Aus der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck Direktor: Prof. Dr. Jürgen Steinhoff

Zirkadiane Rhythmen der Adipozytenfunktion

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck -aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von Julia Johanna Seemann aus Wismar Lübeck 2016

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster
- 2. Berichterstatter: Prof.Dr.med.Dr.med.vet. Ekkehard Vollmer

Tag der mündlichen Prüfung:09.01.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.01.2017

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Für meine Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Ał	okürzungs	verzeichnis	1
1	Einleitu	ng	3
	1.1 Die	zirkadiane Uhr	3
	1.1.1	Einführung in die zirkadiane Rhythmik	3
	1.1.2	Der anatomische Aufbau der zirkadianen Uhr	4
	1.1.3	Der molekulare Mechanismus der zirkadianen Uhr	4
	1.1.4	Zirkadiane Uhren in peripheren Geweben	6
	1.2 Me	tabolismus	7
	1.2.1	Die zirkadiane Uhr und Metabolismus	7
	1.3 Die	Fettzelle	8
	1.3.1	Die Fettgewebsarten und deren Funktionen	8
	1.3.2	Der Metabolismus der Fettzelle	9
	1.3.3	Adipokine	. 10
	1.3.4	Die zirkadiane Uhr der Fettzelle	. 13
	1.4 Fra	igestellung	. 14
2	Materia	lien und Methoden	.15
	2.1 Ve	rsuchsaufbau	. 15
	2.2 Tie	rversuche	. 16
	2.2.1	Tiere und Tierhaltung	. 16
	2.3 Mo	lekularbiologische und -genetische Methoden	. 17
	2.3.1	Kultivierung der Plasmide mit Hilfe von Escherichia coli	. 17
	2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)	. 18
	2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA (Midiprep)	. 18
	2.3.4	Photometerkontrolle	. 18
	2.3.5	Agarosegelelektrophorese	. 18
	2.3.6	Die Wirtszelllinie HEK293T	. 19
	2.3.7	Transfektion der Wirtszelle	. 20
	2.3.8	Ernten des Lentiviruses	. 20
	2.3.9	Transduktion von Bmal1-Luc- und Per2-Luc-Reportern	. 20
	2.3.10	RNA-Isolation	.21
	2.3.11	cDNA-Synthese	. 22
	2.3.12	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR (qPCR)	. 22
	2.4 Zel	Ikultur	. 24

	2.4	.1	Medien und Medienzusätze	24
	2.4	.2	Isolierung der Vorläufer- und reifen Adipozyten	25
	2.4	.3	Zellkultur der Vorläuferadipozyten	26
	2.4	.4	Splitten der konfluierenden Vorläuferadipozyten	27
	2.4	.5	Zellkultur der reifen Adipozyten	27
	2.4	.6	Isolierung des epididymalen, braunen und subkutanen Fettgewebes	28
	2.5	Au	fnahme von Rhythmen mit Hilfe des Luminometers	28
	2.6	Da	tenauswertung	29
3	Erg	ebn	isse	30
	31	Fn	dogene Rhythmen des epididymalen, subkutanen und braunen	
	0.1	Fe	traewebes	
	0.0			
	3.2	En	dogene Rhythmen von Vorlaufer- und reifen Fettzellen der	25
		ΡE	R2::LUC-Mause	35
	3.3	En	dogene Rhythmen von Vorläuferfettzellen der Wildtypen	39
	3.4	Ge	nexpressionsdaten von unterschiedlichen Fettgeweben der PER2::LUC-	
		Mä	use <i>in vitro</i>	43
	3.4	.1	Bestimmung von Referenzgenen	43
	3.4	.2	Uhrengenexpressionen des epididymalen Fettgewebes	45
	3.4	.3	Uhrengenexpressionen des subkutanen Fettgewebes	47
	3.4	.4	Uhrengenexpressionen des braunen Fettgewebes	48
	3.4	.5	Genexpressionen von Adipokinen und Enzymen des epididymalen	
			Fettgewebes	50
4	Disl	kus	sion	52
	4.1	Üb	erblick über die Ergebnisse	52
	4.2	Zir	kadiane Rhythmen des epididymalen, subkutanen und braunen	
		Fe	ttgewebes	52
	4.3	Zir	kadiane Rhythmen von Vorläufer- und reifen Fettzellen der	
		PE	R2::LUC-Mäuse	53
	лл	7ir	kadiane Rhythmen von Wildtyn-Vorläuferfettzellen	55
	7.7	211		00
	4.5	Uh	rengenexpressionen des epididymalen, subkutanen und braunen	
		Fe	ttgewebes	56
	4.6	Ad	ipokin- und Enzymexpressionen des epididymalen Fettgewebes	60
	4.7	Au	sblick	61

5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	63
7	Danksagung	76
8	Lebenslauf	77

