

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Untersuchungen zur TRIB3 abhängigen Modulation
des hepatischen HDL-Stoffwechsels**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nora Pfeifroth

aus Würzburg

Würzburg, April 2014

Referent: Prof. Dr. med. B. Allolio

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Muellenbach

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2015

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetische Dyslipidämie	1
1.2	Pseudoproteinkinase TRIB3	2
1.2.1	TRIB3 und Insulinresistenz	3
1.2.2	TRIB3 und Adipozyten.....	5
1.2.3	TRIB3, ER-Stress und Apoptose.....	5
1.3	Reverser Cholesterintransport und SREBPs	6
1.3.1	Reverser Cholesterintransport	6
1.3.2	SREBPs	7
1.3.2.1	Regulierung von SREBPs	8
1.3.2.2	SREBP-1c	9
1.3.2.3	SREBP-2	10
1.4	Fragestellung.....	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	13
2.2	Methoden	16
2.2.1	Zellbiologische Methoden	16
2.2.1.1	Zelllinie HepG2.....	16
2.2.1.2	Kultivierung von HepG2 Zellen.....	16
2.2.1.3	Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.....	16
2.2.1.4	Transfektion der siRNA mittels Elektroporation	17
2.2.1.5	Stimulation der Zellen mit Fettsäuren	18
2.2.1.6	Chemische Transfektion der Plasmide	19
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	19

2.2.2.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	19
2.2.2.2	Messung der RNA-Konzentration.....	20
2.2.2.3	Reverse Transkription von RNA in cDNA	21
2.2.2.4	Realtime-PCR	21
2.2.2.5	Klonierung eines TRIB3-Plasmides.....	24
2.2.2.5.1	Plasmidminipräparation.....	25
2.2.2.5.2	Plasmidmaxipräparation	26
2.2.2.6	Herstellung eines Kontrollplasmides	26
2.2.2.6.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	27
2.2.2.6.2	Agarose Gelelektrophorese.....	27
2.2.2.6.3	DNA-Isolation aus Agarose Gelen	28
2.2.2.6.4	Ligation eines DNA-Stranges	28
2.2.2.6.5	Plasmidamplifikation in Escherichia coli	29
2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	30
2.2.3.1	Proteinisolation	30
2.2.3.2	BCA-Assay	30
2.2.3.3	Western Blot.....	31
2.2.3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
2.2.3.3.2	Semi-Dry Blot	33
2.2.3.3.3	Proteindetektion.....	34
2.2.4	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	TRIB3-Knockdown.....	36
3.1.1	Elektroporationsprotokoll	36
3.1.2	TRIB3-Knockdown im Zeitverlauf	37
3.1.3	Der Einfluss eines TRIB3-Knockdowns auf SREBP-2.....	39
3.2	Fettsäureinkubation.....	42
3.2.1	Etablierung einer Inkubation mit Fettsäuren	42
3.2.2	Der Einfluss einer Induktion von TRIB3 mittels Palmitinsäure auf SREBP-2	45

3.3	Der Einfluss eines TRIB3-Knockdowns auf SREBP-2 in insulinresistenten HepG2 Zellen.....	46
3.4	TRIB3-Überexpression	50
3.4.1	Überexpression von TRIB3 mittels Einbringung eines Plasmids.....	50
3.4.2	Der Einfluss einer Überexpression von TRIB3 auf SREBP-2	51
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang	74
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	74
7.2	Tabellenverzeichnis	75
7.3	Abkürzungsverzeichnis	76
7.4	Plasmid.....	79

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Diabetische Dyslipidämie

Diabetes mellitus ist national und international eine der häufigsten chronischen Erkrankungen. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge werden bis zum Jahr 2030 rund 366 Millionen Menschen an Diabetes mellitus leiden.[1]

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei Menschen mit Diabetes mellitus.[1-5] Atherosklerose entwickelt sich bei Typ 2 Diabetikern 15 Jahre früher als bei nicht-Diabetikern.[6] Ursächlich hierfür ist vor allem die diabetische Dyslipidämie, eine Kombination aus erhöhten Triglyzeriden, verminderten High Density Lipoprotein (HDL)-Partikeln und erhöhten kleinen, dichten Low Density Lipoprotein (LDL)-Partikeln. Die Insulinresistenz spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der diabetischen Dyslipidämie.[5]

Somit stellt die diabetische Dyslipidämie einen wesentlichen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen dar. Bisher hat eine weitere Intensivierung der antiglykämischen Therapie[7-9], eine strengere Blutdruckeinstellung[10] und eine intensivere Behandlung der diabetischen Dyslipidämie mit Fibraten[11] die Mortalität nicht weiter senken können. Folglich sind neue therapeutische Ansätze nötig, um eine Verminderung des kardiovaskulären Risikos bei Typ 2 Diabetikern zu erreichen.

Ausgehend von der Beobachtung, dass hohe HDL-Spiegel kardiovaskulär protektiv sind[12], stellt eine HDL-Erhöhung einen interessanten Therapieansatz dar. Eventuell könnte diese Erhöhung durch Cholesterinester-Transferprotein (CETP)-Inhibitoren und Apolipoprotein A-I (ApoA1) mimetische Peptide erreicht werden. Inwieweit diese Therapieansätze klinisch relevant werden, wird sich noch zeigen.[13, 14] Allerdings scheint eine alleinige Erhöhung des HDL-Spiegels nicht zwangsläufig vor Atherosklerose zu schützen. Wichtiger hingegen ist es, den reversen Cholesterintransport zu steigern. Folglich ist es wünschenswert, die zellulären Mechanismen, die am reversen Cholesterintransport beteiligt sind, näher zu untersuchen und neue therapeutische Ansätze zur Senkung des kardiovaskulären Risikos bei

Patienten mit Diabetes mellitus zu gewinnen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein TRIB3 (tribbles homolog 3)-Knockdown in insulinresistenten Ratten zum einen die Insulinsensitivität verbessert und andererseits den SREBP-2 und HDL-Spiegel im Plasma erhöht.[15]

1.2 Pseudoproteinkinase TRIB3

Es sind drei Isoformen der Familie TRIB (TRIB1, 2 und 3) beschrieben. Pseudoproteinkinasen fehlen ein bis zwei Aminosäuren des konservierten katalytischen Zentrums. Folglich besitzen sie keine Kinaseaktivität.[16] Dennoch spielt TRIB3 eine wichtige Rolle in vielen verschiedenen Signaltransduktionswegen durch direkte Protein-Protein-Interaktion. TRIB3, auch bekannt unter den Namen hNIPK (neuronal cell death-inducible putative kinase) und SKIP3[17] wird in Leber, Fettgewebe und vielen weiteren Geweben exprimiert.[18] TRIB3 ist auf dem Chromosom 20p13-p12.2 lokalisiert.

TRIB3 ist unter anderem an der Entstehung der Insulinresistenz[19], der Adipozytendifferenzierung[20] und der Signalkaskade bei Endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress beteiligt.[21] Des Weiteren wird TRIB3 durch den Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator-1 α (PGC-1 α), Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR α)[22, 23], CCAAT/enhancer-binding-Protein β (C/EBP β)[24] und durch Mangel an Nährstoffen[25, 26] reguliert.

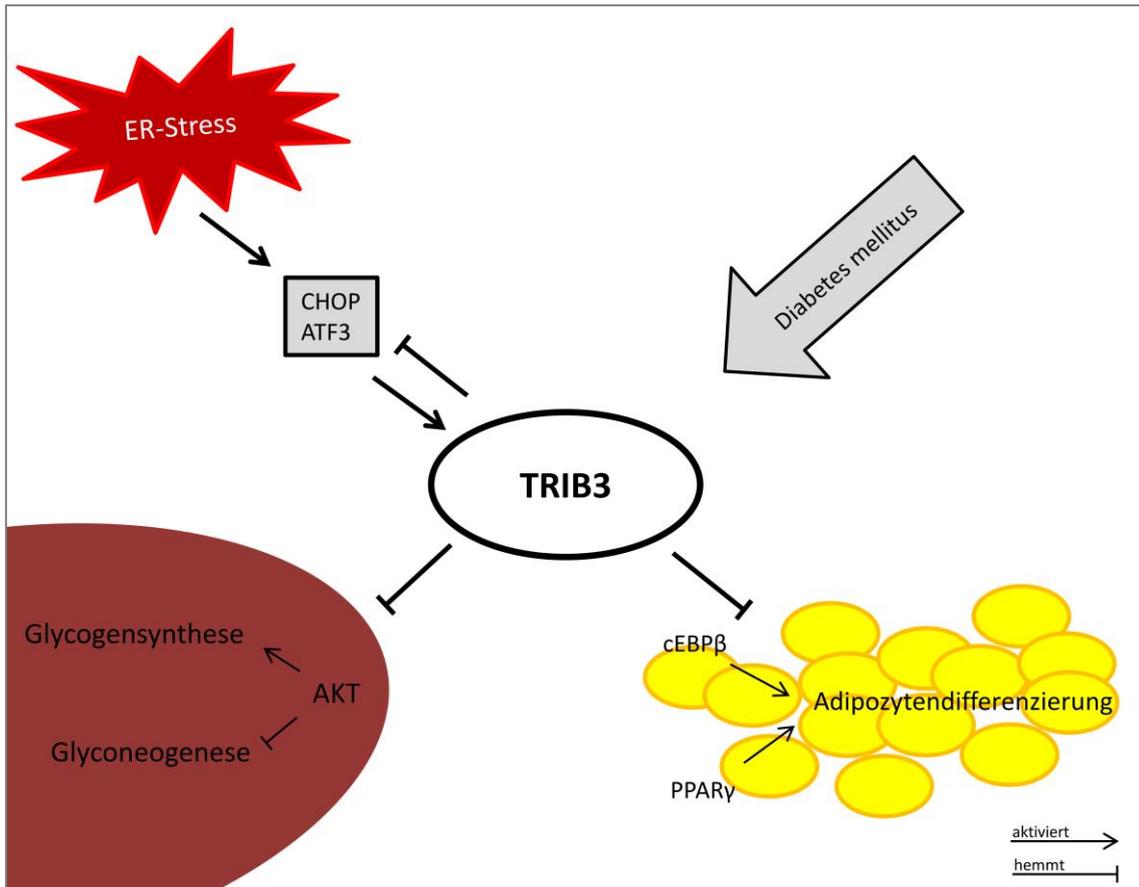


Abb. 1: TRIB3 Signalwege

Vereinfachte Darstellung der wichtigsten TRIB3-Signalwege.

1.2.1 TRIB3 und Insulinresistenz

Einer Insulinresistenz liegt eine beeinträchtigte Insulin-Signaltransduktionskaskade zugrunde, wobei für den Glucosestoffwechsel die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Protein Kinase B (AKT) maßgeblich ist. In der Leber führt eine Aktivierung von AKT zu einer Phosphorylierung der Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) und Forkhead Box O1 (FoxO1). Die Phosphorylierung (Inhibierung) von GSK-3 β führt zu einer Aktivierung der Glycogen-Synthase und somit zu einem erhöhten Glycogen-Gehalt der Zellen. Eine Phosphorylierung von FoxO1 hemmt die Gluconeogenese durch Hemmung der Enzyme Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) und Glucose 6 Phosphatase (G6Pase). Im Skelettmuskel führt die Aktivierung

von AKT zu einer Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in die Zellmembran und somit zu einer vermehrten Glucoseaufnahme in die Zelle.[27-29]

TRIB3 wurde als negativer Regulator von AKT entdeckt. TRIB3 wird beim Fasten in der Leber vermehrt exprimiert und bindet direkt an AKT. Hierdurch wird die Phosphorylierung von AKT an den Positionen Threonin-308 und Serin-473 und somit die Insulinsignaltransduktion gehemmt.[19, 28, 30] Der Gehalt an TRIB3 mRNA und TRIB3 Protein ist in der Leber diabetischer Mäuse höher als in Wildtypmäusen. Eine Überexpression von TRIB3 führt zu Hyperglycämie und Glucoseintoleranz. Es wird somit vermutet, dass TRIB3 zu einer Insulinresistenz und dem Metabolischen Syndrom beitragen kann.[19, 31] Auch humane Studien über den Q84R Polymorphismus des TRIB3 Gens zeigen, dass TRIB3 eine Rolle in der Entwicklung der Insulinresistenz spielt. Die R84 Variante kommt gehäuft bei Typ 2 Diabetikern mit einem frühen Erkrankungsalter vor. Auch kardiovaskuläre Risikofaktoren finden sich gehäuft bei diesen Patienten. Untersuchungen in kultivierten Zellen zeigten, dass die R84 Variante eine stärkere Hemmung des Insulinsignalweges aufweist[32, 33] und die Insulinexozytose aus den Pankreas- β -Zellen vermindert ist.[34] Ein Knockdown von TRIB3 in diabetischen Mäusen konnte die Insulinsensitivität verbessern, sowie die Lipidakkumulation und die diabetische Kardiomyopathie reduzieren.[35] Zudem verringert ein TRIB3-Knockdown in diabetischen Mäusen Atherosklerose und bewirkt eine Stabilisierung atherosklerotischer Plaques.[36] Auch körperliche Bewegung reduziert in Mäusen mit diätetisch induziertem Übergewicht die TRIB3-Expression und führt zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität.[37]

Allerdings muss der Einfluss von TRIB3 auf die Insulinresistenz kritisch beurteilt werden, da in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass ein Knockdown sowie eine Überexpression von TRIB3 in Mäusen und in Rattenleberzellen keinen Einfluss auf die Glucose- und Energiehomöostase haben.[18, 38]

Man kann schlussfolgern, dass TRIB3 in verschiedenen Geweben unterschiedliche Funktionen im Rahmen des Glucose- und Fettstoffwechsels übernimmt.[39, 40]

1.2.2 TRIB3 und Adipozyten

Mehrere Arbeiten belegen, dass TRIB3 Einfluss auf die Adipozytendifferenzierung aufweist. Ein wichtiger früher Differenzierungsschritt ist die Aktivierung von C/EBP β und C/EBP δ , die wiederum PPAR γ und in der Folge C/EBP α aktivieren. Diese beiden Proteine lösen das weitere Differenzierungsprogramm aus. Bei der Adipozytendifferenzierung wird TRIB3 an den ersten zwei Tagen der Differenzierung vermindert exprimiert.[20, 41] Eine Überexpression von TRIB3 in Präadipozyten hemmt die Differenzierung zu Adipozyten indem es C/EBP β [20] und PPAR γ [41] hemmt.

Aber auch im Lipidmetabolismus spielt TRIB3 eine Rolle. TRIB3 wird durch Nährstoffmangel in Fettzellen verstärkt exprimiert und bewirkt in diesen Zellen die Lipolyse, indem es den Abbau von Acetyl-Coenzyme A Carboxylase (ACC) stimuliert. ACC ist ein Schlüsselenzym bei der Fettsäuresynthese. Untersuchungen in Mäusen, die TRIB3 transgen im Fettgewebe exprimieren, waren vor ernährungsbedingter Adipositas geschützt, indem sie eine erhöhte Lipolyserate im Fettgewebe aufwiesen.[40]

1.2.3 TRIB3, ER-Stress und Apoptose

Zellen haben verschiedene Signalwege entwickelt, um auf Stress zu reagieren. Ein Beispiel hierfür ist der „integrated stress response“-Weg. Je nachdem welche Art von Zellstress vorliegt, wird eine andere Kinase aktiviert, die unter anderem zu einer Phosphorylierung von eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) führt.[42]

Endoplasmatischer Retikulum (ER) Stress wird beispielsweise ausgelöst durch Glucosemangel[43], Hypoxie, oxidativen Stress, Veränderungen des ER-Calciumhaushalts oder Pharmaka, wie Tunicamycin und Thapsigargin. Infolge eines funktionell beeinträchtigten ERs kommt es zu einer Fehlfaltung von Proteinen. Diese funktionslosen Proteine akkumulieren im ER. In der Folge und zum Schutz vor weiterem Schaden wird ein Signalweg zwischen ER und dem Zellkern ausgelöst, der als „Unfolded Protein Response“ bekannt ist. Es werden drei Signalkaskaden aktiviert, die über Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK), Inositol-

Requiring Protein-1 (IRE1 α) und Activating Transcription Factor-6 (ATF6) ablaufen. Der IRE1 α und ATF6 Signalweg führen zu einer vermehrten Bildung von Chaperonen, welche fehlgefaltete Proteine erneut in die korrekte Konfiguration bringen. PERK hingegen phosphoryliert eIF2 α , in dessen Folge die Proteinsynthese gehemmt wird. Nur einzelne mRNAs, wie ATF4, werden vermehrt gebildet. ATF4 wiederum führt zu einer Aktivierung von cEBP homologous protein (CHOP) und Asparagin Synthetase (ASNS). CHOP ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation von Transkription, Zellzyklus und Apoptose beteiligt ist. Er bildet Heterodimere mit C/EBPs. Bei starkem oder länger bestehendem ER-Stress löst CHOP Apoptose aus.[21, 42, 44-46]

TRIB3 wird durch ER-Stress über ATF4 und CHOP vermehrt induziert.[21] TRIB3 verursacht daraufhin Apoptose. Ein Knockdown von TRIB3 hemmt die ER-Stress induzierte Apoptose. Zugleich hemmt TRIB3 die Transkriptionsaktivität von CHOP und ATF4 als negativer Feedbackregulator, um eine überschießende Stressantwort zu vermeiden.[17, 21] Eine Überexpression von TRIB3 führt zu einer vermehrten Hemmung von CHOP und ASNS.[42]

1.3 Reverser Cholesterintransport und SREBPs

1.3.1 Reverser Cholesterintransport

Ein wichtiger Baustein der Cholesterinhomöostase ist der reverse Cholesterintransport. Hierbei erfolgt der Transport von Cholesterin in Form von HDL-Partikeln zur Leber, die Umwandlung in Gallensäuren und letztendlich die Ausscheidung aus dem Körper. Periphere Zellen verfügen über verschiedene Mechanismen des Cholesterineffluxes. So kann der Efflux über Scavenger Receptor Class-B type I (SR-BI)-Rezeptoren erfolgen.[47, 48] HDL-Partikel können am SR-BI-Rezeptor sowohl Cholesterin aufnehmen, als auch abgeben. Die Richtung des Transports wird durch den Cholesterin-Konzentrationsgradienten an der Membran bestimmt.[48] Im Gegensatz zum SR-BI-Rezeptor, der einen bidirektionalen Cholesterinaustausch zwischen Zelle und extrazellulären Akzeptoren vermittelt, fördert der Cholesterinexporter ATP-Binding

Cassette Transporter A1 (ABCA1) einen unidirektionalen Efflux des Cholesterins aus der Zelle. ABCA1 gehört zur ABC-Superfamilie, wobei ABCA1 innerhalb dieser Familie die wichtigste Rolle im Lipidmetabolismus spielt. In peripheren Zellen wird die Expression von ABCA1 hauptsächlich durch Liver X Receptor (LXR) reguliert, welcher als Cholesterinsensor in der Zelle fungiert.[49] Im Gegensatz zu peripheren Zellen wird ABCA1 in der Leber kaum durch LXR reguliert.[50] ABCA1 ist ein integrales Membranprotein und transportiert intrazelluläres freies Cholesterin an extrazelluläres Apo-A1. Apo-A1 ist der Haupttransporter in HDL-Partikeln. Es bindet an SR-BI oder ABCA1, bildet einen hydrophoben Tunnel und vervollständigt so den Transmembrantransport von Cholesterin. Nach Veresterung des freien Cholesterins durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), sammeln sich Cholesterinester im hydrophoben Kern der HDL-Partikel an. Der weitere Transfer der Cholesterinester folgt nun über den SR-BI-Rezeptor in die Leber.[48, 51]

