelösung notwendig war) bezogen. Angegeben wurden Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). *** $p < 0,001$; $n=6$.*

3.3.2 Knockdown von TRIB3 in insulinresistenten HepG2 Zellen

Nachdem ein Modell der Insulinresistenz mit TRIB3 Anstieg geschaffen werden konnte, wurde nun untersucht, ob unter diesen Bedingungen weiterhin ein stabiler TRIB3 Knockdown induziert werden kann. HepG2 Zellen wurden mit siRNA transfiziert, in Wells kultiviert und für 6 Stunden mit Palmitinsäure (0,8mmol/l) inkubiert. Die Höhe der TRIB3 Expression wurde im Westernblot ermittelt.

Es zeigte sich, dass das TRIB3 Expressionsniveau, trotz Fettsäurestimulation, durch den Einsatz von siRNA verringert werden konnte (s. Abbildung 12). Demnach hat die Behandlung der Zellen mit Palmitinsäure keinen Einfluss auf die verwendete Methodik.

**Abbildung 12: TRIB3 Knockdown unter Palmitinsäureinkubation**

Die Zellen wurden mittels Elektroporation mit TRIB3-siRNA (5 nmol/l) transfiziert und in einer Konzentration von 1 Millionen Zellen/ml über Nacht in Wells kultiviert. Anschließend fasteten die Zellen für 24 Stunden FCS und wurden für 6 Stunden mit Palmitinsäure (0,8 mmol/l) inkubiert. Als Kontrolle wurde non-silencing-siRNA eingesetzt. Anschließender Proteinnachweis im Westernblot.

3.3.3 Insulinstimulation insulinresistenter HepG2 Zellen nach TRIB3 Knockdown

Nachdem ein Modell der Insulinresistenz geschaffen werden konnte, wurde nun untersucht, ob ein TRIB3 Knockdown unter diesen Bedingungen die Insulinsensitivität verbessern kann. Hierfür wurden HepG2 Zellen mit TRIB3-siRNA transfiziert und in Wells kultiviert. Nach 6-stündiger Inkubation mit Palmitinsäure (0,8 mmol/l) erfolgte eine Stimulation mit Insulin (50 nmol/l) für 20 Minuten. Die Ermittlung der Insulinsensibilität erfolgte durch die Darstellung von pAKT (Ser 473) im Westernblot.

Nach Insulinstimulation stieg pAKT (Ser 473) in TRIB3-Knockdown-Zellen im gleichen Maß an wie in den Kontrollen (s. Abbildung 13). Demzufolge kann ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten HepG2 Zellen die Insulinsensibilität nicht verbessern. In der semiquantitativen Auswertung zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (s. Abbildung 14). Weiterhin wurde in diesem Experiment die Gesamtmenge von

AKT untersucht. Diese wies, unabhängig von den Versuchsbedingungen, ein stabiles Expressionsniveau auf.

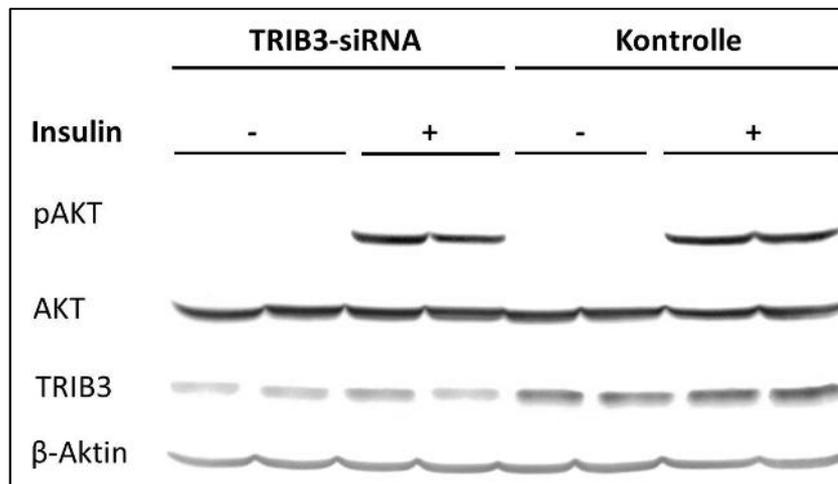


Abbildung 13: Insulinstimulation insulinresistenter HepG2 Zellen nach TRIB3 Knockdown

Die Zellen wurden mittels Elektroporation mit TRIB3-siRNA transfiziert und in einer Konzentration von 1 Millionen Zellen/ml über Nacht in Wells kultiviert. Nach 24-stündigem FCS-fasten wurden sie für 6 Stunden mit Palmitinsäure (0,8 mmol/l) inkubiert und anschließend für 20 Minuten mit Insulin (50 nmol/l) stimuliert. Als Kontrolle wurde non-silencing- siRNA eingesetzt. Proteinnachweis im Western-blot.

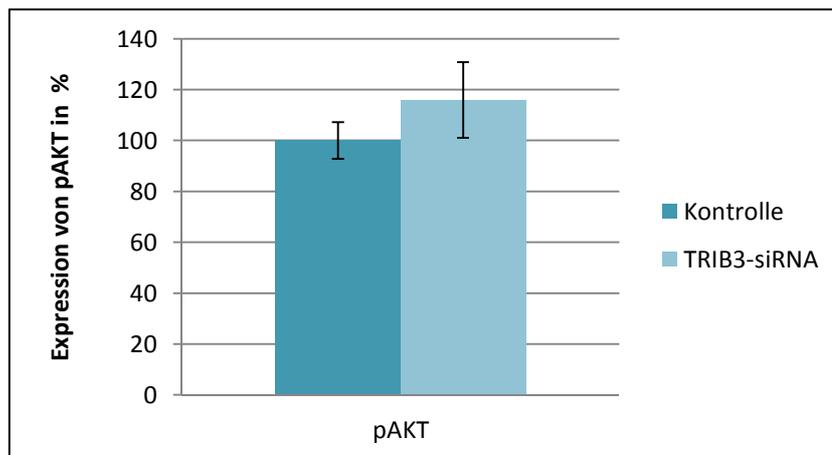


Abbildung 14: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation insulinresistenter HepG2 Zellen nach TRIB3 Knockdown: pAKT