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
Atgl	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
BAT	brown adipose tissue, braunes Fettgewebe
Bmal1	Brain and Muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator – like 1
Bmal1-Luc	Bmal1-Luciferase-Reporterplasmid
Bmal1-Luc-Lv	Bmal1-Luciferase-Lentivirus
BMAL1::LUC	BMAL1::LUCIFERASE-Fusionsprotein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ccgs	clock controlled gene, Uhren-kontrollierte Gene
cDNA	complementary desoxy-ribonucleic acid, komplementäre DNS
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
Cry1/2	Cryptochrome1/2
DAG	Diacylglycerin
Dbp	D-site of albumin promotor binding protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMH	dorsomedialer Kern des Hypothalamus
DNA	desoxy-ribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonucleosintriphosphat
dPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
E-Box	DNA-Promoter-Element
E coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eef1α	eukaryotic elongation factor 1 alpha
eWAT	epididymal white adipose tissue, epididymales weißes Fettgewebe
FBS	Fetales Rinderserum

fFs	freie Fettsäure
Gapdh	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293T
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hsl	Hormon-sensitive Lipase
IL-6	Interleukin-6
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
MAG	Monoacylglycerin
MGL	Monoacylglycerid-Lipase
mRNA	messenger ribonucleid acid, Boten-Ribonukleinsäure
PDL	Poly-D-Lysin
Per1/2	Period1/2
Per2-Luc	Per2-Luciferase-Reporterplasmid
Per2-Luc-Lv	Per2-Luciferase-Lentivirus
PER2::LUC	PER2::LUCIFERASE-Fusionsprotein
PVN	paraventrikulärer Nucleus
qPCR	quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
Rev-erbα	Reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha
RORα	Retinoic acid-related orphan receptor alpha
RRE	retinoid response element
RT	reverse Transkriptase
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
s.c. WAT	subcutaneous white adipose tissue, subkutanes weißes Fettgewebe
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TTL	transkriptionell-translationale Rückkopplungsschleife
ZT	Zeitgeber-Zeit

1 Einleitung

- 1.1 Die zirkadiane Uhr
- 1.1.1 Einführung in die zirkadiane Rhythmik

"Der Rhythmus ist für mich der Grund aller Dinge. Mit dem Rhythmus beginnt das Leben, mit dem Herzschlag." Herbert von Karajan

Herbert von Karajan, berühmter Dirigent des 20. Jahrhunderts, erahnte die große Bedeutung des Rhythmus nicht nur für die Musik. Ohne Rhythmus gibt es keinen Einklang zwischen den Musikern und somit keinen Einklang im Ohr des Zuhörers. Wichtig für diesen Einklang – und letztlich für die Harmonie – ist der Dirigent. Dieser Taktgeber muss das Orchester in "seinen" bestimmten Rhythmus einstellen und folglich führen. Die Musiker greifen den Rhythmus der Dirigenten auf. Erst so kann die Musik zu einem Klangerlebnis werden und inspirieren. Der Rhythmus kann alles verbinden und ist "*der Grund aller Dinge"*.

Nicht nur die Musik braucht einen passenden Rhythmus, auch das Leben an sich benötigt eine bestimmte Rhythmik, um die Homöostase aufrechtzuerhalten. Beinahe die ganze Physiologie und das Verhalten der Menschen folgen einem täglichen Rhythmus. Dieser Rhythmus ist wichtig, um sich auf tägliche Veränderungen einzustellen, sich an diese anzupassen und somit lebensfähig zu sein.

Die Periode dieses Rhythmus dauert ungefähr 24 Stunden und beginnt dann von Neuem. Aus diesem Grunde wurde der Begriff "der zirkadianen Uhr" (von lat. circa dies = um den Tag herum) eingeführt. Der wohl bekannteste zirkadiane Rhythmus ist der Schlaf-Wach-Rhythmus. Das zirkadiane System beeinflusst darüberhinaus u.a. die Körpertemperatur, die kardiovaskuläre und renale Aktivität, die gastrointestinale Motilität sowie den Metabolismus (117,136). Die inneren Uhren werden dabei von äußeren Zeitgebern beeinflusst. Zeitgeber sind äußere Signale, die die innere Uhr mit der Umwelt synchronisieren. Der wichtigste Zeitgeber ist das Licht. Aber auch die Umgebungstemperatur, die Nahrungsaufnahme oder soziale Interaktionen können als Zeitgeber fungieren (16,89,96,168). Das zirkadiane System besteht damit aus einem Netzwerk von äußeren und inneren Signalen, die fast in allen Zellen des Körpers eine zirkadiane Rhythmik ermöglichen.