1.3.2 SREBPs

Sterol regulatory element-binding Proteine (SREBPs) sind wichtige Transkriptionsfaktoren für den Fettstoffwechsel. Sie gehören zu einer großen Klasse von Transkriptionsfaktoren, die ein basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-Motiv beinhalten.[52, 53] Es gibt drei Isoformen: SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2, die durch zwei Gene codiert werden. SREBPs werden im Endoplasmatischen Retikulum als Vorläuferproteine synthetisiert. Das C- und N-terminale Ende zeigen ins Zytoplasma. SREBP-1a und SREBP-1c stammen vom gleichen Gen ab und entstehen durch alternatives Splicen. SREBP-1c reguliert Gene der Fettsäure- und Triglycerid-Synthese, während SREBP-1a zusätzlich Gene des Cholesterinhaushaltes reguliert. SREBP-1c, das vor allem in Leberzellen und Fettgewebe zu finden ist, weist eine schwächere Transkriptionsaktivität als SREBP-1a auf.[54, 55] SREBP-2 wird ubiquitär exprimiert und reguliert vorwiegend den Cholesterinmetabolismus.[56]

1.3.2.1 Regulierung von SREBPs

Wenn der Cholesterinspiegel in der Zelle sinkt, bindet SREBP an SREBP-cleavage activating protein (SCAP), einem weiteren ER-Protein.[57, 58] SCAP hat eine Domäne, die den Cholesteringehalt der Zelle wahrnimmt. Daraufhin wird der SREBP/SCAP-Komplex in Coat protein complex II (COP II)-Vesikeln verpackt zum Golgi Apparat transportiert. Dort wird SREBP durch zwei Proteasen prozessiert. S1P (Site-1 Protease), eine membrangebundene Serinprotease, schneidet SREBP zwischen zwei membrandurchspannenden Segmenten und S2P (Site-2 Protease), eine membrangebundene Zinkmetalloproteinase, entfernt das N-terminale Ende und hinterlässt so einen aktiven Transkriptionsfaktor, der in den Zellkern wandert.[59, 60] Dort bindet er an Sterol Regulatory Element 1 (SRE-1) und reguliert so Gene, welche Synthese und Aufnahme von Cholesterin, Fettsäuren, Triglyceriden und Phospholipiden steuern.[52, 53]

Wenn viel Cholesterin in der Zelle ist, bildet SCAP einen Komplex mit Insulin induced Gene (Insig), einem weiteren ER-Protein, was eine Konformationsänderung des SCAP-Proteins bewirkt. SCAP kann keine Bindung mehr mit SREBP eingehen und der Transport von SREBP zum Golgi Apparat und letzten Endes in den Zellkern wird verhindert.[61, 62]

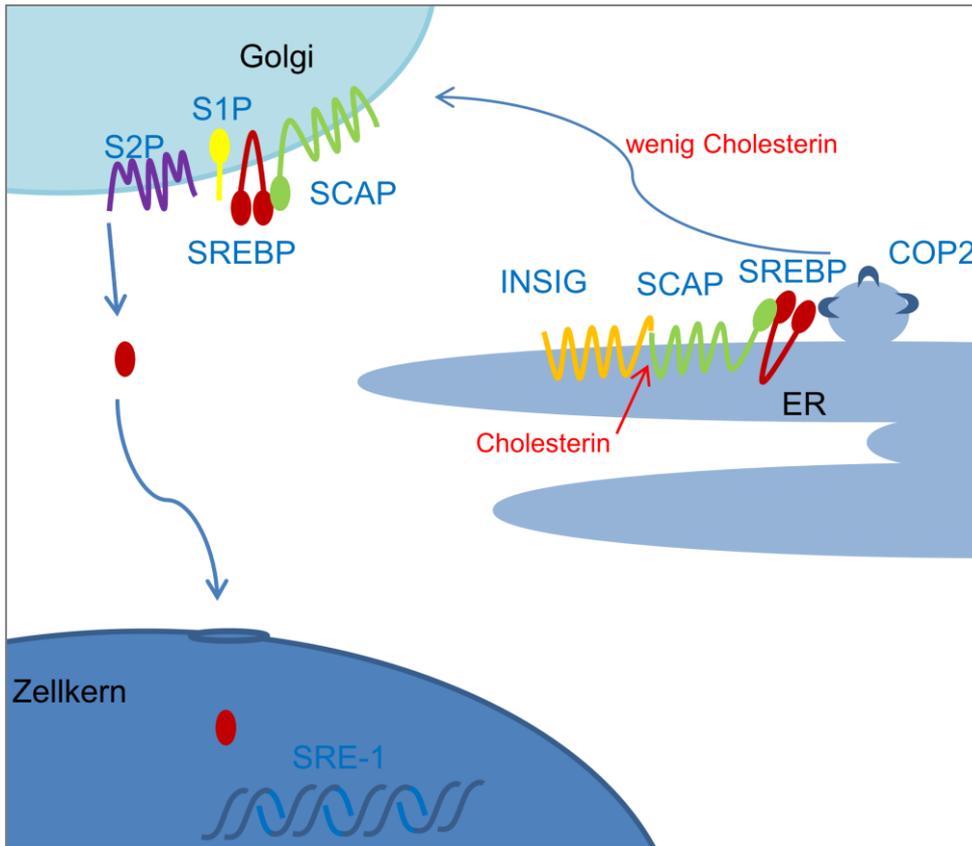


Abb. 2: SREBP Signalweg

Vereinfachte Darstellung der SREBP-Regulation.

1.3.2.2 SREBP-1c

Wie genau die SREBP-Isoformen ihre unterschiedlichen Funktionen wahrnehmen ist nur in Ansätzen geklärt. Sie scheinen über verschiedene Mechanismen aktiviert zu werden und mit unterschiedlichen Koaktivatoren zusammen zu arbeiten.

Es konnte gezeigt werden, dass SREBP-1c nicht über den Cholesteringehalt der Zelle, sondern durch Insulin und LXR α aktiviert wird.[49, 63, 64] Insulin führt über Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und AKT zu einer vermehrten Transkription von SREBP-1c und zu einem Anstieg des aktiven SREBP-1c Transkriptionsfaktors.[54, 65]

Diese Erkenntnis unterstützt die Beobachtung, dass SREBP-1c, im Gegensatz zu SREBP-2, in der Leber bei einer Kohlenhydrat-reichen und Fett-armen Diät stark ansteigt.[63] Zu den SREBP-1c Zielgenen zählen Fettsäuresynthase (FAS), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und Stearyl-CoA Desaturase (SCD1). Dies weist auf einen

Zusammenhang zwischen Diabetes und Triglyceridakkumulation in Leberzellen hin.[65]

1.3.2.3 SREBP-2

Eine neuere Studie konnte zeigen, dass auch SREBP-2 durch AKT aktiviert wird.[66] Die Hauptaufgabe von SREBP-2 ist den Cholesteringehalt der Zelle durch vermehrte Transkription des LDL-Rezeptors und der HMG CoA Reduktase zu erhöhen. Ein häufig eingesetztes Medikament, um den Plasma Cholesterinspiegel zu senken, sind Statine. Diese hemmen die HMG-CoA Reduktase. Hierdurch wird der Leber-Cholesterin-Gehalt gesenkt und SREBP-2 aktiviert.[67]

Interessanterweise hat man auf zellulärer Ebene zeigen können, dass erhöhte SREBP-2 Spiegel theoretisch zu einem Absinken des Plasma HDL-Spiegels führen müssten.[68, 69] Man hat eine microRNA, miR33, entdeckt, die auf einem Intron des SREBP-2 Gens codiert ist.[68, 69] MicroRNAs sind kurze, hoch konservierte, nicht kodierende RNAs, die eine wichtige Rolle beim Ausschalten von Genen auf posttranskriptioneller Ebene spielen. Sie sind 21-23 Nukleotide lang. MiR33 hemmt ABCA-1 und führt somit zu einer verminderten Abgabe von Cholesterin aus der Zelle und somit zu einem erniedrigten HDL-Plasmaspiegel.[67-69] Im Gegensatz dazu haben Vorarbeiten gezeigt, dass in insulinresistenten Ratten ein TRIB3 Knockdown den SREBP-2 und den HDL-Spiegel im Plasma erhöht.[15]

Insgesamt deuten auch diese Ergebnisse darauf hin, dass Glucose- und Fettstoffwechselwege in der Leber stärker miteinander verwoben sind, als bisher experimentell belegbar war. SREBPs könnte hier eine wichtige Rolle zukommen.

1.4 Fragestellung

Dyslipidämie ist die Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei Menschen mit Diabetes mellitus. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein TRIB3-Knockdown in insulinresistenten Ratten zum einen die Insulinsensitivität verbessert und andererseits den SREBP-2 und HDL-Spiegel im Plasma erhöht.[15]

In dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss die Pseudoproteinkinase TRIB3 in der humanen Leberzelllinie HepG2 auf SREBP-2 und somit auf den reversen Cholesterintransport hat.

Es soll ein TRIB3 Knockdown, ein Anstieg von TRIB3 durch Schaffung einer Insulinresistenz und eine Überexpression von TRIB3 durchgeführt und der Einfluss der verschiedenen TRIB3-Expressionsniveaus auf SREBP-2 und weitere entscheidende Faktoren des reversen Cholesterintransportes untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Firma
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank: Forma Series 3111	Thermo Scientific (Langensfeld, Deutschland)
Blot- Apperatur: Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Ecomax X-Ray Film Processor	Protec (Oberstfeld, 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: MSC Advantage 1.2 MSC Advantage 1.8	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland) Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Mikroskop: Leica DM IL	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikrowelle: Quick 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 2000	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Taumelschüttler: Polymax 1040	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Ultraschall Sono Plus GM70	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
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)

Tabelle 1: Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	Firma
Tween 20 Biochemika	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Taq Man Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
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, BCA Solution, 4% Kupfersulfat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Foetal Bovine Serum, DPBS	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
X-Treme Gene HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
APS, Bromphenolblau, Ethanol , EDTA, Standardmedium: 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)
QIAshredder, QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
Enzyme und Puffer	Firma

Xho I, Sal I-HF, T4 Ligase, NE Buffer 4, 10x Buffer for T4 Ligase	New England BioLabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Oligonukleotide	Firma
β -Aktin-, CHOP-TaqMan Sonde	Applied Biosystems (Foster City, USA)
ABCA 1, APO-A1, C/EBP- β , HMGR, LXR α , SR-B1, SREBP-1c, SREBP-2	Biomers (Ulm, Deutschland)
TRIB3	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
β -Aktin	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Plasmid	Firma
TRIB3 in pCMV-SPORT6 Vektor	imaGenes (Berlin, Deutschland)
Antikörper	Firma
anti-rabbit IgG HRP linked	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
Anti mouse IgG HRP linked	GE Healthcare (München, Deutschland)
SREBP-2, clone 2545	Millipore (Billerica, USA)
SREBP-2 (N-19), SREBP-2 (C-6)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Kalifornien, USA)
Monoclonal β -aktin Clone AC-15, TRIB3 (N-terminal)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Zellline	Firma
HepG2	Cell line service (Eppelheim, Deutschland)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

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

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zelllinie HepG2

Die HepG2 Zellen wurden von der Firma Cell Lines Service erworben. Es handelt sich um humane Leberzellen, die 1975 aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15 Jahre alten kaukasischen Jungen isoliert wurden. Sie sind sehr gut differenziert und besitzen das biosynthetische Potenzial normalen Leberparenchyms.[70]

2.2.1.2 Kultivierung von HepG2 Zellen

Die Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen in DMEM F-12 Ham Medium mit 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Es wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen bei 80% Konfluenz geteilt. Hierfür wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, mittels 2ml 0,25% Trypsin-EDTA gelöst, in 22ml Standardmedium resuspendiert und auf 2 Zellkulturflaschen verteilt.

Die Zellen wurden bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5 Vol% CO₂ und 95 Vol% Luft kultiviert.

Je nach Versuchsaufbau wurden 2 Millionen Zellen in 2ml Medium in ein 6-Well beziehungsweise 1 Million Zellen in 1ml Medium in ein 12-Well eingebracht.

2.2.1.3 Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Die Methode beruht auf dem Auszählen vitaler Zellen in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop. Im mittleren Drittel der Kammer befinden sich vier Längsrinnen. In den Mittelsteg am Kammerboden sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus vier Großquadraten mit einer Kantenlänge von 1mm, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Der Kammerboden ist in Bezug zu den Außenstegen um 0,1mm tiefer,

so dass beim Auflegen eines plan geschliffenen Deckglases auf die Außenstege ein Spalt von 0,1mm Schichtdicke entsteht. Somit beträgt das Volumen eines Großquadrates 0,1µl. Die Auszählung von je vier Großquadraten erfolgt unter dem Mikroskop nach Färbung mittels Trypanblau. Vitale Zellen können Trypanblau ausschließen und sind somit von den blau gefärbten toten Zellen zu unterscheiden. Es wird der Mittelwert der ausgezählten Zellen gebildet und dieser mit 10^4 multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden mit 0,25% Trypsin-EDTA gelöst, bei 800 rpm 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und 4ml Medium zugefügt. 10µl dieser Zellsuspension wurden mit 90µl Trypanblau gemischt und 10µl hiervon in der Neubauerzählkammer ausgezählt.

2.2.1.4 Transfektion der siRNA mittels Elektroporation

Um einen TRIB3-Knockdown in HepG2 Zellen zu erreichen wurde siRNA mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht.

Small interfering RNAs 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.[71]

Mittels Elektroporation werden in der Zellmembran kurzzeitig Poren gebildet, durch welche die siRNAs in die Zelle diffundieren können.

Für die Elektroporation wurden jeweils 1 Million Zellen in 100µl DMEM Medium gelöst und in eine Transformationsküvette überführt. Dieser Suspension wurden pro 1 Million Zellen 0,665µl 20µM TRIB3-siRNA beziehungsweise Kontroll-siRNA zugefügt, gemischt und im Gene Pulser Xcell Electroporation System elektroporiert. Die Zellen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit

Standard-Medium auf 1 Million Zellen pro ml verdünnt und in 6- beziehungsweise 12-Well Platten bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

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

Tabelle 3: TRIB3-siRNA Sequenz

2.2.1.5 Stimulation der Zellen mit Fettsäuren

Um eine Insulinresistenz in HepG2 Zellen zu erzielen wurden die Zellen mit Fettsäuren inkubiert. Die Fettsäuren wurden hierfür nach einer modifizierten Methode von Cousin et al gelöst.[72]

Zunächst erfolgte die Herstellung einer Stocklösung mit 8mmol/l Fettsäure und 10% BSA. Hierfür wurde eine 160mM Fettsäure-Lösung in Natronlauge (500µl, 0,25M) erstellt. Die Fettsäuren wurden bei 70°C und 350 rpm bis zur kompletten Lösung in Natronlauge geschüttelt. Fettsäurefreies BSA wurde in destilliertem Wasser mit einer Konzentration von 10% bei 55°C gelöst. Anschließend wurde 50µl der Fettsäure-Lösung tropfenweise zu 950µl BSA-Lösung pipettiert, bis zu einer Konzentration der Stocklösung von 160mM. 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 0,45µm Filter steril filtriert.

Zur Herstellung der Kontrolle wurde das gleiche Verfahren ohne Zugabe von Fettsäure angewendet.

Die HepG2 Zellen wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben in Wells kultiviert. Nachdem die Zellen über Nacht festgewachsen waren, wurden sie mit DPBS gewaschen und in FCS freiem Zellmedium kultiviert. 24 Stunden später wurde das Medium abgenommen, die Zellen wiederum mit DPBS gespült und die Fettsäurelösung mit der Konzentration

von 0,8mmol/l dazu gegeben. Nach einer 6-stündigen Inkubation, wurden die Zellen geerntet.

2.2.1.6 Chemische Transfektion der Plasmide

Für eine TRIB3-Überexpression in HepG2 Zellen wurde ein Plasmid mit einem TRIB3 Gen hergestellt. 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 gewünschte Genprodukt produzieren. Um dieses in die Zellen einzubringen wurde das X-treme Gene HP DNA Transfektions Reagenz gewählt. Es formt einen Komplex mit der Plasmid-DNA, der die Zellmembran überwinden und in die Zelle eindringen kann.

Die Zellen wurden bei 70-90% Konfluenz transfiziert. Hierfür wurden die Zellen in Medium ohne Antibiotikum kultiviert. Pro 6-Well wurden 2µg Plasmid und 4µl Transfektions Reagenz zu 200µl DMEM Medium gegeben, gemischt und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200µl des Transfektionskomplexes zu 2ml Medium in ein 6-Well getropft und die Platte vorsichtig geschwenkt. Die Inkubation erfolgte für 24, 48 oder 72 Stunden bei 37°C. Analog hierzu wurde bei 12-Wells mit der Hälfte der Ansatzmenge gearbeitet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Extraktion der RNA aus den Zellen wurde ein kommerzielles Kit (Qiagen RNeasy Mini Kit) gewählt. Diese Standardmethode eignet sich um RNA Mengen bis zu 100µg zu isolieren. 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 Lyse-RLT-Buffer resuspendiert. So erfolgte die unverzügliche Inaktivierung der RNAsen. Anschließend wurde das Lysat durch

Zentrifugation in QiaShreddern homogenisiert. In den folgenden Schritten wurde die RNA an eine Silika-Gel-Membran gebunden, andere Bestandteile wurden mittels zahlreicher Waschschriffe und anschließender Zentrifugation entfernt. Im letzten Schritt wurde die RNA durch 35µl RNase freies Wasser aus der Membran gelöst.

Die RNA wurde zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren.

2.2.2.2 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe eines Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometers (Nanodrop 2000) gemessen. Die Methode beruht auf der Absorption von Licht bei Durchgang durch die Probe, wobei nach dem Lambert Beer'schen Gesetz die Extinktion zur Konzentration der absorbierenden Verbindung direkt proportional ist.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad E=\text{Extinktion}$$

$$\varepsilon=\text{wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in } \frac{\text{ng} \cdot \text{cm}}{\mu\text{l}}$$

(für RNA 40 $\frac{\text{ng} \cdot \text{cm}}{\mu\text{l}}$)

$$c=\text{Nukleinsäurekonzentration in ng}/\mu\text{l}$$

$$d=\text{Schichtdicke in cm}$$

Für die Messung werden 2µl Probe benötigt.[73]

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten RNA wurde der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis der Extinktionswerte bei einer Wellenlänge des Lichts von 260 und 280nm wurde errechnet und nur Proben mit einem Zahlenwert größer 1,6 verwendet. Ein kleinerer Quotient weist auf Verunreinigung mit Proteinen oder Salzurückständen hin, die beim Umschreiben der RNA in DNA zu Ungenauigkeiten führen können.