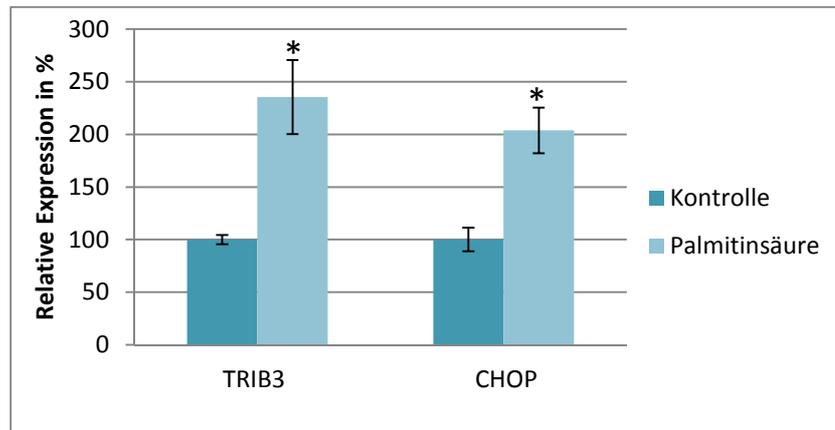
Die Daten wurden unter Einbeziehung von β -Aktin normiert und auf die Wert der Kontrolle bezogen. Angegeben wurden Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). $n=6$.

3.4 Einfluss von ER-Stress auf das Expressionsniveau von TRIB3

3.4.1 Palmitinsäure induziert TRIB3 möglicherweise via ER-Stress

Es ist mehrfach beschrieben, dass TRIB3 durch ER-Stress induziert werden kann [17, 18]. Da Palmitinsäure laut Literatur in der Lage ist, ER-Stress zu erzeugen [55], sollte untersucht werden, ob dies auch in unserem Zellmodell der Fall ist. Hierfür wurden HepG2 Zellen in Wells kultiviert und für 6 Stunden mit Palmitinsäure (0,8 mmol/l) inkubiert. Anschließend wurde als ER-Stress-Marker CHOP auf RNA-Ebene mittels Realtime-PCR bestimmt. CHOP ist ein Leukinzipper Transkriptionsfaktor und wird sowohl durch intra- als auch durch extrazellulären ER-Stress induziert [56].

Es zeigte sich, dass CHOP nach Palmitinsäurestimulation ein erhöhtes Expressionsniveau aufweist (s. Abbildung 15). Palmitinsäure erzeugt demnach auch in unserem Zellmodell ER-Stress und induziert möglicherweise auf diesem Weg TRIB3.

**Abbildung 15: Induktion von CHOP durch Palmitinsäure**

Je 2 Millionen Zellen wurden über Nacht in Wells kultiviert und fasteten anschließend für 24 Stunden FCS. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit Palmitinsäure (0,8 mmol/l) für 6 Stunden. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer Lösung versehen, die die gleiche Menge Natronlauge und BSA enthielt, die zur Herstellung der Fettsäurelösung notwendig war. Anschließend erfolgte die Ermittlung der TRIB3 bzw. CHOP Expression durch Realtime-PCR. Die Daten sind als Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE) angegeben und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle. * $p < 0,05$; $n = 9$ für TRIB3, $n = 5$ für CHOP

4 Diskussion

4.1 TRIB3 Überexpression

Mehrere Arbeiten mit diabetischen Mausmodellen konnten zeigen, dass mit der Diabetesinduktion eine TRIB3-Erhöhung im Lebergewebe einhergeht. Dabei scheint die Art, wie in den Tieren eine Insulinresistenz erzeugt wird, keine Rolle zu spielen, da sowohl genetische Veränderungen des Leptinrezeptors, als auch Diät-induzierte Adipositas zu einem Anstieg von TRIB3 bis auf das 10-fache im Vergleich zu den Kontrollen führt [24, 42, 57]. Dieses Phänomen konnte man aber nicht nur im Tiermodell beobachten. Vielmehr konnten Oberkofler et al. [23] zeigen, dass TRIB3 auch in übergewichtigen, insulinresistenten Menschen überexprimiert wird und es somit mit dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus assoziiert sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob eine TRIB3-Überexpression zu einer Insulinresistenz führt. Nach Etablierung einer stabilen Überexpression, konnte gezeigt werden, dass diese mit einer verminderten Phosphorylierung von AKT an Ser 473 nach Insulinstimulation einhergeht. Die HepG2 Zellen wiesen somit eine erhöhte Insulinresistenz auf. Da die genetische Deletion von AKT, vor allem im Lebergewebe, einen potenten Mechanismus für die Entstehung einer Insulinresistenz darstellt [36], könnte der TRIB3 vermittelten verringerten AKT-Aktivierung ein bedeutende Rolle in diabetischen Stoffwechselprozessen zukommen.

Unser Ergebnis konnte damit Arbeiten, wie die von Du et al.[24] oder Matsushima et al. [57], bestätigen, die ebenfalls eine TRIB3 Überexpression mit einer verminderten Phosphorylierung von AKT nach Insulinstimulation assoziierten. Darüber hinaus konnten diese Arbeitsgruppen aufzeigen, dass auch AKT-abhängige Signalwege durch die TRIB3 Überexpression inhibiert wurden, indem sie den verminderten Phosphorylierungsstatus von AKT-abhängigen Proteinen nachwiesen [24, 57].

Unser Ergebnis steht aber in direktem Gegensatz zu denen von Iynedjian et al. [45]. Sie demonstrierten, dass eine TRIB3 Überexpression, die sorgfältig für jedes Experiment überprüft wurde, die Phosphorylierung von AKT nach Insulinstimulation nicht beein-

flusst. Der Grund für diesen starken Gegensatz lässt sich nicht genau eruieren, könnte aber beispielsweise durch die Verwendung verschiedener Zellmodelle erklärt werden. So arbeiteten Iyndjian et al. mit primären Rattenleberzellen, während wir menschliche Tumorzellen, Du et al. [24] Rattentumorzellen und Matsushima et al. [57] primäre Mäuseleberzellen verwendeten. TRIB3 weist nämlich nicht nur in verschiedenem Gewebe ein unterschiedlich hohes Expressionsniveau auf [22], sondern wird auch, je nach verwendeter Zellart, durch den gleichen Stimulus induziert oder herabreguliert und verfügt in verschiedenen Zelllinien über unterschiedliche Interaktionsmöglichkeiten [4, 58].

Neben einer verminderten Phosphorylierung von AKT, konnten wir zeigen, dass sich die Gesamtmenge an AKT durch eine TRIB3 Überexpression nicht verändert. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Du et al. [24] überein, unterscheidet sich jedoch von denen von Wang et al. [28]. Hier nahm mit zunehmenden TRIB3 Spiegeln die Phosphorylierung von AKT, sowie die Gesamtmenge an AKT, ab. Dies lässt sich wahrscheinlich weniger auf die Verwendung eines Tiermodells [42] zurückführen, als vielmehr auf die Umstände der TRIB3 Induktion. Wang et al. fütterten Ratten für 16 Wochen mit einer hochkalorischen, fettreichen Diät, die mit erhöhten TRIB3 Spiegeln einherging. Da wir hingegen TRIB3 selektiv überexprimierten, lässt sich vermuten, dass AKT in dem Rattenmodell mit anderen Prozessen als der TRIB3 Überexpression interferierte und so herabreguliert wurde.

Inzwischen gibt es mehrere Arbeitsgruppen, die TRIB3 als Vermittler einer hepatischen Insulinresistenz [43, 44] sehen. Darüber hinaus konnten in vivo Überexpressionsversuche zeigen, dass TRIB3-transfizierte Tiere nach einer Fastenperiode während der Fütterungsphase erhöhte Glukose- und Insulinspiegel, sowie eine schlechtere Glukosetoleranz aufwiesen [24, 57]. Dies zeigt, dass TRIB3 auch in vivo Stoffwechselprozesse beeinflussen kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Ergebnisse die These stützen, dass TRIB3, durch Verminderung der AKT-Phosphorylierung, zu einer hepatischen Insulinresistenz beitragen kann.

4.2 TRIB3 Knockdown

Vieles deutet darauf hin, dass eine TRIB3 Überexpression zur Entstehung einer Insulinresistenz im Lebergewebe beitragen kann. Im Gegenzug stellt sich die Frage, ob ein Knockdown von physiologischen TRIB3-Spiegeln in insulinresistenten Zellen einen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT hat und somit deren Insulinsensitivität weiter steigern könnte.

Nach Etablierung eines stabilen TRIB3-Knockdowns untersuchten wir die Insulinsensitivität der HepG2 Zellen und konnten demonstrieren, dass ein TRIB3 Knockdown keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT nach Insulinstimulation hat. Demnach konnten die verminderten TRIB3 Spiegel die Insulinempfindlichkeit unserer Zellen nicht weiter steigern.

Unser Ergebnis steht damit in direktem Gegensatz zu der Arbeit von Du et al. [24], in denen ein TRIB3 Knockdown in HepG2 Zellen zu einer vermehrten Phosphorylierung von AKT führte.

Diese differente Beobachtung könnte durch einen ungenügenden TRIB3-Knockdown erklärt werden. Unser Knockdown zeigte sich im Mittel mit 80% auf mRNA-Ebene und 68% auf Proteinebene. Die Restexpression könnte zu stark sein, um den verminderten Effekt auf die AKT-Phosphorylierung beurteilen zu können. Beachtet man allerdings, dass Lee et al. mit einem Knockdown von 68% auf mRNA-Ebene eine vermehrte Phosphorylierung von AKT in insulinresistenten Zellen erzielen konnte [44], scheint dies den Unterschied nicht zu bedingen.

Vergleicht man zudem unser Knockdown-Modell mit dem von Du et al. [24], so zeigen sich grundlegende Unterschiede. Zum einen verwendeten Du et al. für einen Teil ihrer Experimente AKT-Transfektionsvektoren und schufen auf diesem Weg eine AKT-Überexpression. Da die Promotoraktivität von TRIB3 aber durch eine AKT Überexpression in HepG2 Zellen beeinflusst wird [59] und der inhibitorische Effekt von TRIB3 unter anderem von der Menge an Interaktionspartnern [59, 60] beeinflusst wird, ist das Modell von Du et al. von einer physiologischen Stoffwechsellage, in der wir den Knockdown untersuchten, abzugrenzen. Darüber hinaus führten Du et al. einen Knock-

down von TRIB3 nach vorhergegangener TRIB3 Überexpression durch. Dies zeigt zwar, dass der inhibitorische Effekt von TRIB3 auf die AKT-Phosphorylierung grundsätzlich umkehrbar ist, demonstriert dies aber viel eher in einer diabetischen Stoffwechsellage, in der TRIB3 überexprimiert ist, als unter physiologischen Bedingungen.

Du et al. [24] und Cheng et al. [60] zeigten in ihren Experimenten, dass TRIB3 sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch bei einer TRIB3 Überexpression, an AKT bindet und postulierten, dass TRIB3 durch diese direkte Protein-Protein-Interaktion die Phosphorylierung von AKT verhindert. Bisher konnte aber nur gezeigt werden, dass eine Störung dieser Verbindung während einer TRIB3 Überexpression zur vermehrten Phosphorylierung von AKT und damit zu einer erhöhten Insulinempfindlichkeit führt [60]. Bezieht man unser Ergebnis in diese Überlegung mit ein, lässt sich vermuten, dass die Bindung von TRIB3 an AKT unter physiologischen Bedingungen einen differenten Effekt aufweist und erst eine TRIB3-Überexpression, wie in db/db Mäusen, vorliegen muss, damit TRIB3 seinen inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierung von AKT ausüben kann.

Auch in vivo wird ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Tieren kontrovers diskutiert. Im Unterschied zu unserem Ergebnis, führte ein adenoviral vermittelter TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Mäusen bei Koo et al. [43] und Wang et al. [61] zu einer verbesserten Insulinempfindlichkeit. Die Versuchstiere wiesen eine erhöhte Glukosetoleranz oder erniedrigte Blutglukosespiegel im Vergleich zu den Kontrollen auf. Beachtet man allerdings, dass beide Arbeitsgruppen den Phosphorylierungsstatus von AKT im Lebergewebe nicht untersuchten, lässt sich vermuten, dass die erhöhte Glukosetoleranz durch einen anderen Mechanismus oder durch ein anderes Organ vermittelt wird. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch schon Weismann et al. [53], die zeigten, dass ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Ratten zwar die Insulinempfindlichkeit verbessert, aber die AKT-Aktivität im Lebergewebe unverändert bleibt.

Im Gegensatz zu diesen beiden Arbeitsgruppen zeigte eine genetische Deletion von

TRIB3 bei Untersuchungen von Okamoto et al. [46] keine Veränderung in der Glukosehomeostase. Darüber hinaus konnten sie keinen Unterschied in der Phosphorylierung von AKT im Lebergewebe nach Insulinstimulation feststellen.