2.2.2.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Zur Bestimmung der RNA-Menge mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion muss die RNA zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Zuerst wird ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert, der mit dem RNA-Strang hybridisiert. Anschließend wird der RNA-Strang abgebaut und die DNA zum doppelsträngigen DNA-Molekül ergänzt. Die cDNA dient anschließend als Ausgangsmaterial für eine realtime Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). Reverse Transkriptasen stammen meist aus RNA-Retroviren, wie dem aviären Myeloblastosevirus, dem Moloney-Mausleukämievirus oder dem humanen Immundefizienzvirus (HIV). Für die Reverse Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet. Die Transkriptase besitzt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, die einen einsträngigen cDNA Strang bildet, und eine RNase H-Aktivität, welche die RNA in RNA-DNA-Hybriden abbaut. Für die Reaktion werden Oligonukleotide und Primer benötigt. Primer lagern sich an die RNA an und dienen als Startregion für die DNA-Polymerase.

Pro Probe wurden 2µl gDNA Wipeout Buffer mit 500ng RNA gemischt und mit RNase freiem Wasser auf 14µl aufgefüllt. gDNA Wipeout Buffer diente zum Abbau noch vorhandener DNA. Diese Mischung wurde für 5 Minuten bei 42°C im Mastercycler inkubiert um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Die Tubes wurden auf 4°C herabgekühlt und ein Mix aus 1µl RT Primer Mix, 4µl Quantiscript RT-Buffer und 1µl Quantiscript Reverse Transkriptase hinzugefügt. Schließlich erfolgte im Mastercycler eine Inkubation für 15 Minuten bei 42°C, in der die cDNA-Synthese stattfand. Durch Inkubation bei 95°C für 3 Minuten wurde die Quantiscript Reverse Transkriptase inaktiviert.

2.2.2.4 Realtime-PCR

Die realtime Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nucleinsäuren *in vitro*, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase

Kettenreaktion beruht, und gleichzeitig die Menge an ursprünglicher DNA in der Probe bestimmen kann.

Es müssen circa 20 Basenpaare aus den Endbereichen der zu amplifizierenden DNA bekannt sein. An diese bekannten DNA Abschnitte können synthetisch hergestellte Oligonukleotid-Primer binden. Der dazwischen liegende Abschnitt kann mittels DNA Polymerasen synthetisiert werden. Auf diese Weise können durch exponentielle Anreicherung auch geringe DNA Mengen in 20 bis 40 Zyklen nachweisbar gemacht werden.

Die einzelnen Zyklen der PCR bestehen aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Denaturierung wird doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C in einzelsträngige DNA überführt. Beim Annealing hybridisieren zwei für die Zielsequenz spezifische Oligonukleotid-Primer an komplementäre Sequenzen. Bei der Elongation füllt die Polymerase bei 72°C die fehlenden Nukleotide auf, so dass ein langer DNA-Molekülstrang entsteht.

Die thermostabile Polymerase des Mikroorganismus *Thermus aquaticus* ist heute die Standardpolymerase (Taq-Polymerase) für die PCR, da sie optimal an hohe Temperaturen angepasst ist, die für die Denaturierung benötigt werden.

Zur Quantifizierung des PCR-Produkts wurde bei einem Teil der Proben eine Fluoreszenzmessung mit dem DNA-Farbstoff Sybr Green durchgeführt. Farbstoffe (wie Ethidiumbromid und SYBR Green) fluoreszieren, wenn sie in doppelsträngige DNA interkalieren und anschließend mit Licht angeregt werden. Die Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus ist also direkt proportional zur Zunahme der zu amplifizierenden DNA. Am Ende eines jeden Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen.

Bei einem anderen Teil der Proben wurde die Messung mit TaqMan-Sonden durchgeführt. Es handelt sich um Sequenz-spezifische Oligonukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Sie sind mit zwei Farbstoffen markiert, einem fluoreszierenden Reporterfarbstoffe und einem "Quencher". Sobald die Sonde an die Zielsequenz bindet, wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde hydrolysiert und somit eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen.

Zur Auswertung wurde der Ct-Wert verwendet. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus Ct, bei dem die hervorgerufene Fluoreszenz und somit die Targetmenge einen festen

Schwellenwert erreicht. Die Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt wurde, um diese Menge zu erreichen, gibt Aufschluss über die relative Menge der Ziel-DNA.

Als Kontrolle diente das Referenzgen β -Aktin. Von Referenz-Genen wird angenommen, dass sie in allen Zellen kontinuierlich transkribiert werden und somit in allen Zellen in etwa die gleiche Konzentration an mRNA vorhanden ist.

Für die realtime-PCR wurden die folgenden Oligonukleotide eingesetzt:

ABCA1 for	5'-tgt cca gtc cag taa tgg ttc tgt-3'
ABCA1 rev	5'-aag cga gat atg gtc cgg att-3'
ApoA1 for	5'-atg aaa gct gcg gtg ctg acc-3'
ApoA1 rev	5'-cac ctt ctg gcg gta gag ctc-3'
CEBP β for	5'-gcg cga gcg caa caa cat c-3'
CEBP β rev	5'-tgc ttg aac aag ttc cgc ag-3'
HMGR for	5'-gtc att cca gcc aag gtt gt-3'
HMGR rev	5'-ggg acc act tgc ttc cat ta-3'
LXR α for	5'-aga gga gga aca ggc tca tgc -3'
LXR α rev	5'-aaa gga gcgt ccg gtt aca ct-3'
SR-B1 for	5'-atg atc gtg atg gtg ccg tc-3'
SR-B1 rev	5'-act gaa cct gca ggt gct ga-3'
SREBP-1c for	5'-ggt agg gcc aac ggc ct-3'
SREBP-1c rev	5'-ctg tct tgg ttg ttg ata agc tga a-3'
SREBP-2 for	5'-tgg ctt ctc tcc cta ctc ca-3'
SREBP-2 rev	5'-gag agg cac agg aag gtg ag-3'
β -Aktin for	5'-cca gat cat gtt tga gac ctt c-3'
β -Aktin rev	5'-cat gag gta gtc tgt cag gtc c-3'
TRIB3 for	5'-agt atg gac ctg gga ttg tgg a-3'
TRIB3 rev	5'-att agg cag ggt ctg tcc tgt g-3'

Tabelle 4: Oligonukleotidsequenzen der realtime-PCR

Bei der SYBR Green Methode wurden je 12,5 μ l iQ SYBR Green Supermix, 8,5 μ l destilliertes Wasser, 1 μ l Primer forward (10 pmol/ μ l), 1 μ l Primer reverse (10 pmol/ μ l) und 2 μ l der jeweiligen cDNA Probe in die Vertiefung einer 96-Well Platte pipettiert, kurz zentrifugiert und in den Light-Cycler gegeben. Hier lief folgendes Programm zur Vervielfältigung der DNA ab.

1. 95°C für 3 Minuten (Denaturierung)
2. 95°C für 15 Sekunden (Schmelzen)
3. 65°C für 15 Sekunden (Annealing)
4. 72°C für 15 Sekunden (Elongation)
5. Wiederholung ab 2. für weitere 39 mal
6. 95°C für 10 Sekunden

Für die Taq-Man Sonden wurden 12,5µl Taq Man Master Mix, 1,25µl Sonden Primer Mix, 9,25µl destilliertes Wasser und 2µl einer 1:16 verdünnten cDNA-Lösung in die Vertiefung einer 96-Well Platte pipettiert, kurz zentrifugiert und in den Light-Cycler gegeben. Zur Vervielfältigung der DNA lief folgendes Programm ab:

1. 50°C für 2 Minuten
2. 95°C für 10 Minuten (Initiale Denaturierung)
3. 95°C für 15 Sekunden (Schmelzen)
4. 55°C für 1 Minute (Annealing und Elongation)
5. Wiederholung ab 3. für weitere 44 mal

Jede Probe wurde doppelt gemessen und auf die Expression des Referenz-Gens β -Aktin bezogen.

2.2.2.5 Klonierung eines TRIB3-Plasmides

Die Klonierung ist eine molekularbiologische Technik, bei der ein DNA-Fragment in ein Transportvehikel (Vektor) integriert und mit dessen Hilfe in einen Wirtsorganismus (z.B. Bakterien oder Hefezellen) eingeschleust wird. Ziel einer Klonierung ist dabei die Vermehrung, also die Herstellung identischer Kopien des Vektors.

Die Methode der Klonierung wurde verwendet um eine TRIB3-Überexpression herbeizuführen. Als Vektor-Wirtsorganismus-Kombination dienten Plasmide und Escherichia coli Bakterien. Plasmide sind doppelsträngige DNA-Moleküle, die eine ringförmige Struktur besitzen und sich in Bakterienzellen unabhängig vom Kerngenom vervielfältigen können. Plasmide werden in Bakterien vermehrt, aus diesen extrahiert, gereinigt und in die gewünschten Zellen transfiziert.

Für die Kultivierung der Bakterien benötigte Materialien:

LB-Medium: 10g (Bacto-) Tryptone
5g Hefeextrakt
10g NaCl
ad 1000ml destilliertes Wasser
→ Autoklavieren

LB-Agar für Platten: 3,75g Agar auf 250ml LB-Medium
→ Autoklavieren und mit gewünschtem
Antibiotikum versetzen

Das TRIB3-Gen-Plasmid wurde bei der Firma imaGenes als cDNA Klon im Vektor pCMV-SPORT6 bestellt (siehe Anhang Plasmid). Für die Präparation des Plasmids wurde 5ml LB-Medium und 5µl Ampicillinlösung (50mg/ml) gemischt und eine Pipettenspitze der E.coli Bakterien mit TRIB3-Plasmid hinzugegeben. Anschließend wurde das Falcon bei 37°C und 175 rpm über Nacht inkubiert. Durch Antibiotikazugabe konnten sich nur die Bakterien vermehren, die das Plasmid aufgenommen hatten und somit Ampicillin-resistent waren. Am nächsten Tag war das LB Medium durch das Bakterienwachstum getrübt. Zur Isolierung des Plasmids aus den Bakterien wurde eine Minipräparation durchgeführt. Das Plasmid wurde zum Sequenzieren geschickt um zu überprüfen, ob es das TRIB3-Gen enthält. Anschließend konnte aus der restlichen Bakteriensuspension das Plasmid mit Hilfe einer Maxipräparation in größerem Maßstab aufgereinigt werden.

2.2.2.5.1 Plasmidminipräparation

Dieses Verfahren ermöglicht es Plasmid-DNA in analytischem Maßstab aus Bakterien zu isolieren. Die Minipräparation wurde mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. 4ml der in 2.2.2.5 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 mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. 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.

Zur Erfolgskontrolle wurde das Plasmid zur Sequenzanalyse an die Firma Eurofins mwg/operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Nach positivem Testergebnis konnte der Plasmidklon für die Experimente eingesetzt werden.

2.2.2.5.2 Plasmidmaxipräparation

Auch dieses Verfahren dient dazu Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren. Allerdings kann hier durch Einsatz einer erhöhten Bakterienzahl eine größere Menge an Plasmid gewonnen werden. Die Plasmidmaxipräparation wurde mit Hilfe des NucleoBond Xtra Maxi Kits der Firma Macherey Nagel durchgeführt. Es wurde 1ml der LB-Kultur aus 2.2.2.5 zu 500ml LB-Medium mit 500µl Ampicillinlösung (50mg/ml) pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 175 rpm und 37°C im Schüttler. Anschließend wurden die 500ml LB-Kultur bei 6000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 12ml Buffer LYS alkalisch 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. Anschließend wurde die Konzentration im Spectrophotometer Nanodrop 2000 gemessen.

2.2.2.6 Herstellung eines Kontrollplasmides

Als Kontrollplasmid soll aus dem TRIB3-pCMV Sport 6 Vektor die TRIB3 Sequenz herausgeschnitten werden. Hierfür wurde das Plasmid mit zwei Restriktionsenzymen so geschnitten, dass 2 zueinander passende überhängende Enden entstehen. Anschließend wurden die entstandenen DNA-Fragmente in einem Agarosegel der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Das Kontrollplasmid wurde aus dem Gel extrahiert, die DNA Konzentration gemessen und mit einem Enzym die beiden Enden wieder verbunden.

Das Plasmid wurde in Bakterien vervielfältigt, mittels einer Minipräparation isoliert und zur Erfolgskontrolle zum Sequenzieren geschickt. Daraufhin wurde eine Maxipräparation zur Vervielfältigung des Vektors durchgeführt.

2.2.2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um die TRIB3-Sequenz zu entfernen wird das Plasmid vor und hinter dieser Sequenz mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe Anhang Plasmid). Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und den DNA-Doppelstrang an diesen Stellen durch Hydrolyse spalten.

Es wurde 1µg TRIB3 Plasmid mit 2µl NE-Buffer 4, 2µl 10 x BSA, 0,5µl Xho I, 0,5µl Sal I HF und 2µl destilliertes Wasser gemischt und für 1 Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert. Hierdurch entstanden 3 Fragmente; die TRIB3 Sequenz und das Kontrollplasmid in linearer Form, sowie ein kleiner Rest ursprüngliches Plasmid.

2.2.2.6.2 Agarose Gelelektrophorese

Für die Größenbestimmung der DNA wird ihre durch zahlreiche Phosphatgruppen hervorgerufene negative Ladung ausgenutzt. Legt man DNA in ein elektrisches Feld, so wandern die einzelnen amplifizierten Fragmente entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Zur Größenbestimmung dient ein Marker mit DNA-Fragmenten bekannter Größe. Zur Färbung dient Ethidiumbromid, welches sich an DNA anlagert und diese so im UV-Licht sichtbar macht. Das gewünschte DNA-Fragment kann anhand seiner Größe identifiziert und von der übrigen DNA isoliert werden.

Benötigter Puffer:

50 × TAE:	242,28g Tris
	68,05g Natriumacetat
	18,61g EDTA
	ad 1000ml destilliertes Wasser
	→ pH 8,0 mit Essigsäure einstellen

Entsprechend der Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurden 0,5g Agarose und 50ml TAE-Puffer aufgekocht und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Sobald das Gel fest war, wurde es in eine TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Der Restriktionsverdau aus 2.2.2.6.1 wurde mit 4µl 6 x DNA Loading Dye versetzt und in die Taschen des 1%igen Agarosegels geladen. Als Marker diente ein 1kb DNA Ladder. Als Kontrolle wurde 1,0µg unverdautes TRIB3 Plasmid mit entsprechender Menge Ladepuffer versetzt und in eine Geltasche pipettiert. Das Gel lief 30 Minuten bei 100 Volt und wurde für 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad der Konzentration 0,5µl/ml inkubiert und die DNA-Banden unter Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht. War der Restriktionsverdau erfolgreich, so konnte eine DNA-Bande bei 4356bp detektiert werden, die der Plasmidgröße ohne TRIB3 Sequenz entspricht. Im Vergleich dazu war bei dem unverdauten TRIB3-Plasmid eine DNA-Bande bei 6678bp sichtbar. Unter UV-Licht wurde die Plasmid-DNA im Agarosegel ausgeschnitten.

2.2.2.6.3 DNA-Isolation aus Agarose Gelen

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits der Firma Macherey Nagel. Hierzu wurde das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstückes ermittelt. Pro 100mg Agarosegel wurden 200µl NT Buffer zugefügt und so lange bei 50°C unter gelegentlichem Mischen 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 DNA-Konzentration konnte mittels Spectralphotometer Nanodrop 2000 bestimmt werden.

2.2.2.6.4 Ligation eines DNA-Stranges

Aus dem linearen DNA-Strang wurde mittels Ligasen wieder ein zirkuläres Plasmid gebildet.

Hierfür wurden 100ng DNA mit 1µl T4 DNA Ligase, 2µl T4 Ligasepuffer, ad 20µl destilliertes Wasser gemischt und über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.2.2.6.5 Plasmidamplifikation in Escherichia coli

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. Zur Transformation wurde die Hitzeschock-Methode gewählt.

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

Es wurden 250ng Plasmid mit 100 μl DH5 α Bakterien eines E.coli Stammes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach weiteren 5 Minuten im 42°C Wasserbad wurden 500 μl kaltes LB-Medium zugegeben und die Suspension für 10 Minuten auf Eis gestellt. 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. 50 μl der Suspension wurden 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 μl 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 hatten zu vermehren, wurden 4 Klone mit einer Pipettenspitze von den Agarplatten abgenommen, zu 5ml LB Medium gegeben und anschließend mit 5 μl einer Ampicillinlösung (50mg/ml) versetzt. Zur Expansion der Kolonien folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Minipräparation, wie unter 2.2.2.5.1 beschrieben, durchgeführt und das aufgereinigte Plasmid einer Sequenzanalyse unterzogen. Nach positivem Testergebnis konnte eine Maxipräparation, wie unter 2.2.2.5.2 beschrieben, zur Isolierung des Plasmids in größerem Maßstab durchgeführt werden. Die Konzentration des aufgereinigten Kontroll-Plasmides wurde mit dem Spectralphotometers Nanodrop 2000 ermittelt und ein Aliquot, wie unter 2.2.1.6 beschrieben, in HepG2 Zellen transfiziert.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteinisolation

Es wurde ein Western Blot zur spezifischen Detektion einzelner Proteine durchgeführt. Für die Proteinisolation wurden die Zellen mittels Zellschaber gelöst, bei 8000 rpm 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor lysiert.

RIPA-Puffer:

- 25mM Tris/HCl pH 7,6
- 150mM NaCl
- 1% Igepal CA630
- 1% Natriumdeoxycholat
- 0,1% SDS
- 1 Tablette Complete Mini Proteaseinhibitor (Roche) pro 10ml

2.2.3.2 BCA-Assay

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde ein BCA (Bicinchoninsäure) Assay durchgeführt.

Die Methode beruht auf der Biuret Reaktion. Hierbei werden die zweiwertigen Kupferionen des Protein-Cu²⁺-Komplexes zu Cu⁺ reduziert. Die Cu⁺-Ionen bilden ihrerseits farbige Komplexe mit Bicinchoninsäure. Je nach Menge des Proteins ändert sich somit die Absorption des Lichts bei 562nm im Photometer. Das Photometer wurde mit RIPA-Puffer kalibriert. Die Proben wurden mit RIPA-Puffer verdünnt um bei der Messung im linearen Bereich des Absorptionsspektrums zu liegen.

Es wurden je 2µl Probe mit 48µl RIPA-Puffer, 1ml BCA-Solution und 20µl 4%-Kupfersulfat gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im Photometer bei 562nm gemessen und die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

2.2.3.3 Western Blot

Western Blot ist ein Verfahren zur spezifischen Detektion einzelner Proteine mittels der Kombination von hoch auflösender Elektrophorese und immunologischem Nachweis. Um die Proteine für Antikörper zugänglich zu machen und sie zu immobilisieren, werden sie nach elektrophoretischer Trennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese Membran wird mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Der Antikörper wiederum wird durch einen Zweitantikörper markiert und mittels Chemolumineszenzverfahren zum Leuchten angeregt. In der Dunkelkammer kann anschließend die Dokumentation mittels Röntgenfilm erfolgen.[74, 75]

Verwendete Puffer und Gele:

5 × SDS-Probenpuffer:	5ml 1 M Tris pH 6,8 2g SDS 5,86ml β -Mercaptoethanol 20g Glycerin 0,04g Bromphenolblau Ad 100ml destilliertes Wasser
4 × Lower-Buffer pH 8,8:	4g SDS 181,72g Tris ad 1000ml destilliertes Wasser
4 × Upper-Buffer pH 6,8:	2g SDS 30,28g Tris ad 1000ml destilliertes Wasser
10 × PBS, pH 7,4:	80g NaCl 2g KCl 14,4g Na_2HPO_4 2,4g NaH_2PO_4 in 800ml destilliertes Wasser → Autoklavieren
Trenngel (für 2 Gele):	6,25ml destilliertes Wasser

	5ml 30% Acrylamid
	3,75ml 4× Lower Puffer
	150µl APS
	15µl Temed
Sammelgel (für 2 Gele):	5,7ml destilliertes Wasser
	1,3ml 30% Acrylamid
	2,25ml 4× Upper Puffer
	100µl APS
	10µl Temed
10 x Elektrophoreselaufpuffer:	15,1g Tris
	94g Glycin
	50ml 10%ige SDS-Lösung
	ad 1000ml destilliertes Wasser
5-fach Laemmli-Puffer:	10ml Glycerin
	12,5ml Upper Tris
	30ml 10% SDS
	5ml β-Mercaptoethanol
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	ad 100ml destilliertes Wasser
Semidry Blotting Puffer:	2,93g Glycin
	5,82g Tris
	3,7ml 10%ige SDS-Lösung
	200ml Methanol
	ad 1000ml destilliertes Wasser

2.2.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 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 durchlaufen die Proteine 2 Gele, die sich in ihrer

pH und Acrylamidkonzentration unterscheiden. Die Gele entstehen aus einer radikalischen Polymerisation von Acrylamid und n,n' -Methylenbisacrylamid. 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.

Zur Herstellung der Sammel- und Trenngele wurden Glasplatten mit Ethanol gereinigt und in die Blot Apparatur gespannt. Es wurde ein 10%iges Trenngel wie oben beschrieben hergestellt. Dieses wurde zwischen die Glasplatten gegossen und mit 1,5cm Wasser überschichtet um eine Luftblasenbildung zu vermeiden. Nach 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert und das Wasser konnte abgegossen werden.

Daraufhin wurde das 5%ige Sammelgel gemischt, über das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit $1 \times$ Elektrophoreselaufpuffer gegeben.

Die Proben wurden 1:4 mit Laemmli-Puffer versetzt. Der Laemmli-Puffer wurde 5 Minuten bei 99°C erwärmt, zu den Proben gegeben, das Gemisch 5 Minuten bei 99°C inkubiert und 10 Sekunden zentrifugiert.

2-Mercaptoethanol im Laemmli-Puffer sorgt für die Reduktion von Disulfidbrücken. SDS lagert sich mit seiner hydrophoben Seite an die Proteine an, während der negativ geladene, hydrophile Teil vom Protein weg zeigt.

Als Proteingrößenstandard wurden $10\mu\text{l}$ BenchMark Prestained Protein Ladder verwendet. Pro Bande wurden 20-30 μg Protein beladen. Die Fokussierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei 80V, die anschließende Auftrennung im Trenngel bei 180V.

2.2.3.3.2 Semi-Dry Blot

Mit Hilfe des Semidry Blot Systems wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Hierbei wandern die Proteine durch das Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld in Richtung Anode und werden dabei vom Gel auf die Membran transferiert.

Die Nitrozellulosemembran und 20 Whatman-Paper wurden in Semidry Blotting Puffer getränkt. Das Gel wurde auf die Nitrozellulosemembran zwischen Whatman-Paper in das Blotgerät gelegt und für 90 Minuten bei 25 Volt geblottet.

Anschließend wurde die Membran zum Färben aller Proteine wenige Sekunden in Panceau-Rot getaucht und mit destilliertem Wasser gespült bis die einzelnen Proteinbanden sichtbar waren.

Mit PBS mit 0,1% Tween wurde die Membran entfärbt und 1 Stunde in 5%iger Magermilch unter Wiegen inkubiert. Hierdurch wurden die freien unspezifischen Banden blockiert.

2.2.3.3.3 Proteindetektion

Der Antigennachweis erfolgte mittels Immunodetektion. Hierbei wird das freiliegende Protein von einem spezifischen Erstantikörper gebunden, an den sich wiederum ein enzymgekoppelter Zweitantikörper anlagert. Das Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert eine Chemilumineszenz-Reaktion. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht führt zur Belichtung eines Röntgenfilms, der anschließend entwickelt wird.

Nach der Blockierung der unspezifischen Banden in Magermilch wurde die Membran 3-mal mit PBS mit 0,1% Tween gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 10ml des jeweiligen Primärantikörpers unter Wiegen inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgegossen und die Membran 3-mal je 10 Minuten mit PBS mit 0,1% Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Wiegen inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS mit 0,1% Tween für je 10 Minuten wurde die Membran mit ECL Detection Reagents 1 Minute unter Schwenken inkubiert. Das System beruht auf der Oxidation von Luminol durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase. Die Belichtung der Röntgenfilme erfolgte in einer Röntgenkassette mit unterschiedlichen Zeiten (1s-60min). Anschließend wurde der Film in der Dunkelkammer entwickelt.

Antikörper	Verdünnung	Lösungsmedium
TRIB3	1:1000	5 % Magermilchlösung
Anti-rabbit	1:1000	5 % Magermilchlösung
β-Actin	1:1000	5 % Magermilchlösung
Anti-mouse	1:1000	5 % Magermilchlösung
SREBP-2 monoklonal (C-6)	1:200 – 1:1000	PBS mit 0,1 % Tween
Anti-mouse	1:1000	PBS mit 0,1 % Tween
SREBP-2 polyklonal	1:100 – 1:1000	PBS mit 0,1 % Tween
Anti-goat	1:1000	PBS mit 0,1 % Tween
SREBP-2 monoklonal clone 2545	1:200 – 1:1000	PBS mit 0,1 % Tween
Anti-mouse	1:1000	PBS mit 0,1 % Tween

Tabelle 5: Western Blot Antikörper

2.2.4 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 Western Blots 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 TRIB3-Knockdown

Der Knockdown von TRIB3 erfolgte durch den Einsatz von siRNA, die durch Elektroporation in die Zellen transfiziert wurde. Zur Optimierung des TRIB3-Knockdowns wurden Dauer und Stärke des elektrischen Feldes, sowie der Zeitabstand zwischen Elektroporation und Ernten der Zellen variiert.

3.1.1 Elektroporationsprotokoll

Das Elektroporationsprotokoll bestimmt die Dauer und Stärke des elektrischen Feldes, das an die Zellen angelegt wird um die Zellmembran permeabel zu machen.

Es wurden drei unterschiedliche Elektroporationsprotokolle zur Einbringung von TRIB3 siRNA in HepG2 Zellen getestet. Ein Teil der Zellen wurde nach 24 Stunden, der andere Teil nach 48 Stunden geerntet. Anschließend wurde die Expression von TRIB3 mittels realtime-PCR gemessen.

Elektroporationsprotokolle:

1. Rechteckspannung, 340V, 10ms
2. Rechteckspannung, 320V, 20ms
3. Rechteckspannung, 220V, 20ms

Als Kontrolle diente non-silencing siRNA.

Protokoll 1 erzielte mit 27 % nach 24 Stunden und 19 % nach 48 Stunden die geringste Restexpression von TRIB3 (vgl. Abb.3). In den folgenden Versuchen wurde mit diesem Protokoll gearbeitet.

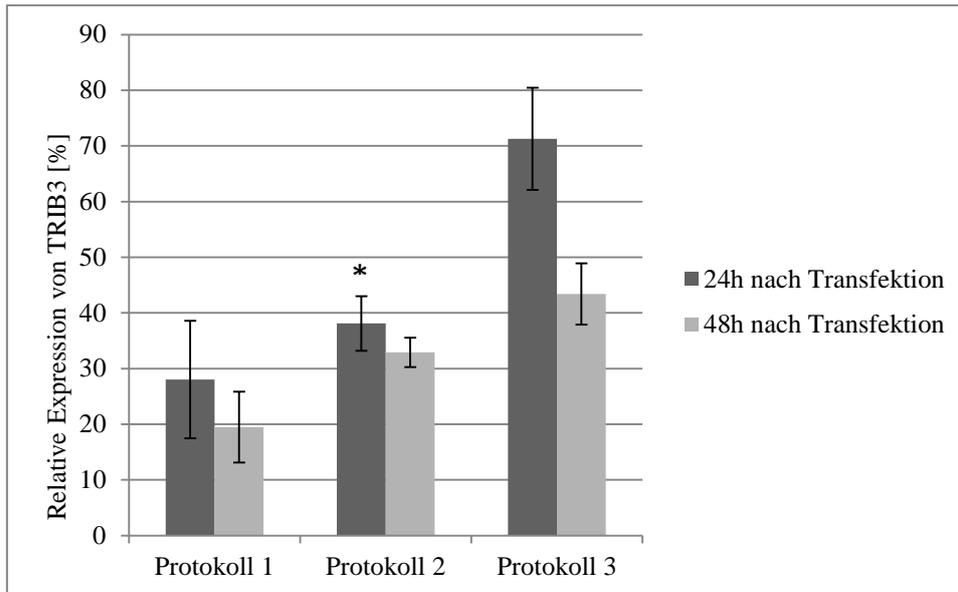


Abb. 3: Elektroporationsprotokoll

Die Zellen wurden mit drei verschiedenen Protokollen entsprechend der im Text angegebenen Bedingungen elektroporiert (133nm siRNA pro 12-Well) und 24 beziehungsweise 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurde der TRIB3-RNA-Gehalt mittels realtime-PCR ermittelt. Die Angaben stellen die Restexpression von TRIB3 in Prozent bezogen auf Kontrollzellen, die mit non-silencing siRNA elektroporiert wurden, dar. 1 Million Zellen pro 12-Well. N=2. Die Werte sind Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). * bezeichnet einen p-Wert < 0.05 .

3.1.2 TRIB3-Knockdown im Zeitverlauf

Zur weiteren Optimierung wurde die TRIB3-Expression nach Elektroporation im Zeitverlauf bestimmt. Hierfür wurden die Zellen elektroporiert, 1 Million Zellen pro 12-Well ausgesät, nach 12, 24 und 48 Stunden geerntet und die TRIB3-Expression mittels realtime-PCR bestimmt. Schon nach 12 Stunden konnte ein signifikanter TRIB3-Knockdown auf 55% festgestellt werden. Die geringste Expression von TRIB3 war nach 48 Stunden mit 16% zu verzeichnen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit non-silencing siRNA elektroporiert. Hierbei konnte man deutlich sehen, dass auch in den Kontrollen die TRIB3-Expression abnahm (vgl. Abb.4). Um einen Eindruck der basalen TRIB3 Expression zu gewinnen, wurden unbehandelte Zellen für 12 Stunden in Wells kultiviert und anschließend der TRIB3-Gehalt mittels realtime-PCR bestimmt (vgl. Abb.4).

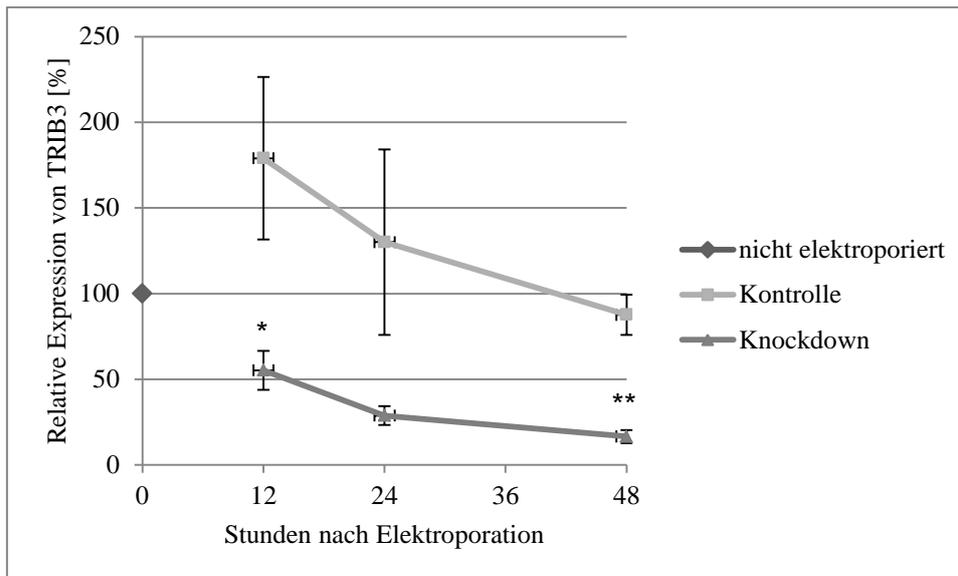
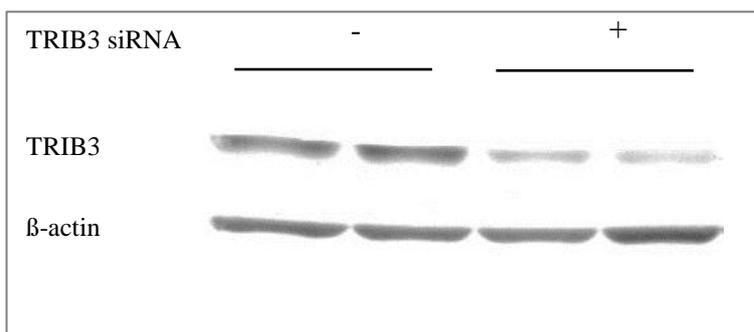


Abb. 4: TRIB3-Knockdown im Zeitverlauf

Die Zellen wurden elektroporiert (133nm siRNA pro 12-Well), kultiviert und nach 12, 24 und 48 Stunden geerntet. Anschließend wurde der TRIB3-RNA-Gehalt mittels realtime-PCR ermittelt. Die Werte stellen die Restexpression von TRIB3-RNA in Prozent bezogen auf nicht elektroporierte Zellen dar. 1 Million Zellen pro 12-Well. N=3-4. Die Werte sind Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Im Folgenden wurde der TRIB3-Knockdown auf Proteinebene untersucht. Der Knockdown auf Proteinebene sollte zeitlich kurz nach dem Knockdown auf RNA-Ebene zu verzeichnen sein. Die Zellen wurden elektroporiert, 2 Millionen Zellen pro 6-Well ausgesät und nach 48 Stunden geerntet. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit non-silencing siRNA elektroporiert wurden. Anschließend wurde der Proteingehalt mittels BCA-Assay bestimmt und ein Western Blot durchgeführt. Als Referenz diente ein β -Aktin Antikörper. Der TRIB3-Knockdown konnte nach 48 Stunden deutlich gesehen werden (vgl. Abb.5).

A



B

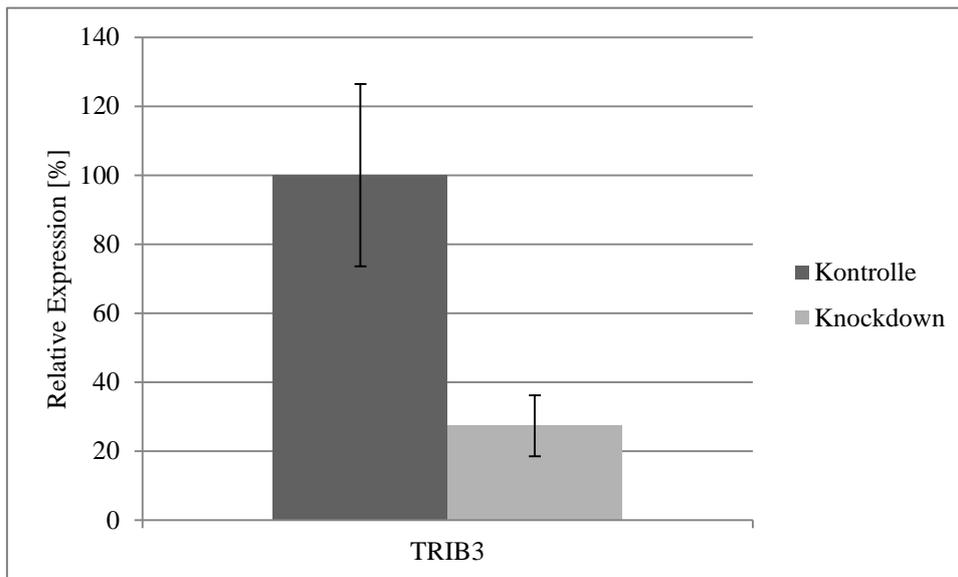


Abb. 5: TRIB3-Knockdown auf Proteinebene

Die Zellen wurden elektroporiert (266nm siRNA pro 6-Well), in Standardmedium kultiviert und nach 48 Stunden geerntet. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt und ein Western Blot durchgeführt. Hierbei erfolgte die Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten TRIB3 Erstantikörper und einem 1:1000 verdünnter Anti-rabbit Zweitantikörper. Die Detektion erfolgte nach standardisiertem Vorgehen, wie unter Material und Methoden beschrieben. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit non-silencing siRNA behandelt wurden. A: Western Blot Analyse. B: Semiquantitative Auswertung des Western Blots. 2 Million Zellen pro 6-Well. N=2. Die Werte sind Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE).

3.1.3 Der Einfluss eines TRIB3-Knockdowns auf SREBP-2

Im Tierexperiment mit Ratten wurde gezeigt, dass bei einem Knockdown von TRIB3 der SREBP-2- sowie der Plasma-HDL-Cholesterin-Spiegel ansteigen. ABCA-1 und SR-B1 wurden durch einen TRIB3-Knockdown nicht beeinflusst.[15] Um dies im Zellmodell zu untersuchen wurde ein TRIB3-Knockdown in HepG2 Zellen durchgeführt und der TRIB3 sowie SREBP2 RNA-Gehalt bestimmt.

Hierfür wurden die Zellen mit TRIB3-siRNA elektroporiert, für 24 Stunden in Standardmedium kultiviert, geerntet und mittels realtime-PCR der TRIB3 und SREBP-2 RNA-Gehalt bestimmt. Die Kontrollen wurden mit non-silencing siRNA elektroporiert.

Hierbei konnte das Ergebnis des Tierexperiments bestätigt werden. Durch TRIB3-Knockdown kam es zu einem signifikanten SREBP-2-Anstieg auf 178% (vgl. Abb.6).