Zusammenfassend stützt unser Ergebnis somit die Untersuchungen von Okamoto et al. [46]: Ein Knockdown von TRIB3 scheint insulinsensitives Lebergewebe nicht noch insulinsensitiver zu machen, indem er die Phosphorylierung von AKT nach Insulinstimulation erhöht. Ob ein Knockdown von TRIB3 in insulinsensiblen Tiermodellen allerdings über einen anderen Mechanismus zur verbesserten Glukosetoleranz führen kann, sollte noch weiter untersucht werden.

Dieses Ergebnis muss jedoch klar von einem Knockdown in einer insulinresistenten Stoffwechsellage unterschieden werden. In db/db Mausmodellen, sowie in insulinresistenten Menschen, ist TRIB3 nämlich konstitutionell erhöht und reagiert nicht mehr auf äußere Reize, wie eine Insulinstimulation [57]. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass ein Knockdown von TRIB3 in insulinsensiblen Zellen zu einer vermehrte Phosphorylierung von S6K, einer ribosomalen Serin/Threoninkinase, führt [57], während der umgekehrte Effekt im diabetischen Mausmodell, aufgrund einer konstitutionellen Überexpression von beiden Proteinen, nicht gezeigt werden konnte. Demnach werden die zellulären Signalwege in der diabetischen Stoffwechsellage auf andere Weise reguliert und ein TRIB3 Knockdown könnte in der Insulinresistenz divergente Effekte aufweisen.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt der TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Zellen untersucht.

4.3 TRIB3 Knockdown in der Insulinresistenz

Es ist bekannt, dass der Fettsäurespiegel im Serum von Patienten mit Typ 2 Diabetes erhöht ist und eine Erhöhung der freien Fettsäuren zur Entstehung einer hepatischen Insulinresistenz beitragen kann [33, 62]. Aus diesem Grund wählten wir Fettsäuren um in HepG2 Zellen eine Insulinresistenz zu erzeugen. Da TRIB3 im Lebergewebe insulin-

resistenter Menschen [23], sowie in vielen diabetischen Tiermodellen [42], erhöht ist, sollte hierdurch TRIB3 induziert werden.

Bei der Etablierung dieses Zellmodells zeigte sich, dass Palmitinsäure in der Lage ist TRIB3 zu induzieren, Ölsäure hingegen nicht. Palmitinsäure vermittelt im Gegensatz zu Ölsäure in der Leber ER-Stress und kann darüber eine Insulinresistenz erzeugen [54, 55]. Da TRIB3 durch ER-Stress induziert wird [16] und ER-Stress in die Pathogenese von Insulinresistenz und Diabetes involviert ist [13], könnte TRIB3 eine Rolle in der Palmitinsäure-vermittelten Insulinresistenz zukommen.

Als ER-Stress Induktor kann Palmitinsäure eine Reihe von Genen induzieren, die die Unfolded protein response (vergleiche Kapitel 1.2.1) initiiert. Dazu gehören beispielsweise IRE1 oder ATF4, über deren Induktion Chaperone die Faltungskapazität des ERs vergrößern [55, 63]. Daneben steigt die Phosphorylierung von JNK, einem proapoptotischen Protein, dem eine mögliche Rolle in der Pathogenese von Übergewicht und Diabetes zugeschrieben wird [63]. Einige Quellen gehen davon aus, dass über die vermehrte Phosphorylierung von JNK die Palmitinsäure induzierte Insulinresistenz erzeugt wird. Aktiviertes JNK soll dabei die Phosphorylierung des IRS an Serinresten erhöhen und damit eine Interaktion von IRS mit dem Insulinrezeptor verhindern [54, 64]. Somit wäre der intrazelluläre Insulinsignalweg blockiert. Jüngste Arbeiten lassen aber begründete Zweifel an dieser These aufkommen [63, 65], da unter anderem in in-vivo Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Serin-Phosphorylierung des IRS sogar vor Diät-induzierter Insulinresistenz schützt [63, 65]. Aus diesem Grund sollte auch nach anderen Proteinen gesucht werden, die die Palmitinsäure-induzierte Insulinresistenz vermitteln.

Im Mittelpunkt der Palmitinsäure-induzierten Insulinresistenz steht immer wieder die verminderte Phosphorylierung von AKT [54, 63]. Da TRIB3 in der Lage ist die Phosphorylierung von AKT durch direkte Protein-Protein Interaktion zu hemmen [24, 60] und zudem noch durch ER-Stress induziert wird [16, 17], stellt es ein interessantes Target in der Palmitinsäure-induzierten Insulinresistenz von Lebergewebe dar. Des Weiteren

ren wurde bereits postuliert, dass eine ER-Stress getriggerte TRIB3 Induktion, durch die verminderte Phosphorylierung von AKT, zur Insulinresistenz nach starkem Alkoholkonsum beitragen könnte [20]. Um den Zusammenhang zwischen ER-Stress induzierter Insulinresistenz der Palmitinsäure und TRIB3 genauer zu untersuchen, führten wir in unseren HepG2 Zellen einen TRIB3 Knockdown durch und inkubierten sie anschließend mit Palmitinsäure. Wäre die TRIB3 Induktion für die verminderte Phosphorylierung von AKT verantwortlich, so sollte sich nach dem Knockdown die Insulinsensitivität verbessern, indem AKT wieder vermehrt phosphoryliert und damit aktiviert wird. Ebendiesen Effekt konnten wir aber nach einer Insulinstimulation nicht zeigen; das Phosphorylierungslevel von AKT war im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Demnach scheint eine Palmitinsäure-vermittelte TRIB3 Induktion die verminderte Phosphorylierung von AKT nicht zu bedingen.

Einige Studien konnten aber bereits zeigen, dass eine ER-Stress Reduktion in Palmitinsäure-behandelten Zellen zu einer vermehrten Phosphorylierung von AKT führte [54, 63, 66]. Aus diesem Grund stellen weitere ER-Stress induzierbare Gene attraktive Vermittler in der Palmitinsäure-induzierten Insulinresistenz dar und bedürfen weiterer Erforschung.