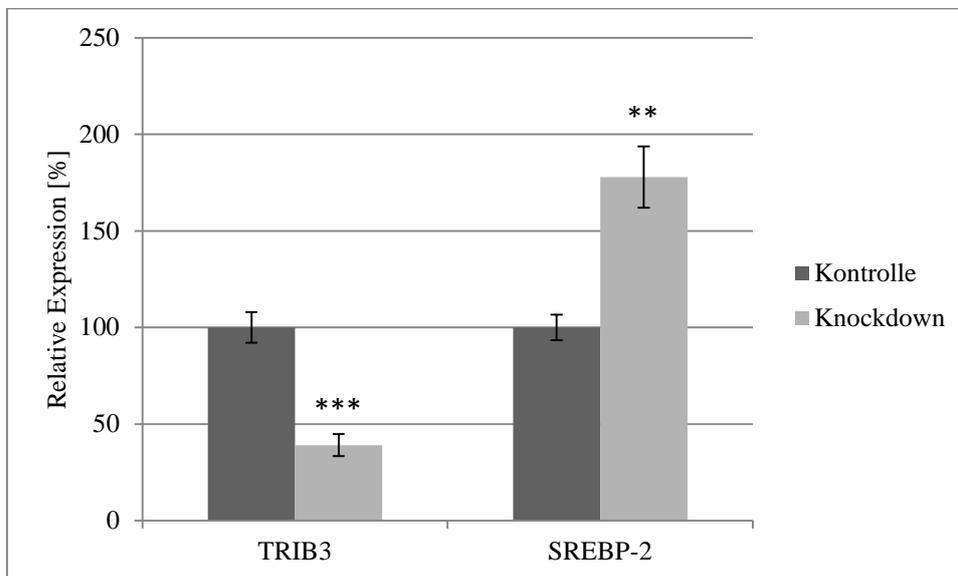


Abb. 6: Einfluss eines TRIB3-Knockdown auf SREBP-2

*Die Zellen wurden elektroporiert, (266nm siRNA pro 6-Well), in Standardmedium kultiviert, nach 24 Stunden geerntet und der TRIB3 und SREBP-2 RNA-Gehalt mittels realtime-PCR bestimmt. Die Kontrollen wurden mit non-silencing siRNA elektroporiert. N=9. 2 Million Zellen pro 6-Well. Die Werte sind Mittelwerte (M) ± Standardfehler (SE). * p-Wert < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.*

Daraufhin sollte der SREBP-2-Anstieg auf Proteinebene gezeigt werden. Hierzu wurde ein Western Blot durchgeführt. Es wurden 3 verschiedene SREBP-2 Antikörper eingesetzt. Die Antikörperkonzentrationen, die Proteinmengen, sowie die Antikörper-Inkubationszeiten wurden variiert. Allerdings war es technisch nicht möglich in HepG2 Zellysat eine Bande eindeutig als SREBP-2 zu identifizieren.

Um die Funktionstüchtigkeit der Antikörper zu testen, wurde ein Western Blot mit LNCaP-Zellysat als Positivkontrolle durchgeführt. Pro Bande wurden 50µg LNCaP-Zellysat geladen, eine Elektrophorese durchgeführt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Diese wurde über Nacht mit den verschiedenen SREBP-2 Erstantikörpern (1:500), am nächsten Tag für 1 Stunde mit den jeweiligen Zweitantikörpern (1:1000) inkubiert. Hierbei zeigte ein Antikörper ein gutes Signal von SREBP-2 bei 68 kd. Die übrigen Antikörper zeigten unspezifische Banden (vgl. Abb.7).

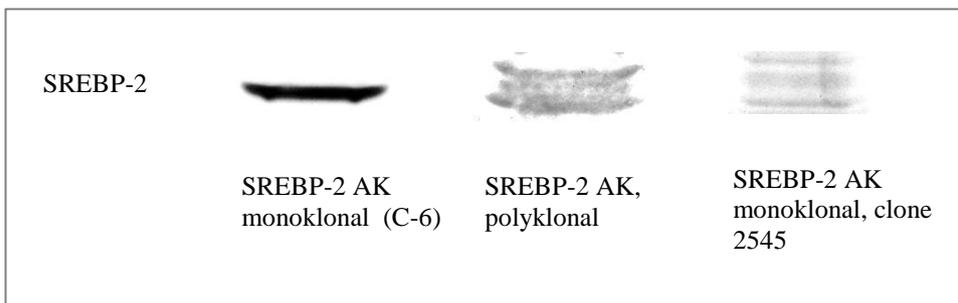


Abb. 7: Positivkontrolle mit 3 verschiedenen SREBP-2 Antikörpern

Es wurde jeweils 50µg LNCaP Zelllysate pro Tasche geladen und ein Western Blot durchgeführt. Die Inkubation erfolgte mit 3 verschiedenen 1:500 verdünnten SREBP-2 Antikörpern über Nacht, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten Zweitantikörper. Die Detektion erfolgte nach standardisiertem Vorgehen, wie unter Material und Methoden beschrieben.

Nun wurden weitere Gene, die an der Cholesterinhomöostase beteiligt sind, untersucht. Hierfür wurde in TRIB3-Knockdown-Zellen der RNA-Gehalt an ABCA-1, APO-A1, HMG-CoA-Reduktase, LXR- α , SR-B1 und SREBP-1c bestimmt. ABCA-1, LXR- α und HMG-CoA-Reduktase zeigten keine signifikante Veränderung, während APO-A1, SR-B1 und SREBP-1c bei TRIB3-Knockdown anstiegen (vgl. Abb.8).

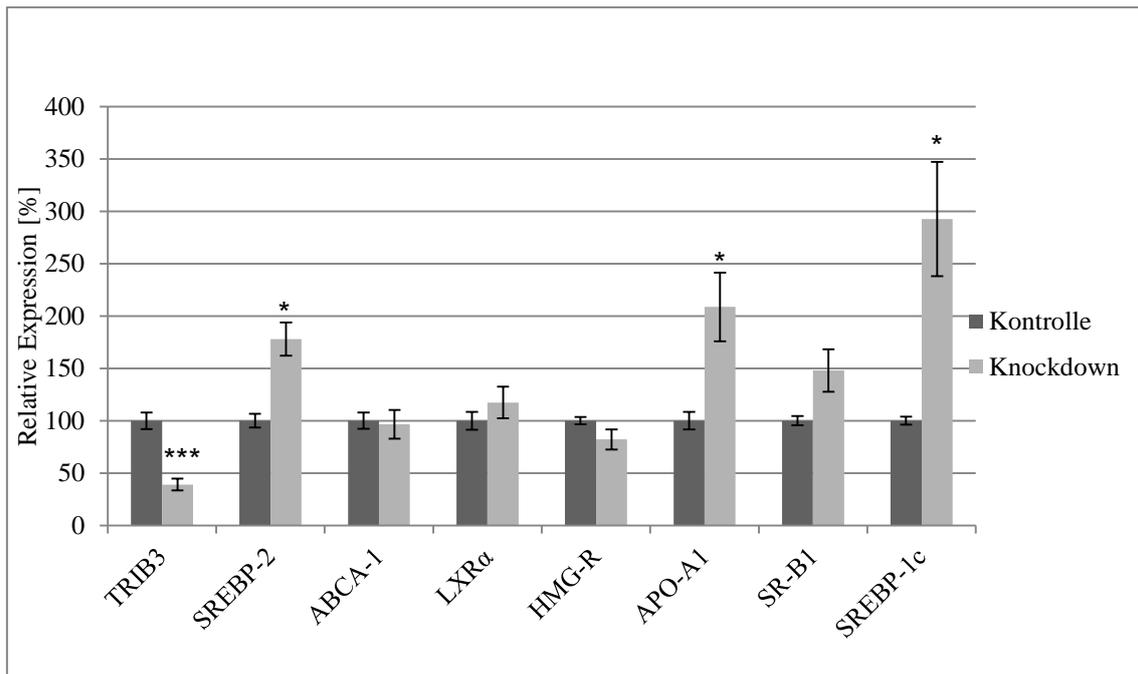


Abb. 8: Einfluss eines TRIB3-Knockdowns

Die Zellen wurden elektroporiert, (133nm siRNA pro 12-Well), nach 24 Stunden geerntet und der RNA-Gehalt an TRIB3, SREBP-2, ABCA-1, LXR- α , HMG-CoA-Reduktase, APO-A1, SR-B1 und SREBP-1c mittels realtime-PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit non-silencing siRNA elektroporiert wurden. N=6. 1 Million Zellen pro 12-Well. Die Werte sind Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). * p-Wert < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

3.2 Fettsäureinkubation

3.2.1 Etablierung einer Inkubation mit Fettsäuren

Ein TRIB3-Knockdown führt zu einem Anstieg von SREBP-2. Nun sollte untersucht werden, ob eine TRIB3-Induktion ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf SREBP-2 hat. Für die Induktion von TRIB3 wurde eine Inkubation der Zellen mit Fettsäuren durchgeführt.

Fettsäuren bewirken ER-Stress, der zum Anstieg von TRIB3 führt.[76, 77] Zudem führen einige Fettsäuren in Zellen zu einer Insulinresistenz.[14, 78]

Zur Optimierung der Fettsäureinkubation wurden die Fettsäureart, die Fettsäurekonzentrationen und die Inkubationszeiträume variiert. Die Zellen wurden in Wells kultiviert und für 6 beziehungsweise 8 Stunden mit Palmitinsäure als gesättigter Fettsäure oder Ölsäure als einfach ungesättigter Fettsäure in einer Konzentration von 0,08mM inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der TRIB3 Expression auf RNA Ebene mittels realtime-PCR.

Es zeigte sich, dass Palmitinsäure schon nach 6 Stunden zu einer geringen TRIB3-Induktion führt, während Ölsäure keinen Einfluss auf die TRIB3 Expression hat (vgl. Abb.9). Im Folgenden wurde mit Palmitinsäure gearbeitet.

Fettsäureinkubation induziert Apoptose.[79] Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten, wurde für die weiteren Versuche der kürzere Inkubationszeitraum von 6 Stunden gewählt.

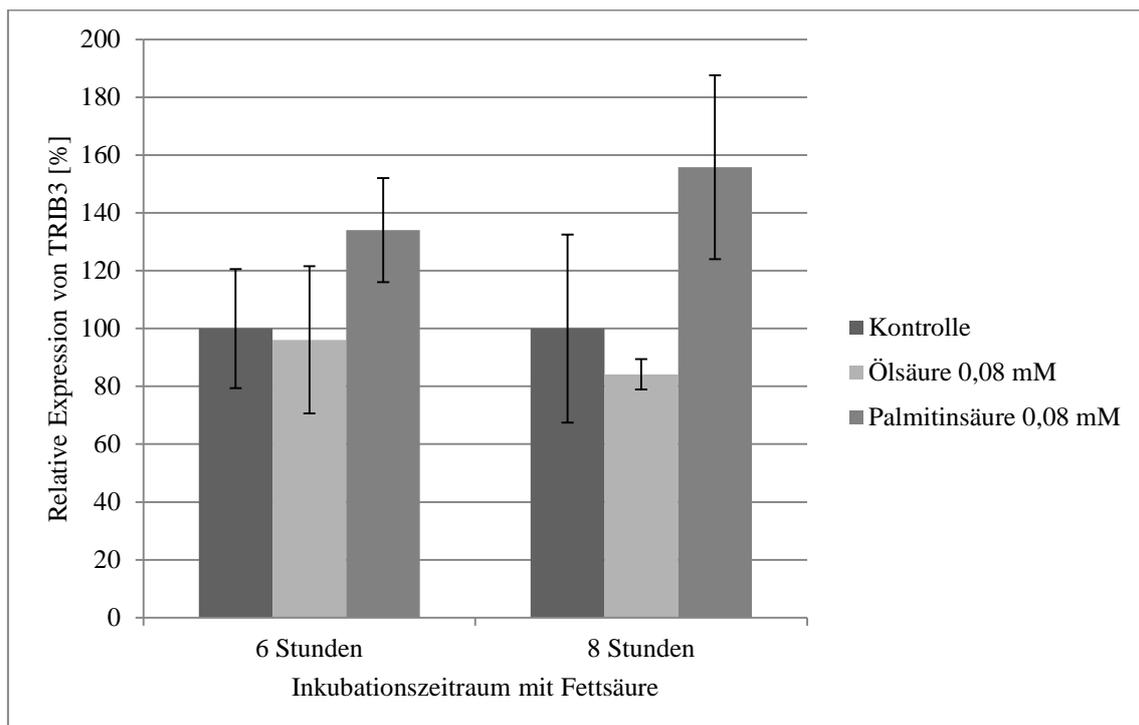


Abb. 9: Fettsäureinkubation im Zeitverlauf

Je 2 Million Zellen wurden in 6-Wells ausgesät, über Nacht in Standardmedium, für 24 Stunden in FCS-freiem Medium und anschließend für 6 beziehungsweise 8 Stunden in 0,08mM Fettsäure inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels realtime-PCR der TRIB3-RNA-Gehalt bestimmt. N=2. Die Werte sind Mittelwerte (M) ± Standardfehler (SE).

Um die TRIB3-Induktion zu verstärken, wurde eine höhere Konzentration an Palmitinsäure (0,8mM) gewählt. Hierdurch zeigte sich ein signifikanter TRIB3-Anstieg auf 235% (vgl. Abb.10).

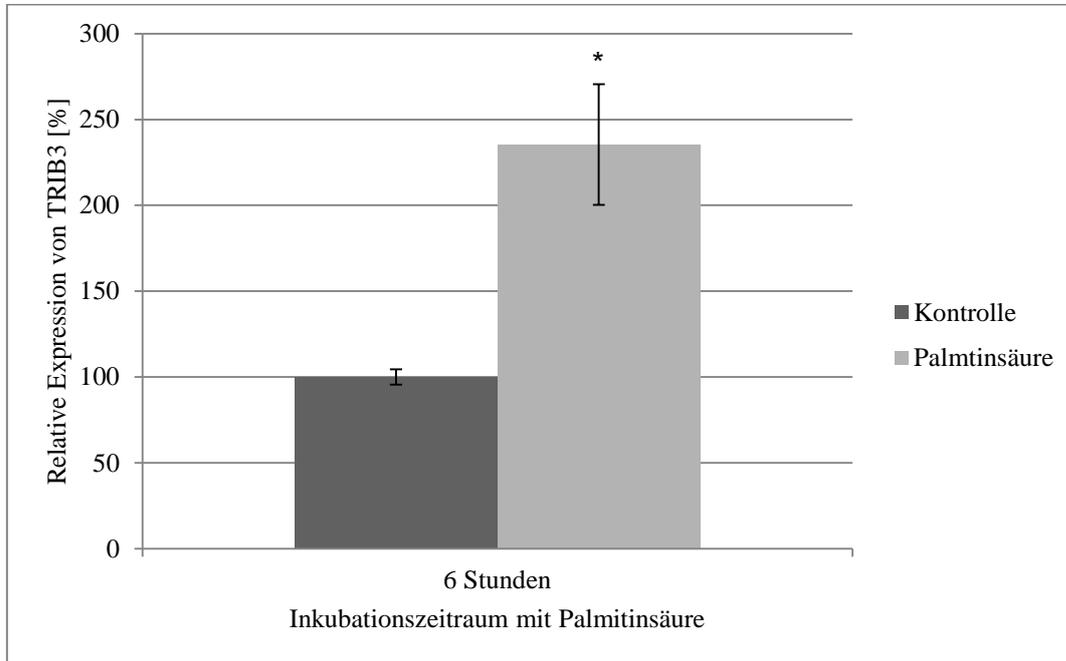


Abb. 10: Einfluss von Palmitinsäure auf TRIB3

*Je 2 Million Zellen wurden in 6-Well ausgesetzt, über Nacht in Standardmedium, für 24 Stunden in FCS-freiem Medium und anschließend für 6 Stunden in 0,8mM Palmitinsäure inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels realtime-PCR der RNA-Gehalt an TRIB3 bestimmt. N=9. Die Werte sind Mittelwerte und Standardfehler (SE) *p-Wert < 0.05.*

Frau C. Münker konnte auf Proteinebene mittels Western Blot ebenfalls eine signifikante Induktion von TRIB3 in HepG2 Zellen nach Palmitinsäureinkubation feststellen. Zudem zeigte sie in einem parallelen Experiment, dass die Inkubation der HepG2 Zellen mit Palmitinsäure zu ER-Stress führt. Somit ist es möglich, dass die Induktion von TRIB3 nach Palmitinsäureinkubation vorwiegend auf ER-Stress zurückzuführen ist. (vgl. „Einfluss der TRIB3-Expression auf die Insulinsensitivität von HepG2 Zellen“ von C. Münker)

3.2.2 Der Einfluss einer Induktion von TRIB3 mittels Palmitinsäure auf SREBP-2

Nun sollte der Einfluss einer TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure auf SREBP-2 untersucht werden.

Die Zellen wurden in Wells kultiviert und für 6 Stunden mit 0,8mM Palmitinsäure inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen geerntet und der TRIB3 sowie SREBP-2 RNA Gehalt bestimmt.

Hierbei zeigte sich bei TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure ein Anstieg von SREBP-2 auf 297% (vgl. Abb.11).

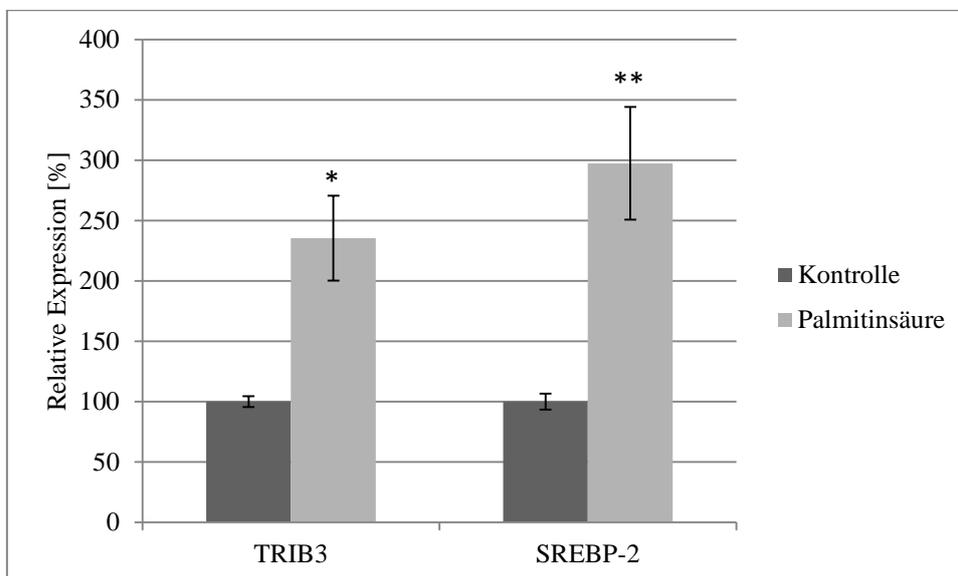


Abb. 11: Einfluss einer TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure auf SREBP-2

*Je 1 Million Zellen wurden in 12-Wells ausgesät, über Nacht in Standardmedium, für 24 Stunden in FCS-freiem Medium und anschließend für 6 Stunden in Medium mit 0,8mM Palmitinsäure inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels realtime-PCR der RNA-Gehalt an TRIB3 und SREBP-2 bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit non-silencing siRNA elektroporiert wurden. N=6. Die Werte sind Mittelwerte (M) ± Standardfehler (SE). * p-Wert < 0.05; ** p < 0.01.*

Bei einem TRIB3-Knockdown konnte eine Induktion von APO-A1, SR-B1 und SREBP-1c gesehen werden. Nun sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine TRIB3 Induktion durch Palmitinsäure auf diese Faktoren hat. Die Zellen wurden wie für

den Versuch der Abbildung 11 behandelt. Der mRNA-Gehalt wurde mittels realtime-PCR ermittelt. Apo-A1 und SR-B1 zeigten keine Veränderung, während SREBP-1c eine signifikante Reduktion auf 59% erkennen ließ (vgl. Abb.12).

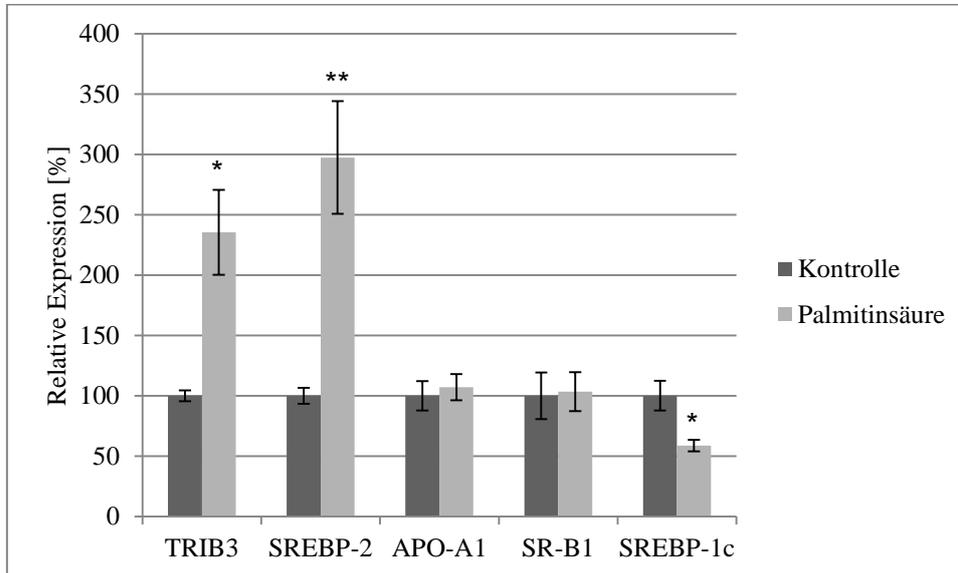


Abb. 12: Einfluss einer TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure

*Je 1 Million Zellen wurden in 12-Wellns ausgesät, über Nacht in Standardmedium, für 24 Stunden in FCS-freiem Medium und anschließend für 6 Stunden in Medium mit 0,8mM Palmitinsäure kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels realtime-PCR der RNA-Gehalt an TRIB3, SREBP-2, APO-A1, SR-B1 und SREBP-1c bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit non-silencing siRNA elektroporiert wurden. N=5. Die Werte sind Mittelwerte (M) ± Standardfehler (SE). * p-Wert < 0.05; ** p < 0.01.*

3.3 Der Einfluss eines TRIB3-Knockdowns auf SREBP-2 in insulinresistenten HepG2 Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass ein TRIB3-Knockdown in HepG2 Zellen zu einem Anstieg von SREBP-2 führt, wie es in vivo bei Ratten vorbeschrieben war. Diese Ratten hatten Diabetes mellitus Typ 2, so dass nun untersucht werden sollte, ob auch in insulinresistenten HepG2 Zellen ein TRIB3-Knockdown zu einem Anstieg von SREBP-2 führt.[15] Die Insulinresistenz wurde durch Inkubation der Zellen mit Palmitinsäure geschaffen.[78] Die Inkubation mit Palmitinsäure erfolgte unter den in Abschnitt 3.2.1 etablierten Bedingungen.

Die Zellen wurden elektroporiert, in Wells ausgesät, über Nacht in Standardmedium und anschließend für 24 Stunden in FCS-freiem Medium kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 6 Stunden mit 0,8mM Palmitinsäure inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit non silencing siRNA elektroporiert wurden und zur Hälfte mit, zur anderen Hälfte ohne Palmitinsäure kultiviert wurden. Es ergaben sich 4 Gruppen:

	TRIB3 siRNA	Palmitinsäure
Kontrolle ohne Palmitinsäure	-	-
Kontrolle mit Palmitinsäure	-	+
TRIB3 Knockdown ohne Palmitinsäure	+	-
TRIB3 Knockdown mit Palmitinsäure	+	+

Bei diesem Versuchsaufbau zeigten sich realtime-PCR und Western Blot Ergebnisse widersprüchlich. Sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene konnte ein guter TRIB3-Knockdown, sowie eine gute TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure verzeichnet werden (vgl. Abb.13 und 14). Der Western Blot zeigte bei der Kombination von TRIB3-Knockdown mit Palmitinsäureinkubation im Vergleich zur Kontrolle einen fast unveränderten TRIB3-Spiegel. Hingegen zeigte die realtime-PCR bei diesen Zellen eine sehr starke Induktion von TRIB3 auf 497% (vgl. Abb.13 und 14).

SREBP-2 zeigte bei diesem Versuch keine signifikanten Veränderungen. Es kam bei TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure, wie in Versuch 11 gezeigt, zu einem Anstieg von SREBP-2. Bei reinem Knockdown von TRIB3 kam es hier allerdings nicht zu einem Anstieg von SREBP-2, sondern eher zu einem Abfall. Bei der Kombination von TRIB3-Knockdown und Inkubation mit Palmitinsäure stieg SREBP-2 auf 155% an (vgl. Abb.13).

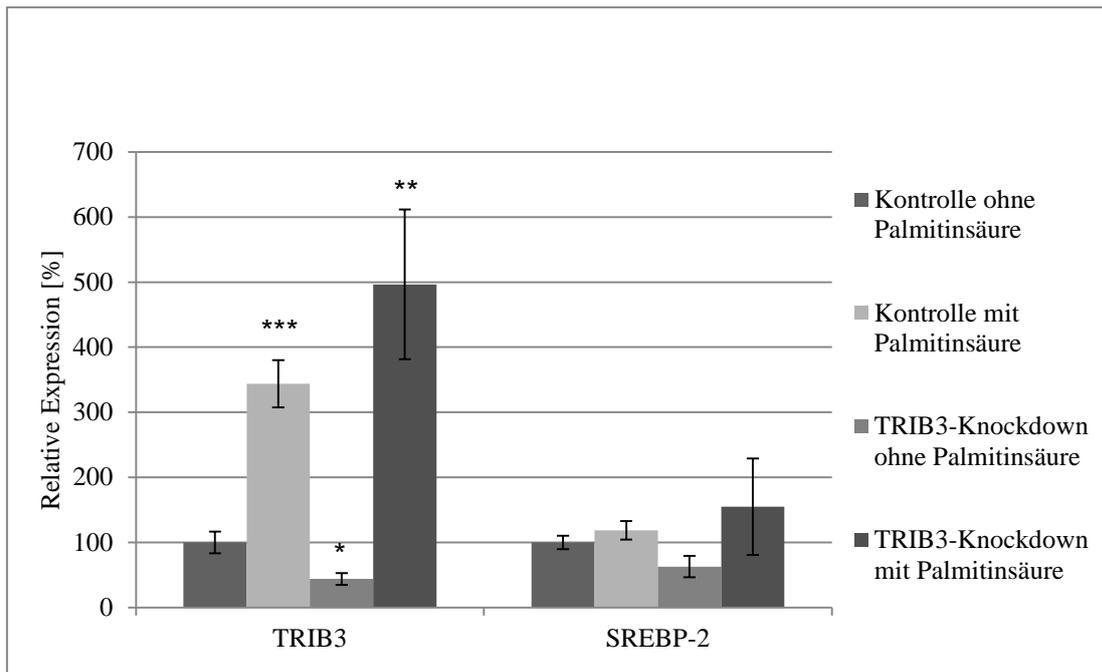
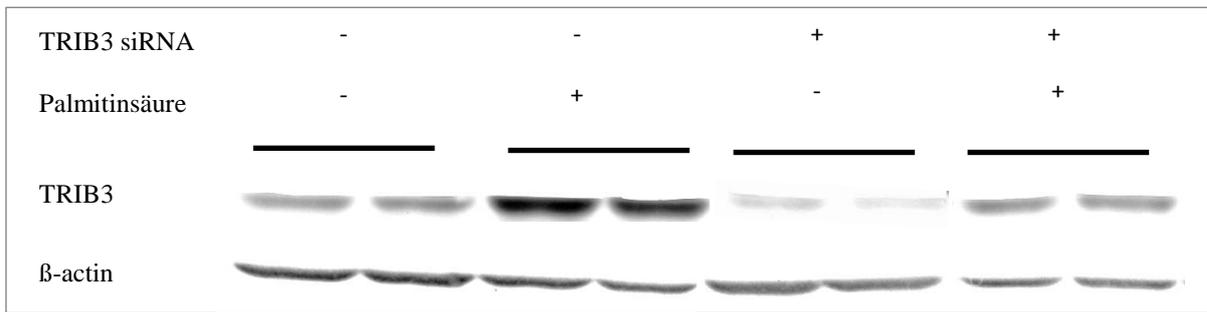


Abb. 13: Einfluss eines TRIB3-Knockdowns in insulinresistenten Zellen auf SREBP-2

Die Zellen wurden zur Hälfte mit TRIB3 zur anderen Hälfte mit non silencing siRNA elektroporiert (133nm siRNA pro 12-well). Je 1 Million Zellen wurden in 12-Wells ausgesät, über Nacht in Standardmedium, für 24 Stunden in FCS-freiem Medium und anschließend für 6 Stunden jeweils zur Hälfte in Medium mit 0,8mM Palmitinsäure beziehungsweise Kontrollmedium ohne Palmitinsäure kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels realtime-PCR der RNA-Gehalt an TRIB3 und SREBP-2 bestimmt. N=12. Die Werte sind Mittelwerte (M) ± Standardfehler (SE). * p-Wert < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

A



B

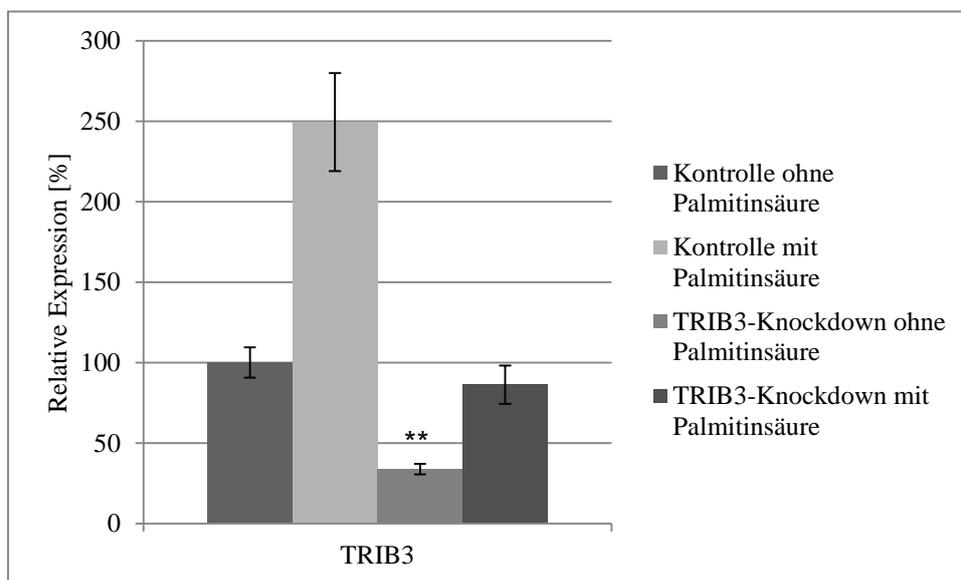


Abb. 14: Einfluss eines TRiB3-Knockdowns in insulinresistenten Zellen auf Proteinebene

Die Zellen wurden wie die Zellen des Versuchs der Abbildung 13 behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot der TRiB3- und β-Aktin-Proteingehalt bestimmt. Pro Bande wurden 25µg Protein beladen. Es erfolgte die Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten TRiB3 Erst- und einem 1:1000 verdünntem anti-rabbit Zweitantikörper. Die Detektion erfolgte nach standardisiertem Vorgehen, wie unter Material und Methoden beschrieben. A: Western Blot Analyse N=2. B: Semiquantitative Auswertung des Western Blots. N=4. Die Werte sind Mittelwerte (M) ± Standardfehler (SE). *p-Wert < 0.05; **p<0.01.

Bei diesem Versuchsaufbau wurden keine weiteren Gene, die an der Cholesterinhomöostase beteiligt sind gemessen, da Western Blot und realtime-PCR differente Ergebnisse gezeigt hatten.

3.4 TRIB3-Überexpression

Es konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von TRIB3 durch Palmitinsäure zu einem Anstieg von SREBP-2 führt. Um nun zu überprüfen, ob dieser Anstieg auf den hohen TRIB3-Spiegel oder die Palmitinsäure zurückzuführen ist, soll im Folgenden eine Überexpression von TRIB3 mittels eines Plasmids durchgeführt werden. Somit kann der Einfluss eines hohen TRIB3 Spiegels auf SREBP-2 unabhängig von Palmitinsäure beurteilt werden.

3.4.1 Überexpression von TRIB3 mittels Einbringung eines Plasmids

Die Etablierung der Überexpression von TRIB3 in HepG2 Zellen wurde von Frau C. Munker durchgeführt. Für die ausführliche Versuchsbeschreibung und Diagramme möchte ich auf ihre Arbeit „Einfluss der TRIB3-Expression auf die Insulinsensitivität von HepG2 Zellen“ verweisen. Kurz zusammengefasst wurde ein pCMV Sport 6 Vektor hergestellt und anschließend durch chemische Transfektion mittels X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent in die Zellen eingebracht. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden das Verhältnis von TRIB3-Plasmid-DNA zu Transfektionsreagenz, sowie das Zeitintervall zwischen Transfektion und Ernten der Zellen variiert.

Es ergab sich eine stabile Überexpression von TRIB3 auf 217% bei einem Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz von 1 zu 2.

Die Expression von TRIB3 stieg im Zeitverlauf auf RNA- und Protein-Ebene kontinuierlich und signifikant an, so dass nach 72 Stunden eine TRIB3-Expression von 6714% auf RNA-Ebene und von 646% auf Protein-Ebene zu verzeichnen war.

3.4.2 Der Einfluss einer Überexpression von TRIB3 auf SREBP-2

Um zu kontrollieren, ob eine Überexpression von TRIB3 einen Einfluss auf den SREBP-2 Spiegel hat, wurde in TRIB3 überexprimierenden Zellen der SREBP-2 RNA-Gehalt bestimmt.

Hierbei ergab sich bei TRIB3-Überexpression keine signifikante Veränderung von SREBP-2. Es zeigte sich ein Anstieg von SREBP-2 auf 190% nach 48 Stunden, allerdings war zeitgleich auch ein Anstieg der Kontrolle auf 204% zu verzeichnen (Abb.15).

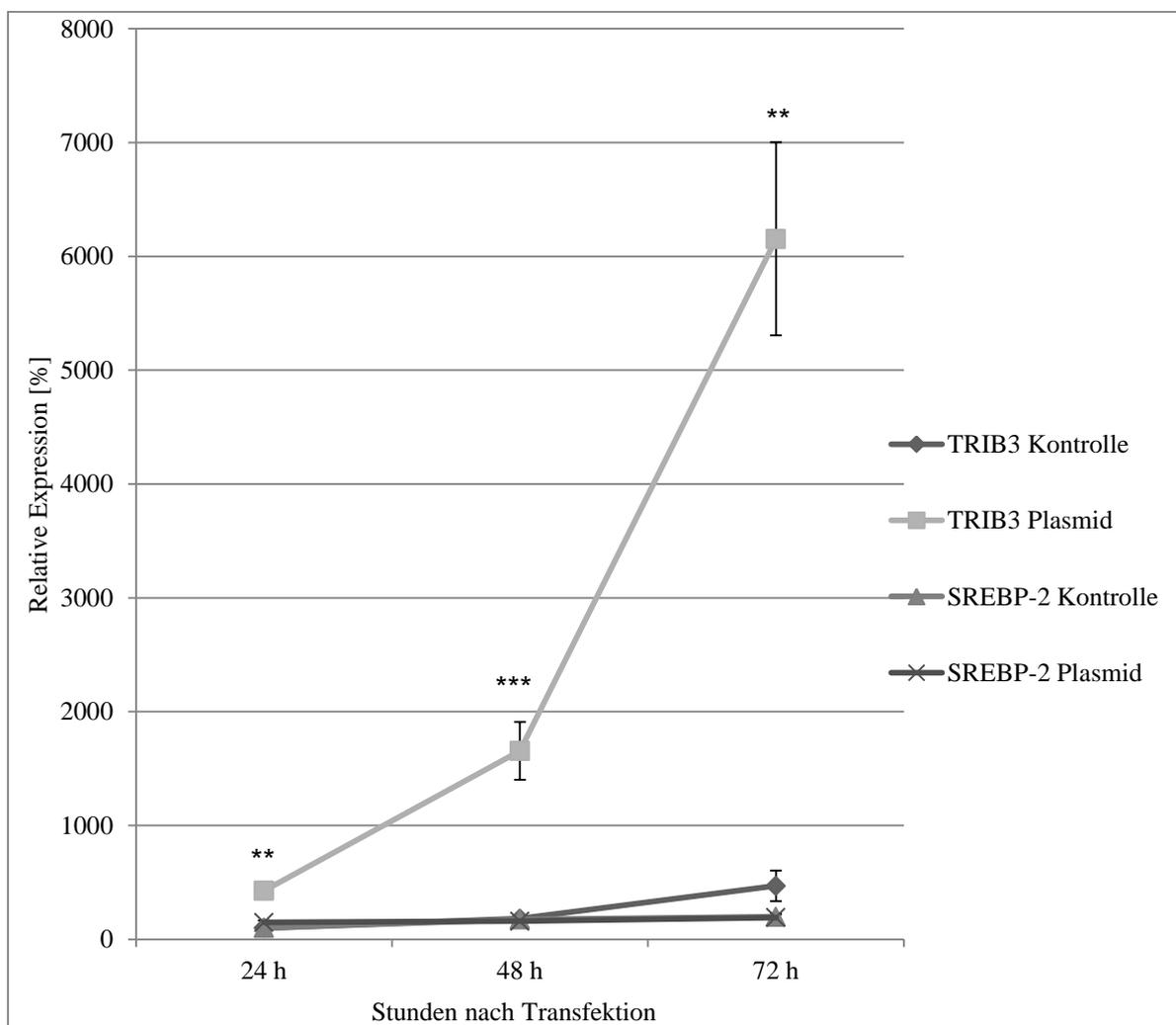


Abb. 15: Einfluss einer TRIB3-Überexpression auf SREBP-2

Je 2,6 Millionen Zellen wurden in 6-Wellns ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden sie mit dem TRIB3 Vektor transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Die Kontrollen wurden mit einem Leervektor transfiziert. Anschließend wurde der RNA-Gehalt an TRIB3 und

*SREBP-2 mittels realtime-PCR bestimmt. Die Werte wurden auf die 24 Stunden-Kontrolle bezogen. N=8. Die Werte sind Mittelwerte (M) \pm Standardfehler (SE). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.*

Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass nicht TRIB3 für die Veränderungen der Expression von SREBP-2 unter Stimulation mit Palmitinsäure verantwortlich war. Somit scheint es sich bei dieser Induktion am ehesten um einen unspezifischen Effekt infolge des Stresses durch Palmitinsäure zu handeln, möglicherweise lässt sich SREBP-2 aber auch durch ER-Stress im Allgemeinen induzieren. Insofern fände sich dann häufig eine Ko-Expression von TRIB3 und SREBP-2 ohne dass jedoch SREBP-2 von TRIB3 direkt induziert worden wäre.