Obwohl die Palmitinsäure-induzierte Insulinresistenz nicht durch TRIB3 vermittelt wird, könnte die Pseudoproteinkinase doch unter anderen Bedingungen zu einer Insulinresistenz beitragen. Liu et al. [44] konnten in HepG2 Zellen demonstrieren, dass eine durch Homocystein-vermittelte Insulinresistenz mit einer TRIB3 Induktion einhergeht und ein Knockdown von TRIB3 in diesem Modell zu einer Restitution der AKT-Phosphorylierung nach Insulinstimulation führt. Bemerkenswert an diesen Untersuchungen ist die Tatsache, dass die TRIB3 Induktion beziehungsweise die Insulinresistenz nachweislich nicht über ER-Stress vermittelt wurde. Diese Untersuchung lässt die Vermutung zu, dass die Rolle von TRIB3 in der Insulinresistenz ER-Stress unabhängig ist. Möglicherweise konnten wir aus diesem Grund in unserem Zellmodell durch einen TRIB3 Knockdown die Insulinresistenz nicht verbessern, da ihm durch die ER-Stress Induktion eine differente Rolle zukommt.

Nichtsdestoweniger zeigen in vivo Experimente, dass akute [42] oder chronische Bewegung [67] von diabetischen, beziehungsweise übergewichtigen Mäusen, mit einer Herabregulierung von TRIB3 und verbesserter Insulinresistenz einhergehen. Außerdem konnte ein selektiver TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Ratten die Insulinsensitivität vor allem im Muskelgewebe verbessern [53] und ein TRIB3 Knockdown in diabetischen Mäusen sowohl den Blutglukosespiegel, als auch die HOMA-Insulinresistenz [61] senken. Diese Arbeiten zeigen, dass TRIB3 durchaus einen Angriffspunkt in der Therapie der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus bieten könnte. Ob die Verbesserung der Insulinresistenz durch einen TRIB3 Knockdown in einer diabetischen Stoffwechsellage dabei über eine vermehrte Phosphorylierung von AKT oder womöglich über andere intrazelluläre Signalwege erreicht wird [53], bedarf noch weiterer Erforschung.

Da sich die TRIB3 Induktion von Palmitinsäure nicht durch die Vermittlung der Insulinresistenz erklären lässt, stellt sich die Frage, welche andere Rolle TRIB3 in diesem Modell zukommen könnte.

In der Literatur ist beschrieben, dass Palmitinsäure über ER-Stress nicht nur eine Insulinresistenz, sondern auch Apoptose vermitteln kann. Cho et al. [68] zeigten, dass die Apoptoserate von HepG2 Zellen nach Behandlung mit Palmitinsäure signifikant ansteigt und diese durch die Vorbehandlung mit chemischen Chaperonen, die bekanntermaßen den ER-Stress reduzieren, gesenkt wird. CHOP vermittelt, durch Palmitinsäure getriggert [55, 68], Apoptose [12, 69]. In unserem Zellmodell konnten wir einen Anstieg von CHOP auf 200% nach Palmitinsäurebehandlung messen. Da CHOP zusammen mit ATF4 TRIB3 induzieren kann [16], lässt sich vermuten, dass TRIB3 in unserem Zellmodell als Vermittler der Apoptose auftreten könnte. Darüber hinaus konnten wir erst einen signifikanten Anstieg von TRIB3 erzielen, indem wir die Palmitinsäurekonzentration auf 0,8 mM erhöhten. Beachtet man, dass die Palmitinsäure-induzierte Apoptose konzentrationsabhängig ist [68], so kann dies ein weiterer Hinweis dafür sein, dass TRIB3 im Rahmen der ER-stress vermittelten Apoptose induziert wird. Des Weiteren

ren konnte eine anderen Arbeitsgruppe die ER-Stress induzierte Apoptose durch einen TRIB3 Knockdown abmildern [16]. Dieser Effekt konnte auch in PC-12 Zellen, einem neuronalem Zellmodell, demonstriert werden [18], wobei die Autoren hier die Apoptose auf eine TRIB3 vermittelte verringerte Phosphorylierung von AKT zurückführten. Diesen molekularen Mechanismus konnten wir in der vorliegenden Arbeit nicht stützen, da ein TRIB3 Knockdown vor Palmitinsäureinkubation nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung von AKT führte. Nichtsdestoweniger schreiben andere Autoren TRIB3 während des ER-Stresses einen zytoprotektiven Effekt zu, der die ER-Stress induzierte Apoptose sogar hinauszögern kann [70]. Demnach kann die Rolle der Palmitinsäurevermittelten TRIB3 Induktion zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden.

Die Rolle von TRIB3 unter Stress-Bedingungen wird kontrovers diskutiert. TRIB3 scheint durch negativen Feedback die transkriptionelle Aktivität von ATF4 und CHOP zu hemmen [16, 21] und auf diesem Weg die Stressantwort begrenzen. Darüber hinaus soll TRIB3 das Überleben gestresster Zellen sogar positiv beeinflussen [70, 71]. Dem Gegenüber postulieren andere Autoren, dass TRIB3 durch ER-Stress Insulinresistenz fördert [72] und zur Apoptose beiträgt [16, 18]. Die verschiedenen Rollen von TRIB3 während Stresssituation werden vor allem von der Schwere des vorherrschenden ER-Stresses abhängig gemacht und so schreiben verschiedene Autoren TRIB3 eine Rolle als ER-Stress-Sensor zu, der sowohl Zellüberleben als auch Apoptose vermitteln kann [16, 21, 70]. Da die Rolle von TRIB3 während des Zellstress aber weiterhin noch nicht klar umrissen ist, müssen weitere Versuche erfolgen um TRIB3 besser zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien sagen einen starken Anstieg der Prävalenz des Diabetes mellitus voraus. Da der Diabetes mellitus Typ 2 mit einem Anteil von 90-95% die weitaus häufigste Entität dieser Erkrankungsgruppe darstellt, ist es von entscheidender Bedeutung, die molekularen Mechanismen zu erforschen, die zu diesem Krankheitsbild beitragen. Die Insulinresistenz stellt ein sehr frühes Ereignis in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 dar und kann nachgewiesen werden, lange bevor das Krankheitsbild in Erscheinung tritt. Tribbles Pseudokinase 3 (TRIB3) steht in der Diskussion eine Insulinresistenz zu erzeugen. Es soll durch direkte Protein-Protein-Interaktion den intrazellulären Insulinsignalweg blockieren, indem es die Phosphorylierung des Schlüsselproteins AKT verhindert. Da die Rolle von TRIB3 bei der Entstehung einer Insulinresistenz allerdings kontrovers diskutiert wird, sollte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des TRIB3 Expressionsniveaus bezüglich einer hepatischen Insulinresistenz besser charakterisiert werden.