4 Diskussion

Eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Senkung des kardiovaskulären Risikos bei Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 ist ein besseres Verständnis der Insulinresistenz und der diabetischen Dyslipidämie. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von TRIB3, einem Mediator der Insulinresistenz, auf SREBP-2, einen zentralen Regulator des Cholesterinstoffwechsels, untersucht.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Ratten zu einem Anstieg von SREBP-2 und HDL führt und somit die diabetische Dyslipidämie positiv beeinflusst.[15] Nach Etablierung eines stabilen TRIB3 Knockdowns in der humanen Leberzelllinie HepG2, konnten wir diese Ergebnisse im insulinsensitiven Zellmodell bestätigen. Ein 60%iger TRIB3 Knockdown führte zu einem signifikanten Anstieg der SREBP-2 mRNA auf 178%. Die Interaktion von TRIB3 und SREBP-2 könnte hierbei über AKT ablaufen, da sowohl TRIB3[19, 23, 80] als auch SREBP-2[66, 81, 82] mit AKT interagieren. Du et al belegen, dass ein TRIB3 Knockdown mit einer verstärkten Aktivierung von AKT einhergeht.[19] Auf der anderen Seite führt AKT zu einer Aktivierung von SREBP-2.[66, 82] In unserem Modell könnte der TRIB3 Knockdown zu einer verstärkten Aktivierung von AKT und in der Folge zu einer gesteigerten Expression von SREBP-2 geführt haben.

Darüber hinaus konnten Du et al zeigen, dass eine Hemmung von AKT zu einer verminderten Aktivierung der SREBP-2 Zielgene LDL Rezeptor und HMG CoA Reduktase führt.[81] Im Gegensatz zu Du et al konnten wir jedoch trotz Induktion von SREBP-2 keinen Einfluss auf die HMG CoA Reduktase feststellen. Die differierenden Ergebnisse sind vermutlich auf methodische Unterschiede zurückzuführen. Du et al führten eine Hemmung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch und untersuchten deren Einfluss auf SREBP-2 und seine Zielgene. Somit wurde primär nicht AKT, sondern PI3K beeinflusst. Zudem handelt es sich um eine Hemmung des Signalweges, während wir eine Aktivierung etablierten.[81]

Im Gegensatz dazu konnten Porstmann et al feststellen, dass vorwiegend SREBP-1, nicht aber SREBP-2, durch AKT beeinflusst wird.[83] Eine AKT Aktivierung führt zu

keiner Änderung der SREBP-2 Expression und eine SREBP-2 Hemmung verringert die AKT-abhängigen Regulation der Gene FAS, HMG CoA Synthase und HMG CoA Reduktase kaum. Eine SREBP-1 Hemmung hingegen blockiert die AKT-abhängige Regulation dieser Gene fast komplett.[83] Um dieser These weiter nachzugehen untersuchten wir im nächsten Schritt den Einfluss eines TRIB3 Knockdowns auf SREBP-1c.

SREBP-1c wird im Gegensatz zu SREBP-2 nicht über den Cholesteringehalt der Zelle, sondern vorwiegend über Insulin und LXR α aktiviert. Insulin führt über AKT zu einem Anstieg von SREBP-1c, wodurch die Fettsäuresynthese stimuliert wird.[64, 65] Unsere Ergebnisse zeigten, dass ein TRIB3 Knockdown zu einer verstärkten SREBP-1c Expression führt. He et al belegten, dass ein TRIB3 Knockdown in FGC-4 Zellen zu einer vermehrten Phosphorylierung von AKT und einem erhöhten nSREBP-1 Spiegel führt, während ein erhöhter TRIB3 Spiegel im Lebergewebe von Ratten eine Verminderung von pAKT und nSREBP-1 bewirkt.[84] Dies bestärkt die Hypothese, dass ein TRIB3 Knockdown über AKT Einfluss auf SREBP-1c hat, während dieser Einfluss auf SREBP-2 ungewiss ist.

Im nächsten Schritt sollte SREBP-2 auf Proteinebene untersucht werden. Ein Anstieg vorwiegend der Vorläufer- oder der reifen SREBP-2 Form lässt Rückschlüsse auf die Art der Aktivierung von SREBP-2 zu. Zum Nachweis mittels Western Blot wurden 3 verschiedene SREBP-2 Antikörper eingesetzt, die an verschiedenen Stellen des SREBP-2 Proteins binden. Trotz Variation der Lösungsmedien der Antikörper, der Blockmethoden der Membran, der Antikörper-Inkubationszeiten und der Entwicklungszeiten in der Dunkelkammer konnten wir in HepG2 Zellen keine eindeutige SREBP-2 Bande erkennen. Es zeigten sich sowohl in unbehandelten, als auch in TRIB3 Knockout HepG2 Zellen multiple unspezifische Banden. Die Funktionsfähigkeit der Antikörper wurde durch Einsatz eines LNCaP-Zelllysates als Positivkontrolle bestätigt. Somit ist es in unserem Zellmodell nicht möglich SREBP-2 auf Proteinebene eindeutig nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Ergebnisse die These stützen, dass ein TRIB3 Knockdown in insulinempfindlichen Zellen zu einer verstärkten Aktivierung von SREBP-2 und SREBP-1c führt. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass ein TRIB3 Knockdown

in insulinresistenten Ratten zu einem Anstieg von SREBP-2 und HDL führt.[15] Folglich ist es von entscheidender Bedeutung den Einfluss von TRIB3 auf SREBP-2 nicht nur in insulinsensitiven, sondern vielmehr auch in insulinresistenten Zellen zu untersuchen, da zelluläre Signalwege unter diabetischer Stoffwechsellage teilweise anders reguliert werden als unter physiologischen Bedingungen.

Hierfür wurde in HepG2 Zellen durch Inkubation mit der freien Fettsäure Palmitinsäure eine Insulinresistenz induziert. Ein erhöhter Plasmaspiegel an freien Fettsäuren führt zu einer intrazellulären Anreicherung von Ceramid oder Diacylglyceriden. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), einem Abbau von IRS-1 und einer verminderten Phosphorylierung von PI3K, AKT und seinen Zielgenen, was eine Induktion einer Insulinresistenz darstellt.[85-87]

Wir konnten zeigen, dass eine Inkubation der Zellen mit Palmitinsäure zu einer Induktion von TRIB3 führt. Zudem zeigten wir, dass die Palmitinsäureinkubation zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT und somit einer Insulinresistenz beiträgt. (vgl. „Einfluss der TRIB3-Expression auf die Insulinsensitivität von HepG2 Zellen“ von C. Münker) Dies bestätigt mehrere Arbeiten, die einen Anstieg von TRIB3 bei Vorliegen einer Insulinresistenz belegen.[19, 23, 31, 35] Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss der Insulinresistenz und des TRIB3 Anstiegs auf SREBP-2. Es kam zu einem Anstieg von SREBP-2 auf fast 300%. Geht man davon aus, dass TRIB3 SREBP-2 über AKT beeinflusst, so müsste die TRIB3 Induktion zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT und in der Folge zu einer Suppression von SREBP-2 führen. Unsere Ergebnisse belegten zwar die verminderte Phosphorylierung von AKT, diese führte jedoch nicht zu einer Suppression von SREBP-2. Es stellte sich die Frage, welche Einflüsse zur SREBP-2 Induktion bei Inkubation der Zellen mit Palmitinsäure beitrugen.

In unserem Modell wurde die Insulinresistenz durch Inkubation der Zellen mit Palmitinsäure induziert. Mechanistisch wird angenommen, dass freie Fettsäuren Insulinresistenz über ER-Stress auslösen.[46, 78, 88, 89] ER-Stress führt über eine Aktivierung von JNK und eine vermehrte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin-307 zur Insulinresistenz.[89] Dieser ER-Stress könnte eine Erklärung für den Anstieg von SREBP-2 sein. In verschiedenen Zell[90]- und Tiermodellen[89] konnte gezeigt

werden, dass ER-Stress SREBP-2 induziert. Darüber hinaus konnten Wang et al zeigen, dass eine Inkubation von L-02 Leberzellen mit Palmitinsäure zu einer vermehrten Expression von SREBP-2 und den Zielgenen HMG CoA Reduktase und LDL Rezeptor führt.[91] Um diesen Ansatz näher zu untersuchen, haben wir den Expressionsgrad des ER-Stressmarkers CHOP gemessen. Es zeigte sich eine Induktion von CHOP nach Inkubation der Zellen mit Palmitinsäure auf circa 200%. (vgl. „Einfluss der TRIB3-Expression auf die Insulinsensitivität von HepG2 Zellen“ von C. Münker) Dieses Ergebnis belegte, dass in unserem Modell ER-Stress entstand. Zudem verfestigte es die Hypothese, dass SREBP-2 in diesem Versuchsaufbau vorwiegend durch ER-Stress und unabhängig von AKT reguliert wurde.

Anschließend haben wir den Einfluss der Palmitinsäureinkubation auf SREBP-1c untersucht. Im Gegensatz zu SREBP-2 war die Expression von SREBP-1c bei Inkubation der HepG2 Zellen mit Palmitinsäure vermindert. Dies steht im Einklang mit einer Arbeit von He et al, die zeigen konnte, dass ER-Stress in Mäuselebern zu einem Anstieg von TRIB3 und in der Folge zu einer Reduktion von SREBP-1c führt.[92] Man könnte vermuten, dass die Interaktion von TRIB3 und SREBP-1c über AKT abläuft. Durch die Insulinresistenz kommt es zu einer geringeren Phosphorylierung von AKT und in der Folge zu einer geringeren Aktivierung von SREBP-1c.

Im Gegensatz dazu legten Krycer et al dar, dass bei Typ 2 Diabetikern trotz Insulinresistenz ein erhöhter SREBP-1c Spiegel vorliegt[82]. Auch Ferre et al und Kammoun et al zeigten, dass ER-Stress zu einem Anstieg von SREBP-1c führt.[89, 93] Der Einfluss von ER-Stress auf SREBP-1c ist noch nicht abschließend geklärt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass SREBP-1c in unserem Modell vorwiegend durch AKT und unabhängig von Palmitinsäure reguliert wurde, da die Inkubation der Zellen mit Palmitinsäure zu einem Abfall und keiner Induktion von SREBP-1c geführt hat.

Um dennoch zu kontrollieren, ob neben ER-Stress auch TRIB3 Einfluss auf SREBP-2 hat, wurde im Folgenden ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Zellen durchgeführt. Allerdings konnte weder auf mRNA, noch auf Proteinebene ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten HepG2 Zellen etabliert werden. Auf mRNA Ebene führt die Kombination aus TRIB3 Knockdown mittels Elektroporation und Palmitinsäureinkubation sogar zu einem starken Anstieg von TRIB3 auf fast 500%. Im

Gegensatz dazu zeigten die gleichen Zellen auf Proteinebene ein vergleichsweise geringes TRIB3 Expressionsniveau von ungefähr 90%. Es ist möglich, dass die Kombination aus Elektroporation und Palmitinsäureinkubation zu einer Störung der Signaltransduktion oder zu einer Störung der Messmethode führte. In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob eine chemische Transfektion der siRNA einen signifikanten TRIB3 Knockdown bei Palmitinsäureinkubation erzielen kann.

Zusammenfassend kann an diese Stelle geschlussfolgert werden, dass die Inkubation der HepG2 Zellen mit Palmitinsäure zu einer Induktion von TRIB3 und SREBP-2, sowie einer Insulinresistenz geführt hat. Palmitinsäure scheint die Insulinresistenz über ER-Stress auszulösen. Dieser ER-Stress hat maßgeblich zur Beeinflussung von SREBP-2 beigetragen. Die Induktion einer Insulinresistenz über ER-Stress ist kein gutes Modell für Diabetes mellitus Typ2. Deshalb sollte im nächsten Schritt der Einfluss von TRIB3 auf SREBP-2 unabhängig von ER-Stress untersucht werden.

Hierfür haben wir durch Einbringung eines Plasmides in HepG2 Zellen TRIB3 überexprimiert, um so den Einfluss von TRIB3 auf SREBP-2 unabhängig von Palmitinsäure untersuchen zu können. In verschiedenen Zell- und Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TRIB3 zu Insulinresistenz und Diabetes mellitus beiträgt.[19, 31, 77, 80] In unseren Versuchen kam es durch eine TRIB3 Überexpression nach Insulinstimulation zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT an Serin-473. Die HepG2 Zellen wiesen somit eine geringere Insulinempfindlichkeit auf. (vgl. „Einfluss der TRIB3-Expression auf die Insulinsensitivität von HepG2 Zellen“ von C. Munker) Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss einer TRIB3 Überexpression auf SREBP-2. Hierbei zeigte sich keine signifikante Veränderung von SREBP-2. Zusammenfassend kann man sagen, dass der SREBP-2 Anstieg in HepG2 Zellen, die mit Palmitinsäure inkubiert worden waren, vorwiegend auf Palmitinsäure und ER-Stress zurückzuführen ist. Eine direkte Interaktion von TRIB3 und SREBP-2 erscheint in diesem Modell unwahrscheinlich.

Weismann et al zeigten, dass ein TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Ratten nicht nur zu einem Anstieg von SREBP-2, sondern auch von HDL geführt hat.[15] Als weitere Möglichkeit der HDL-Erhöhung haben wir deshalb Marker der Cholesterin-Synthese, sowie des Cholesterin-Importes und -Exportes untersucht. Während sich bei

einem TRIB3 Knockdown in insulinempfindlichen Zellen keine Unterschiede bei ABCA-1, LXR α und HMG-CoA Reduktase zeigten, fand sich ein signifikanter Anstieg von SR-B1 und Apo-A1.

SR-B1 ist ein Membranrezeptor von Hepatozyten, der HDL sowohl in die Leber aufnehmen, als auch abgeben kann. Eine SR-B1 Überexpression führt zu einer vermehrten Aufnahme von HDL in die Leber und zu einer gesteigerten Gallensäurebildung.[94] Dies führt zu einer Verminderung des Plasma HDL-Spiegels, aber dennoch zu einer geringeren Atheroskleroserate, da der reverse Cholesterintransport und somit die Ausscheidung von Cholesterin aus dem Körper gefördert wird.[94] Somit könnte ein hoher SR-B1 Spiegel zu einer geringeren Atheroskleroserate beitragen. Wir konnten zeigen, dass ein TRIB3 Knockdown zu einem signifikanten Anstieg von SR-B1 auf circa 150% führt.

Shetty et al belegen, dass bei Vorliegen einer Insulinresistenz die posttranslationale Aktivierung von SR-B1 und somit der reverse Cholesterin Transport gehemmt wird.[95] Folglich sollte eine Verbesserung der Insulinempfindlichkeit, wie in unserem Fall durch einen TRIB3 Knockdown, zu einer gesteigerten Aktivierung von SR-B1 führen.

Unabhängig von Insulinresistenz könnte TRIB3 SR-B1 auch über PPAR γ regulieren. Ahmed et al belegt, dass PPAR γ die Aktivität von SR-B1 erhöht.[94] TRIB3 wiederum hemmt PPAR γ . [41] Ein TRIB3 Knockdown könnte den PPAR γ und in der Folge auch den SR-B1 Gehalt der Zellen erhöhen.

Die Beeinflussung von SR-B1 durch einen TRIB3 Knockdown könnte somit zu einer Verbesserung der Atherosklerose beitragen. Dennoch erklärt sie nicht den Anstieg von HDL, der bei einem TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Ratten beobachtet wurde.

Unsere Ergebnisse belegen jedoch auch, dass ein TRIB3 Knockdown zu einem erhöhten Apo-A1 mRNA Gehalt der HepG2 Zellen führt. Apo-A1 macht mit ca. 70 % den Hauptbestandteil des HDL aus. Apo-A1 bindet an ABCA1 oder SR-B1 und bildet hierdurch einen Tunnel für den Cholesterin-Efflux.[48] Eine Apo-A1 Überexpression in Mäusen führte zu einem Anstieg von HDL und einer Reduktion atherosklerotischer Plaques. Einige neue therapeutische Ansätze versuchen über einen Anstieg von Apo-A1 den reversen Cholesterintransport zu erhöhen und so das atherosklerotische Risiko zu senken.[96] Vor allem Apo-A1 haltige Partikel und Apo-A1 mimetische Peptide

könnten in Zukunft eine große Rolle bei der Therapie der Atherosklerose spielen.[97] Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein TRIB3 Knockdown zu einem signifikanten Anstieg von Apo-A1 auf circa 200% führt. Folglich könnte Apo-A1 den reversen Cholesterintransport erhöhen und zum HDL Anstieg, der bei TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Ratten beobachtet wurde, beigetragen haben.

Ein TRIB3 Knockdown stellt einen neuen interessanten Ansatz zur Beeinflussung der Insulinresistenz und zur Reduktion der diabetischen Dyslipidämie dar. Die Interaktion von TRIB3, SREBP-2, SR-B1 und Apo-A1 und deren Einfluss auf die diabetische Dyslipidämie und die Atherosklerose sollte weiter erforscht werden. Neben der Untersuchung des Zusammenhangs in Leberzellen, sollten die Interaktionen auch in Makrophagen betrachtet werden. Makrophagen sind wesentlich an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt und ein TRIB3 Knockdown in diesen Zellen könnte einen entscheidenden Einfluss auf den Plasma HDL Spiegel und die diabetische Dyslipidämie haben.

5 Zusammenfassung

Die Pseudoproteinkinase TRIB3 wurde als ein wichtiger Mediator der Insulinresistenz bei Typ 2 Diabetikern erkannt. Ein TRIB3 Knockdown führte in verschiedenen Zell- und Tiermodellen zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität. Zudem wurde in einem Tierexperiment mit insulinresistenten Ratten gesehen, dass ein TRIB3 Knockdown zu einem Anstieg von SREBP-2 und HDL und somit zu einer Verbesserung der diabetischen Dyslipidämie führt.

In HepG2 Zellen wurde der Einfluss von TRIB3 auf die SREBP-2 Expression und weitere zentrale Regulatoren des reversen Cholesterintransportes untersucht.

Wir konnten zeigen, dass SREBP-2 durch einen TRIB3 Knockdown in insulinresistenten Zellen induziert wird. Passend hierzu zeigte sich auch eine Modifikation von SREBP-1c, welches ebenfalls durch einen TRIB3 Knockdown induziert wird. Als weitere Möglichkeit der Beeinflussung der diabetischen Dyslipidämie haben wir Marker der Cholesterinsynthese, sowie des Cholesterin-Importes und -Exportes untersucht. Hierbei zeigte sich infolge eines TRIB3 Knockdowns ein Anstieg von SR-B1 und Apo-A1. Die Induktion von SR-B1 und Apo-A1 könnte über eine Förderung des reversen Cholesterintransportes und über eine vermehrte Ausscheidung von Cholesterin aus dem Körper zu einer Verbesserung der diabetischen Dyslipidämie und zu einer Reduktion der Atherosklerose beitragen.

Zur Induktion einer Insulinresistenz wurden HepG2 Zellen mit Palmitinsäure inkubiert. Hier zeigte sich sowohl ein Anstieg von TRIB3 wie auch von SREBP-2. Hingegen hatte eine alleinige Überexpression von TRIB3 keinen signifikanten Einfluss auf die SREBP-2 Expression.

Es konnte gezeigt werden, dass Palmitinsäure eine Insulinresistenz vor allem über ER-Stress induziert und in diesem Modell somit ein anderer molekularer Mechanismus der Insulinresistenz zugrunde liegt, als für die alimentäre Insulinresistenz postuliert wird. Die Inkubation mit Palmitinsäure führt zu einer Induktion von TRIB3, welche mit siRNA nicht antagonisiert werden konnte. Methodisch war es somit nicht möglich einen stabilen TRIB3 Knockdown in insulinresistenten HepG2 Zellen nach Palmitinsäure-

Inkubation zu generieren, so dass eine Aussage über den Einfluss von TRIB3 auf die SREBP-2 Expression in diesem Modell nicht möglich ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein TRIB3 Knockdown in insulinsensiblen Zellen zu einer Induktion von SREBP-2, SREBP-1c, SR-B1 und Apo-A1 führt und somit Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel haben könnte. In den eingesetzten in vitro Modellen für eine Insulinresistenz haben wir jedoch keinen Hinweis auf einen günstigen Effekt eines TRIB3 Knockdowns finden können.