In der Leber diabetischer Mäuse und insulinresistenter Menschen wurde eine TRIB3 Überexpression bis auf das 10-fache gegenüber den Kontrollen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob eine isolierte TRIB3 Überexpression in unserem Zellmodell eine Insulinresistenz schaffen kann. Hierfür wurden die HepG2 Zellen mit einem TRIB3 Plasmid chemisch transfiziert und anschließend mit Insulin stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine selektive Überexpression von TRIB3 zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT und damit zu einer Insulinresistenz führt.

Im Umkehrschluss sollte anschließend untersucht werden, ob ein Knockdown von TRIB3 die Insulinsensibilität weiter verbessern kann. Hierfür wurde TRIB3-siRNA mittels Elektroporation in die HepG2 Zellen transfiziert und diese im Anschluss mit Insulin stimuliert. Es zeigte sich, dass ein TRIB3 Knockdown keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT nach Insulinstimulation hat und die Insulinempfindlichkeit von insulinensiblen Zellen demnach nicht weiter steigern kann.

Da die intrazellulären Mechanismen in einer insulinresistenten Stoffwechsellage jedoch auf andere Weise reguliert werden, ist dieses Ergebnis klar von einer diabetischen

Stoffwechsellage abzugrenzen. Um diese zu simulieren, wurde ein neues Zellmodell etabliert. Wir inkubierten HepG2 Zellen mit Palmitinsäure und konnten nachweisen, dass anschließend sowohl eine TRIB3 Überexpression als auch eine Insulinresistenz (verminderte Phosphorylierung von AKT) vorliegt. Um zu überprüfen, ob ein Knockdown von TRIB3 die Palmitinsäure vermittelte Insulinresistenz verbessern kann, wurde TRIB3 mittels Einsatz von siRNA herabreguliert, die Zellen anschließend mit Palmitinsäure inkubiert und letztlich mit Insulin stimuliert. Es zeigte sich, dass ein TRIB3 Knockdown nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung von AKT und damit zu einer besseren Insulinsensibilität führt. TRIB3 scheint demnach die Palmitinsäure vermittelte Insulinresistenz nicht zu vermitteln. Nichtsdestoweniger konnten wir nachweisen, dass durch die Palmitinsäureinkubation die Expression von CHOP, einem proapoptotischem Protein des Endoplasmatischen Retikulum Stresses, steigt. In der Literatur ist beschrieben, dass TRIB3 durch CHOP induziert werden kann und so lässt sich diskutieren, ob TRIB3 möglicherweise in diesem Zusammenhang induziert wird und in unserem Zellmodell zur Apoptose beiträgt. Die Rolle von TRIB3 in Stresssituationen bedarf aber noch weiterer Erforschung, da ihm sowohl zytoprotektive als auch zytotoxische Eigenschaften nachgesagt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Passa P: Diabetes trends in Europe. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2002, 18 Suppl 3:S3-8.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 2004, 27(5):1047-1053.
3. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care* 2012, 35, Suppl 1:S64-74.
4. Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E: Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006, 63(14):1632-1641.
5. Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR: Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* 2006, 16(9):443-452.
6. Takahashi Y, Ohoka N, Hayashi H, Sato R: TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARgamma transcriptional activity. *J Lipid Res* 2008, 49(4):880-892.
7. Shang YY, Wang ZH, Zhang LP, Zhong M, Zhang Y, Deng JT, Zhang W: TRB3, upregulated by ox-LDL, mediates human monocyte-derived macrophage apoptosis. *The FEBS journal* 2009, 276(10):2752-2761.
8. Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, Screaton R, Goebel N, Niessen S, Macleod IX, Liew CW, Kulkarni RN, Bain J *et al*: TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science* 2006, 312(5781):1763-1766.
9. Rassow J: Biochemie. *Duale Reihe* 2006.
10. Kaufman RJ: Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 2002, 110(10):1389-1398.
11. Mori K: Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000, 101(5):451-454.
12. Oyadomari S, Mori M: Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation* 2004, 11(4):381-389.
13. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004, 306(5695):457-461.

14. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y *et al*: Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 2005, 280(1):847-851.
15. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS: Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006, 313(5790):1137-1140.
16. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H: TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 2005, 24(6):1243-1255.
17. Corcoran CA, Luo X, He Q, Jiang C, Huang Y, Sheikh MS: Genotoxic and endoplasmic reticulum stresses differentially regulate TRB3 expression. *Cancer Biol Ther* 2005, 4(10):1063-1067.
18. Zou CG, Cao XZ, Zhao YS, Gao SY, Li SD, Liu XY, Zhang Y, Zhang KQ: The molecular mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in PC-12 neuronal cells: the protective effect of insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 2009, 150(1):277-285.
19. Ord D, Ord T: Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochemical and biophysical research communications* 2005, 330(1):210-218.
20. He L, Marecki JC, Serrero G, Simmen FA, Ronis MJ, Badger TM: Dose-dependent effects of alcohol on insulin signaling: partial explanation for biphasic alcohol impact on human health. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2007, 21(10):2541-2550.
21. Jousse C, Deval C, Maurin AC, Parry L, Cherasse Y, Chaveroux C, Lefloch R, Lenormand P, Bruhat A, Fafournoux P: TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J Biol Chem* 2007, 282(21):15851-15861.
22. Liu J, Wu X, Franklin JL, Messina JL, Hill HS, Moellering DR, Walton RG, Martin M, Garvey WT: Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: role in glucose-induced insulin resistance. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2010, 298(3):E565-576.
23. Oberkofler H, Pfeifenberger A, Soyal S, Felder T, Hahne P, Miller K, Krempler F, Patsch W: Aberrant hepatic TRIB3 gene expression in insulin-resistant obese humans. *Diabetologia* 2010, 53(9):1971-1975.

24. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M: TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003, 300(5625):1574-1577.
25. Prudente S, Hribal ML, Flex E, Turchi F, Morini E, De Cosmo S, Bacci S, Tassi V, Cardellini M, Lauro R *et al*: The functional Q84R polymorphism of mammalian Tribbles homolog TRB3 is associated with insulin resistance and related cardiovascular risk in Caucasians from Italy. *Diabetes* 2005, 54(9):2807-2811.
26. Shi Z, Liu J, Guo Q, Ma X, Shen L, Xu S, Gao H, Yuan X, Zhang J: Association of TRB3 gene Q84R polymorphism with type 2 diabetes mellitus in Chinese population. *Endocrine* 2009, 35(3):414-419.
27. Bi XP, Tan HW, Xing SS, Wang ZH, Tang MX, Zhang Y, Zhang W: Overexpression of TRB3 gene in adipose tissue of rats with high fructose-induced metabolic syndrome. *Endocr J* 2008, 55(4):747-752.
28. Wang YG, Shi M, Wang T, Shi T, Wei J, Wang N, Chen XM: Signal transduction mechanism of TRB3 in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2009, 15(19):2329-2335.
29. Schartl M, Gessler M, Von Eckardstein A: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. *Elsevier GmbH, München* 2009:657-658.
30. Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM: The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochimica et biophysica acta* 2002, 1584(2-3):73-80.
31. Bajaj M, DeFronzo RA: Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 2003, 10(3):311-323.
32. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005, 365(9467):1333-1346.
33. DeFronzo RA: Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *International journal of clinical practice Supplement* 2004(143):9-21.
34. Maehama T, Dixon JE: PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in cell biology* 1999, 9(4):125-128.
35. Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, Jefferies C, Liadis N, Giacca A, Crackower M, Suzuki A, Mak TW, Kahn CR *et al*: Muscle-specific Pten

- deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Molecular and cellular biology* 2005, 25(3):1135-1145.
36. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001, 292(5522):1728-1731.
37. George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, Soos MA, Murgatroyd PR, Williams RM, Acerini CL *et al*: A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* 2004, 304(5675):1325-1328.
38. Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP: Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999, 42(7):819-825.
39. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H: Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 1998, 47(8):1281-1286.
40. Samuel VT, Shulman GI: Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012, 148(5):852-871.
41. DeFronzo RA: Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009, 58(4):773-795.
42. Lima AF, Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, Pinho RA, Velloso LA, De Souza CT: Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. *Journal of cellular physiology* 2009, 221(1):92-97.
43. Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, Montminy M: PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nature medicine* 2004, 10(5):530-534.
44. Liu WJ, Ma LQ, Liu WH, Zhou W, Zhang KQ, Zou CG: Inhibition of hepatic glycogen synthesis by hyperhomocysteinemia mediated by TRB3. *The American journal of pathology* 2011, 178(4):1489-1499.
45. Iynedjian PB: Lack of evidence for a role of TRB3/NIPK as an inhibitor of PKB-mediated insulin signalling in primary hepatocytes. *The Biochemical journal* 2005, 386(Pt 1):113-118.

46. Okamoto H, Latres E, Liu R, Thabet K, Murphy A, Valenzeula D, Yancopoulos GD, Stitt TN, Glass DJ, Sleeman MW: Genetic deletion of Trb3, the mammalian *Drosophila* tribbles homolog, displays normal hepatic insulin signaling and glucose homeostasis. *Diabetes* 2007, 56(5):1350-1356.
47. Knowles BB, Howe CC, Aden DP: Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980, 209(4455):497-499.
48. Rychahou PG, Jackson LN, Farrow BJ, Evers BM: RNA interference: mechanisms of action and therapeutic consideration. *Surgery* 2006, 140(5):719-725.
49. Cousin SP, Hugl SR, Wrede CE, Kajio H, Myers MG, Jr., Rhodes CJ: Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 2001, 142(1):229-240.
50. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239(4839):487-491.
51. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
52. Schwarzer R, Dames S, Tondera D, Klippel A, Kaufmann J: TRB3 is a PI 3-kinase dependent indicator for nutrient starvation. *Cellular signalling* 2006, 18(6):899-909.
53. Weismann D, Erion DM, Ignatova-Todorava I, Nagai Y, Stark R, Hsiao JJ, Flannery C, Birkenfeld AL, May T, Kahn M *et al*: Knockdown of the gene encoding *Drosophila* tribbles homologue 3 (Trib3) improves insulin sensitivity through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation in a rat model of insulin resistance. *Diabetologia* 2011, 54(4):935-944.
54. Lee JY, Cho HK, Kwon YH: Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism* 2009.
55. Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A: Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 2006, 147(7):3398-3407.

56. Ohoka N, Hattori T, Kitagawa M, Onozaki K, Hayashi H: Critical and functional regulation of CHOP (C/EBP homologous protein) through the N-terminal portion. *J Biol Chem* 2007, 282(49):35687-35694.
57. Matsushima R, Harada N, Webster NJ, Tsutsumi YM, Nakaya Y: Effect of TRB3 on insulin and nutrient-stimulated hepatic p70 S6 kinase activity. *J Biol Chem* 2006, 281(40):29719-29729.
58. Sung HY, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E: Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunology letters* 2006, 104(1-2):171-177.
59. Ding J, Kato S, Du K: PI3K activates negative and positive signals to regulate TRB3 expression in hepatic cells. *Experimental cell research* 2008, 314(7):1566-1574.
60. Cheng KK, Iglesias MA, Lam KS, Wang Y, Sweeney G, Zhu W, Vanhoutte PM, Kraegen EW, Xu A: APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice. *Cell metabolism* 2009, 9(5):417-427.
61. Wang ZH, Shang YY, Zhang S, Zhong M, Wang XP, Deng JT, Pan J, Zhang Y, Zhang W: Silence of TRIB3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in diabetic ApoE^{-/-}/LDL receptor^{-/-} mice. *Diabetes* 2012, 61(2):463-473.
62. Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferrannini E, DeFronzo RA: The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1991, 72(1):96-107.
63. Achard CS, Laybutt DR: Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology* 2012, 153(5):2164-2177.
64. Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M: Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(44):16454-16459.
65. Copps KD, Hancer NJ, Opare-Ado L, Qui W, Walsh C, White MF: Irs1 Serine 307 Promotes Insulin Sensitivity in Mice. *Cell metabolism* 2010, 11:84-92.
66. Han MS, Chung KW, Cheon HG, Rhee SD, Yoon CH, Lee MK, Kim KW, Lee MS: Imatinib mesylate reduces endoplasmic reticulum stress and induces remission of diabetes in db/db mice. *Diabetes* 2009, 58(2):329-336.

67. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, Colantonio E, D'Almeida V, Pauli JR: Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *Journal of cellular physiology* 2012, 227(7):2917-2926.
68. Cho H, Lee J, Jang Y, Kwon YH: Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Palmitate-induced Apoptosis in HepG2 Cells. *Official Journal of Korean Society of Toxicology* 2008, 24:129-135.
69. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D: CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development* 1998, 12(7):982-995.
70. Shimizu K, Takahama S, Endo Y, Sawasaki T: Stress-inducible caspase substrate TRB3 promotes nuclear translocation of procaspase-3. *PloS one* 2012, 7(8):e42721.
71. Ord D, Meerits K, Ord T: TRB3 protects cells against the growth inhibitory and cytotoxic effect of ATF4. *Experimental cell research* 2007, 313(16):3556-3567.
72. He L, Simmen FA, Mehendale HM, Ronis MJ, Badger TM: Chronic ethanol intake impairs insulin signaling in rats by disrupting Akt association with the cell membrane. Role of TRB3 in inhibition of Akt/protein kinase B activation. *J Biol Chem* 2006, 281(16):11126-11134.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des intrazellulären Insulinsignalweges	6
Abbildung 2: Austestung verschiedener Transfektionskomplexe	38
Abbildung 3: Überexpression von TRIB3 auf RNA-Ebene im Zeitverlauf	39
Abbildung 4: Überexpression von TRIB3 auf Proteinebene im Zeitverlauf	40
Abbildung 5: Insulinstimulation nach TRIB3 Überexpression	41
Abbildung 6: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach TRIB3 Überexpression: pAKT	42
Abbildung 7: Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown	44
Abbildung 8: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown: pAKT	44
Abbildung 9: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach TRIB3 Knockdown: TRIB3	45
Abbildung 10: Insulinstimulation nach Palmitinsäureinkubation	47
Abbildung 11: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation nach Palmitinsäureinkubation: pAKT	48
Abbildung 12: TRIB3 Knockdown unter Palmitinsäureinkubation	49
Abbildung 13: Insulinstimulation insulinresistenter HepG2 Zellen nach TRIB3 Knockdown	50
Abbildung 14: Semiquantitative Darstellung: Insulinstimulation insulinresistenter HepG2 Zellen nach TRIB3 Knockdown: pAKT	51
Abbildung 15: Induktion von CHOP durch Palmitinsäure	52

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
Acetyl-CoA	Acetyl-coenzyme A
ATF4	Protein activating transcription factor 4
ATF6	Protein activating transcription factor 6
AKT	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog, Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
Bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNS
CHOP	Transcription factor C/EBP homologous protein
°C	Grad Celcius
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM F-12 Ham	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit F-12 Ham Zusatz
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FCS	Fötales Kälberserum
Foxo3a	Forkhead box O3
FS	Fettsäure
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
h	Stunde(n)
HepG2 Zellen	Humane Leberkarzinomzelllinie
IRE-1	Inositol-requiring enzyme 1
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
LB-Medium	Lysogeny broth Medium
M	Molar, Stoffmengenkonzentration
MAP-Kinase-Kaskade	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
Maxiprep	Plasmidpräparation in großem Maßstab
MEK	Mitogen-activated protein kinase
Miniprep	Plasmidpräparation in kleinem Maßstab
Mio	Millionen

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger RNA
msek	Millisekunden
p	Maß für statistische Signifikanz
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PERK	Protein kinase like endoplasmic reticulum kinase
PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PI-3-K	Phosphoinositol 3 Kinase
PIP 2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
Pten	Phosphatase and tensin homologue
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
rDNAse	Rekombinante DNAse
RISC	RNA induced silencing complex
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
siRNA	Small interfering RNA
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOS	Son of sevenless
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Temed	Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TRIB3	Tribbles pseudokinase 3
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
V	Volt

Danksagung

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit entstehen kann.

Herzlich bedanken möchte ich mich zunächst bei Prof. Allolio, durch dessen Einsatz es erst möglich war in der Endokrinologie zu promovieren und der es geschafft hat, dass man sich auch als Doktorand als Teil der endokrinologischen Gemeinschaft sehen durfte.

Ein großer Dank geht an Dr. Dirk Weismann, der diese Arbeit umfassend betreut hat. Vielen Dank für zahlreiche gemeinsame Gespräche, in denen neue Ideen entwickelt, Manöverkritik geäußert und konstruktive Gedanken erarbeitet wurden. Stets erinnern werde ich mich auch an die grundpositive Einstellung, die es mir manchmal erleichterte, in schwierigen Versuchsphasen durchzuhalten. In gleichem Maß möchte ich mich auch bei N. Pfeifroth für die wunderbare Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank für die vielen gemeinsamen Laborstunden, in denen wir uns gegenseitig motivierten und mit Freude arbeiteten.

Ein großer Dank geht auch an Dr. med. Matthias Kroiß und Dr. rer. nat. Britta Heinze, die mir zu jeder Zeit und unermüdlich mit Rat und Tat bei Versuchsproblemen zur Seite standen. Vielen Dank auch für die konstruktiven Vorschläge, durch die die Arbeit erst so entstehen konnte, wie sie heute ist. Ein herzlicher Dank geht auch an Martina Zink, Heidi Lins, Melanie Beyer und Katharina Henzel für die geduldige Einarbeitung in die experimentellen Methoden und die schönen Stunden, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund, Thomas Huppmann, bedanken. Vielen Dank für das Verständnis, wenn man auch mal wieder am Wochenende arbeiten musste und die stetige Unterstützung und Motivation, die mir zuteil wurde.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Claudia Michaela Münker

Schulische Ausbildung

1993 - 1997 Besuch der Steinbachtalgrundschule , Würzburg
1997 - 2006 Besuch des Mozart-Schönborn-Gymnasiums, Würzburg
(Abschluss Abitur 2006)

Studium

2006 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-
Maximilian Universität Würzburg

2008 Ablage des 1. Staatsexamens

2009 - 2011 Famulaturen

03/2009 Orthopädie und Unfallchirurgie
Juliusspital Würzburg
08/2009 Anästhesie/Intensivmedizin
Universitätsklinikum Würzburg
08/2010 Gastroenterologie und Rheumatologie
Juliusspital Würzburg
09/2010 Dermatologie
Praxis Dr. Schubert/Frank Würzburg
03/2011 Gynäkologie
Praxis Dr. Siegmund Würzburg

2011 - 2012 Praktisches Jahr

08/11 - 12/11 Fachbereich Innere Medizin
Universitätsklinikum Würzburg
12/11 - 03/12 Fachbereich Chirurgie
Universitätsklinikum Würzburg
03/12 - 07/12 Fachbereich Gynäkologie
Universitätsklinikum Würzburg

11/2012

Ablage des 2. Staatsexamens

Promotionsarbeit

2009 - 2011

Laborarbeit in der Medizinischen Klinik I der
Universitätsklinik Würzburg zum Thema „Einfluss der
TRIB3 Expression auf die Insulinsensitivität von HepG2
Zellen“

2012

Teilnahme und Posterpräsentation beim 55. Symposium
für Endokrinologie in Mannheim