6 Literaturverzeichnis

1. WHO/IDF: Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. *report of a WHO/IDF consultation, Geneva: WHO press* 2006.
2. Kengne AP, Turnbull F, MacMahon S: The Framingham Study, diabetes mellitus and cardiovascular disease: turning back the clock. *Progress in cardiovascular diseases* 2010, 53(1):45-51.
3. Najarian RM, Sullivan LM, Kannel WB, Wilson PW, D'Agostino RB, Wolf PA: Metabolic syndrome compared with type 2 diabetes mellitus as a risk factor for stroke: the Framingham Offspring Study. *Archives of internal medicine* 2006, 166(1):106-111.
4. Liebl A, Spannheimer A, Reitberger U, Gortz A: [Costs of long-term complications in type 2 diabetes patients in Germany. Results of the CODE-2 Study]. *Medizinische Klinik (Munich, Germany : 1983)* 2002, 97(12):713-719.
5. Mooradian AD: Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* 2009, 5(3):150-159.
6. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV: Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet* 2006, 368(9529):29-36.
7. Duckworth W, Abaira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R *et al*: Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009, 360(2):129-139.
8. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH, Jr. *et al*: Effects of

- intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008, 358(24):2545-2559.
9. Laakso M, Cederberg H: Glucose control in diabetes: which target level to aim for? *J Intern Med* 2012, 272(1):1-12.
 10. Cushman WC, Evans GW, Byington RP, Goff DC, Jr., Grimm RH, Jr., Cutler JA, Simons-Morton DG, Basile JN, Corson MA, Probstfield JL *et al*: Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2010, 362(17):1575-1585.
 11. Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR, 3rd, Leiter LA, Linz P, Friedewald WT, Buse JB, Gerstein HC, Probstfield J *et al*: Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2010, 362(17):1563-1574.
 12. Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R: Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 2007, 370(9602):1829-1839.
 13. Rader DJ: Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006, 116(12):3090-3100.
 14. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, Chaitman BR, Holme IM, Kallend D, Leiter LA *et al*: Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012, 367(22):2089-2099.
 15. 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.

16. Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR: Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* 2006, 16(9):443-452.
17. Ord D, Ord T: Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 330(1):210-218.
18. 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.
19. 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.
20. Bezy O, Vernochet C, Gesta S, Farmer SR, Kahn CR: TRB3 blocks adipocyte differentiation through the inhibition of C/EBPbeta transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 2007, 27(19):6818-6831.
21. 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.
22. 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. *Nat Med* 2004, 10(5):530-534.
23. Liu WJ, Ma LQ, Liu WH, Zhou W, Zhang KQ, Zou CG: Inhibition of hepatic glycogen synthesis by hyperhomocysteinemia mediated by TRB3. *Am J Pathol* 2011, 178(4):1489-1499.
24. Du K, Ding J: Insulin regulates TRB3 and other stress-responsive gene expression through induction of C/EBPbeta. *Mol Endocrinol* 2009, 23(4):475-485.
25. Schwarzer R, Dames S, Tondera D, Klippel A, Kaufmann J: TRB3 is a PI 3-kinase dependent indicator for nutrient starvation. *Cell Signal* 2006, 18(6):899-909.

26. Carraro V, Maurin AC, Lambert-Langlais S, Averous J, Chaveroux C, Parry L, Jousse C, Ord D, Ord T, Fafournoux P *et al*: Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2alpha/ATF4 pathway. *PLoS One* 2010, 5(12):e15716.
27. Keller SR, Lienhard GE: Insulin signalling: the role of insulin receptor substrate 1. *Trends Cell Biol* 1994, 4(4):115-119.
28. Saltiel AR: Putting the brakes on insulin signaling. *N Engl J Med* 2003, 349(26):2560-2562.
29. Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001, 414(6865):799-806.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Prudente S, Scarpelli D, Chandalia M, Zhang YY, Morini E, Del Guerra S, Perticone F, Li R, Powers C, Andreozzi F *et al*: The TRIB3 Q84R polymorphism and risk of early-onset type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(1):190-196.
34. Liew CW, Bochenski J, Kawamori D, Hu J, Leech CA, Wanic K, Malecki M, Warram JH, Qi L, Krolewski AS *et al*: The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse beta cells. *J Clin Invest* 2010, 120(8):2876-2888.

35. Ti Y, Xie GL, Wang ZH, Bi XL, Ding WY, Wang J, Jiang GH, Bu PL, Zhang Y, Zhong M *et al*: TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model. *Diabetes* 2011, 60(11):2963-2974.
36. Wang ZH, Shang YY, Zhang S, Zhong M, Wang XP, Deng JT, Pan J, Zhang Y, Zhang W: Silence of TRB3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in diabetic ApoE^{-/-}/LDL receptor^{-/-} mice. *Diabetes* 2012, 61(2):463-473.
37. Marinho R, Ropelle E, Cintra D, De Souza C, Da Silva A, Bertoli F, Colantonio E, D'Almeida V, Pauli J: Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol* 2011.
38. Iynedjian PB: Lack of evidence for a role of TRB3/NIPK as an inhibitor of PKB-mediated insulin signalling in primary hepatocytes. *Biochem J* 2005, 386(Pt 1):113-118.
39. Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, Sreaton 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.
40. Neels JG, Olefsky JM: Cell signaling. A new way to burn fat. *Science* 2006, 312(5781):1756-1758.
41. 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.
42. 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.
43. Yacoub Wasef SZ, Robinson KA, Berkaw MN, Buse MG: Glucose, dexamethasone, and the unfolded protein response regulate TRB3 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 291(6):E1274-1280.

44. 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.
45. Su N, Kilberg MS: C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* 2008, 283(50):35106-35117.
46. Cunard R, Sharma K: The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011, 300(5):F1054-1061.
47. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M: Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996, 271(5248):518-520.
48. Luo DX, Cao DL, Xiong Y, Peng XH, Liao DF: A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells. *Acta Pharmacol Sin* 2010, 31(10):1243-1257.
49. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J: Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007, 61:736-759.
50. Sato R: Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys* 2010, 501(2):177-181.
51. Rader DJ: Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. *Am J Cardiol* 2003, 92(4A):42J-49J.
52. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS: SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 1993, 75(1):187-197.
53. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X: SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(24):11603-11607.

54. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F: SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004, 86(11):839-848.
55. Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL: Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* 1997, 99(5):846-854.
56. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H: Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* 1998, 101(11):2331-2339.
57. Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS: Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 1996, 87(3):415-426.
58. Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL: Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem* 1997, 272(32):20213-20221.
59. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL: Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 1996, 85(7):1037-1046.
60. Brown MS, Goldstein JL: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997, 89(3):331-340.
61. Tamasawa N: [Disorder of cholesterol metabolism: regulation of intracellular cholesterol and membrane trafficking]. *Rinsho Byori* 2010, 58(12):1203-1210.

62. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A: Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1529(1-3):103-113.
63. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F: Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(22):12737-12742.
64. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS: Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(31):11245-11250.
65. Jeon TI, Osborne TF: SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2012, 23(2):65-72.
66. Luu W, Sharpe LJ, Stevenson J, Brown AJ: Akt acutely activates the cholesterologenic transcription factor SREBP-2. *Biochim Biophys Acta* 2011.
67. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Naar AM: MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010, 328(5985):1566-1569.
68. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Marusawa H, Iwanaga Y *et al*: MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(40):17321-17326.
69. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldan A: miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(27):12228-12232.
70. 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.

71. Rychahou PG, Jackson LN, Farrow BJ, Evers BM: RNA interference: mechanisms of action and therapeutic consideration. *Surgery* 2006, 140(5):719-725.
72. 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.
73. Desjardins PR, Conklin DS: Microvolume quantitation of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol* 2011, Appendix 3:3J.
74. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
75. Tan SC, Yiap BC: DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009, 2009:574398.
76. 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.
77. Jang YY, Kim NK, Kim MK, Lee HY, Kim SJ, Kim HS, Seo HY, Lee IK, Park KG: The Effect of Tribbles-Related Protein 3 on ER Stress-Suppressed Insulin Gene Expression in INS-1 Cells. *Korean Diabetes J* 2010, 34(5):312-319.
78. Lee JY, Cho HK, Kwon YH: Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism* 2010, 59(7):927-934.
79. Mei S, Ni HM, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, Copple BL, Ding WX: Differential roles of unsaturated and saturated Fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2011, 339(2):487-498.
80. 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.

81. Du X, Kristiana I, Wong J, Brown AJ: Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. *Molecular biology of the cell* 2006, 17(6):2735-2745.
82. Krycer JR, Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ: The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2010, 21(5):268-276.
83. Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A: PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* 2005, 24(43):6465-6481.
84. 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.
85. Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, Man Y, Wang S, Yang J, Li J: The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem* 2010, 285(39):29965-29973.
86. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J: Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004, 18(8):2024-2034.
87. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ *et al*: Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002, 277(52):50230-50236.
88. Cunha DA, Igoillo-Esteve M, Gurzov EN, Germano CM, Naamane N, Marhfour I, Fukaya M, Vanderwinden JM, Gysemans C, Mathieu C *et al*: Death Protein 5 and p53-Upregulated Modulator of Apoptosis Mediate the

- Endoplasmic Reticulum Stress-Mitochondrial Dialog Triggering Lipotoxic Rodent and Human beta-Cell Apoptosis. *Diabetes* 2012, 61(11):2763-2775.
89. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferre P, Foufelle F: GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 2009, 119(5):1201-1215.
90. Kaplowitz N, Ji C: Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, 21 Suppl 3:S7-9.
91. Wang XH, Tian Y, Guo ZJ, Fan ZP, Qiu de K, Zeng MD: Cholesterol metabolism and expression of its relevant genes in cultured steatotic hepatocytes. *J Dig Dis* 2009, 10(4):310-314.
92. 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. *Mol Endocrinol* 2007, 21(10):2541-2550.
93. Ferre P, Foufelle F: SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Hormone research* 2007, 68(2):72-82.
94. Ahmed RA, Murao K, Imachi H, Yu X, Li J, Wong NC, Ishida T: Human scavenger receptor class B type 1 is regulated by activators of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma in hepatocytes. *Endocrine* 2009, 35(2):233-242.
95. Shetty S, Eckhardt ER, Post SR, van der Westhuyzen DR: Phosphatidylinositol-3-kinase regulates scavenger receptor class B type I subcellular localization and selective lipid uptake in hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26(9):2125-2131.
96. Degoma EM, Rader DJ: Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nature reviews Cardiology* 2011, 8(5):266-277.
97. Smith JD: Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 2010, 11(9):989-996.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: TRIB3 Signalwege	3
Abb. 2: SREBP Signalweg	9
Abb. 3: Elektroporationsprotokoll.....	37
Abb. 4: TRIB3-Knockdown im Zeitverlauf	38
Abb. 5: TRIB3-Knockdown auf Proteinebene	39
Abb. 6: Einfluss eines TRIB3-Knockdown auf SREBP-2	40
Abb. 7: Positivkontrolle mit 3 verschiedenen SREBP-2 Antikörpern	41
Abb. 8: Einfluss eines TRIB3-Knockdowns	42
Abb. 9: Fettsäureinkubation im Zeitverlauf	43
Abb. 10: Einfluss von Palmitinsäure auf TRIB3	44
Abb. 11: Einfluss einer TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure auf SREBP-2	45
Abb. 12: Einfluss einer TRIB3-Induktion durch Palmitinsäure	46
Abb. 13: Einfluss eines TRIB3-Knockdowns in insulinresistenten Zellen auf SREBP-2	48
Abb. 14: Einfluss eines TRIB3-Knockdowns in insulinresistenten Zellen auf Proteinebene	49
Abb. 15: Einfluss einer TRIB3-Überexpression auf SREBP-2.....	51

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	13
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	15
Tabelle 3: TRIB3-siRNA Sequenz	18
Tabelle 4: Oligonukleotidsequenzen der realtime-PCR	23
Tabelle 5: Western Blot Antikörper	35

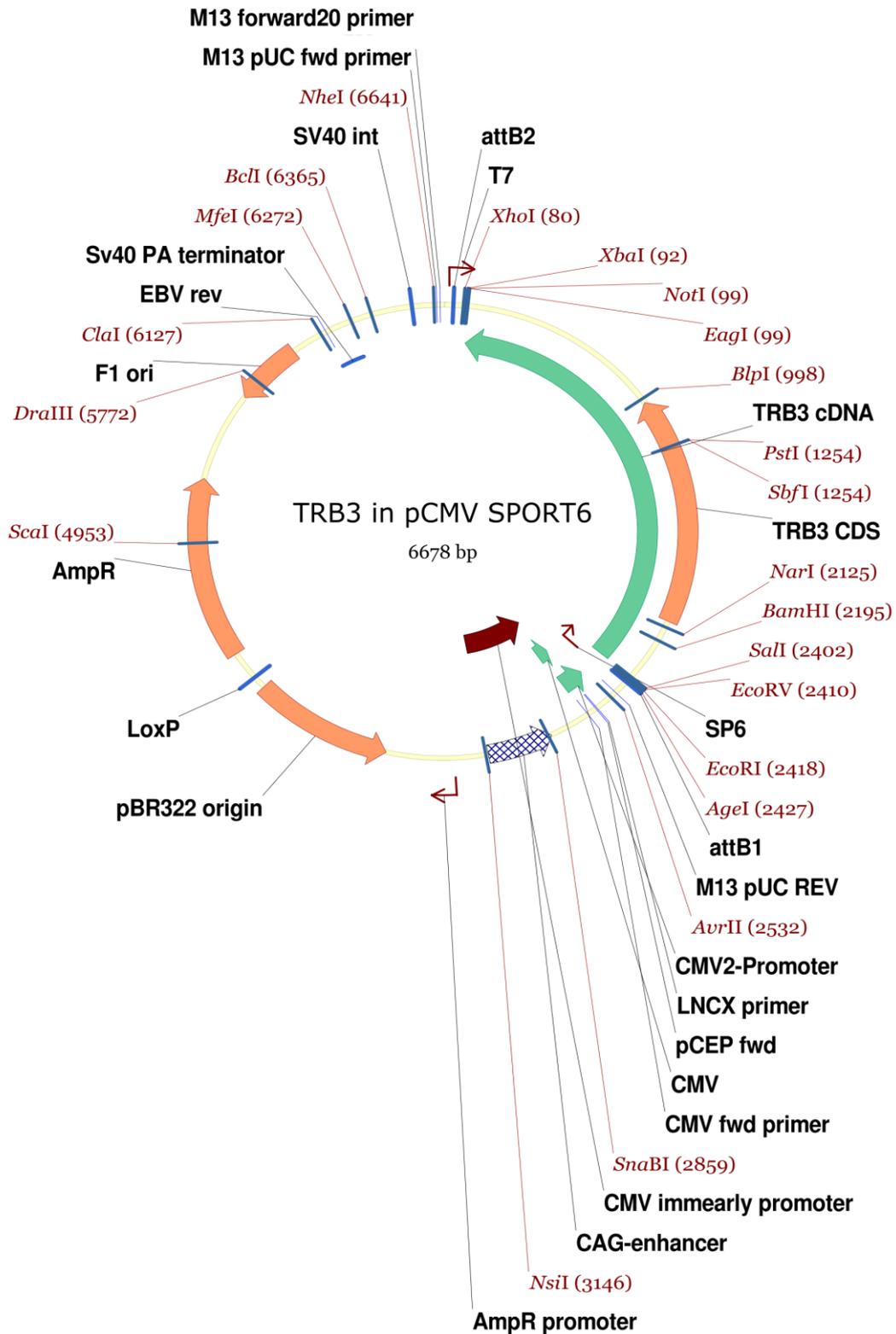
7.3 Abkürzungsverzeichnis

ApoA1	Apolipoprotein A-I
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACC	Acetyl-Coenzyme A Carboxylase
Ak	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
APO-A1	Apolipoprotein A1
APS	Amoniumpersulfat
ASNS	Asparagin Synthetase
ATF	Activating Transcription Factor
BCA	Bicinchoninsäure
bHLH-Zip	basic helix-loop-helix-leucine zipper
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding-Protein
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CHOP	cEBP homologous protein
d	Schichtdicke in cm
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAS	Fettsäuresynthase
FCS	fetal calf serum
FoxO1	Forkhead Box O1

G6Pase	Glucose 6 Phosphatase
GLUT4	Glucosetransporter Typ 4
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	High Density Lipoprotein
HMG CoA Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
hNIPK	neuronal cell death-inducible putative kinase
Igepal CA630	octylphenoxypolyethoxyethanol
Insig	Insulin induced Gene
IRE1 α	Inositol-Requiring Protein-1 α
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat 1
JNK	c-Jun N-terminalen Kinase
LB	lysogeny broth
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LNCaP	Androgen-sensitive humane Prostataadenokarzinom Zellen
LXR	Liver X Receptor
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
ORI	origin of replication
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PGC-1 α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Coactivator-1 α
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
realtime-PCR	realtime Polymerase Kettenreaktion
RIPA	radio immunoprecipitation assay
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
S1P	Site-1 Protease
S2P	Site-2 Protease

SCAP	SREBP-cleavage activating protein
SCD1	Stearyl-CoA Desaturase
SDS	sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	small interfering RNA
SR-BI	scavenger receptor class-B type I
SRE-1	Sterol Regulatory element 1
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polysorbat
UV	Ultraviolett
ϵ	wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient

7.4 Plasmid



Danksagung

Mit der Fertigstellung dieser Arbeit ist es an der Zeit einigen Personen meinen herzlichen Dank auszusprechen.

In erster Linie danke ich Dr. med. Dirk Weismann, der die Idee zu dieser Arbeit hatte und mich mit viel Energie tatkräftig bei schwierigen Fragestellungen unterstützt hat. Auch in ausweglos erscheinenden Situationen haben seine Kritik und vor allem seine zuversichtliche Einstellung mit immer neuen Ideen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht weniger zu danken gilt es Claudia Münker, mit der ich viel Zeit im Labor verbracht habe, wo wir uns gegenseitig auch in schwierigen Situationen gegenseitig immer wieder motiviert haben, mit der ich jedoch auch sehr viel Spaß und Freude an der Laborarbeit hatte.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bruno Allolio für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe tätig zu sein. Er hat es ermöglicht wissenschaftlich in einer nahezu familiären Umgebung zu arbeiten.

Ein großer Dank gilt den Mitarbeitern des Forschungslabors der Endokrinologie. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Matthias Kroiß und Dr. rer. nat. Britta Heinze für ihre unermüdliche Hilfe bei jeglichen Problemen und Fragestellungen während der Laborarbeit. Für die geduldige Einarbeitung in die unterschiedlichsten Labormethoden möchte ich mich bei Martina Zink, Heidi Lins, Melanie Beyer und Katharina Henzel bedanken. Ihrer Hilfe verdanke ich das Gelingen meiner experimentellen Arbeit.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwestern Anne, sowie Felix Ort. Sie haben mich während des Studiums und während der Dissertationsarbeit jederzeit liebevoll und tatkräftig unterstützt. Meinen Eltern sei die vorliegende Arbeit von ganzem Herzen gewidmet.