1.1.2 Der anatomische Aufbau der zirkadianen Uhr

In jedem rhythmischen System muss es einen Taktgeber geben, damit das System einwandfrei arbeiten kann. Auch im zirkadianen System der Säuger gibt es einen zentralen Taktgeber - oder Schrittmacher - welcher in der Region des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) liegt (162). Darüberhinaus wurden aber auch in anderen Tiergattungen zum Beispiel in Haussperlingen zirkadiane Rhythmen nachgewiesen (163). Der SCN befindet sich unterhalb des III. Ventrikels und oberhalb des Chiasma opticum und somit im Bereich des ventralen Hypothalamus (43,147). Fast jede Zelle des SCN unterliegt einer zirkadianen Rhythmik (178). Der wichtigste Initiator für die Synchronisation der SCN-Uhren ist das Licht. Die lichtsensitiven Ganglionzellen der inneren Retina, welche Melanopsin produzieren, nehmen dabei die Hell- und Dunkelinformationen wahr und geben sie über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) an den SCN weiter (20,90). Dabei führen die Transmitter Glutamat und pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) zu einer Umpolung an den synaptischen Membranen und übertragen die Informationen auf die Neurone des SCN. Diese aktivieren dann mit Hilfe von Kaskaden u.a. die Per-Gene (7,59). SCN-Neurone projizieren primär mit Hilfe von rhythmischer Entladung und rhythmischer Sekretion in die subparaventrikulären- und dorsomedialen Regionen des Hypothalamus (SPVC, DMH) (42,147). Über den paraventrikulären Nucleus (PVN) hinweg wird die Sekretion von Melatonin aus der Epiphyse gesteuert (73,74). Aus dem DMH gelangen weitere Efferenzen in den lateralen Hypothalamus und in den ventrolateralen präoptischen Nucleus (VLPO), welche den Schlaf-Wach-Rhythmus regulieren (32,42). Im PVN werden weitere Informationen an das vegetative Nervensystem gegeben, welches dann die peripheren Organe versorgt (26, 43). Zusammenfassend verknüpft der SCN als Haupttaktgeber Hirnstrukturen und Peripherie und koordiniert so die zirkadianen Rhythmen des Körpers (13,175).

1.1.3 Der molekulare Mechanismus der zirkadianen Uhr

Betrachtet man das zirkadiane System auf molekularer Ebene, so besteht das gesamte Uhrenwerk aus transkriptionell-translationalen Rückkopplungsschleifen (TTLs) (135,151). Die Hauptelemente dieses Systems bilden der positive Schenkel mit den Transkriptionsfaktoren *Brain and Muscle Arnt-like Protein-1* (BMAL1) und *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput* (CLOCK) sowie der negative Schenkel mit den Transkriptionskoregulatoren *Period* (PER1, PER2, PER3) und *Cryptochrom* (CRY1, CRY2) (27,57,64,84,146,147). Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung des

molekularen Aufbaus der zirkadianen Uhr. In den frühen Morgenstunden bindet das Heterodimer CLOCK/BMAL1 an E-Box-Enhancer-Elemente der DNA, welche als Andockstellen für Transkriptionsfaktoren dienen, und aktiviert die Transkription von Per1, Per2, Per3 sowie von Cry1 und Cry2 (27,57,64,84,88). Im Laufe des Tages bilden die PER- und CRY Proteine im Zytoplasma Heterodimere. Ist im Zytoplasma eine ausreichend hohe Konzentration dieser Heterodimere erreicht, translozieren sie in den Abendstunden in den Zellkern. Folglich kommt es zur Inhibition der durch BMAL1 und CLOCK vermittelten Transkription von Per/Cry (84,88,147,150). So können die PER- und CRY-Proteine ihre eigene Synthese stoppen. Durch diese Hemmung nimmt die Konzentration von PER und CRY im Zytoplasma im Verlauf der Nacht allmählich ab, und die Aktivierung durch BMAL1 und CLOCK beginnt von Neuem. Neben CLOCK ist auch das Neuronal PAS Domain Protein 2 (NPAS2) in der Lage, mit BMAL1 eine Verknüpfung einzugehen und die Transkription von Per- und Cry-Genen zu induzieren (134). Neben dieser zentralen Rückkopplungsschleife existieren noch weitere separate Rückkopplungsmechanismen. CLOCK/BMAL1 sind in der Lage, die Transkription zweier nukleärer Orphan-Rezeptoren namens Reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha (Rev-erb α) sowie Retinoic acid-related orphan receptor alpha (Ror α) anzuregen. REV-ERB α und ROR α besitzen die Fähigkeit, direkt auf die zentrale Rückkopplungsschleife einzuwirken (31,143). REV-ERB α hemmt dabei die Transkription von *Bmal1* (122), ROR α fördert die Transkription von *Bmal1* (4). PER/CRY können die Transkription von Rev-erb α inhibieren und so die Transkription von *Bmal1* wieder aktivieren (122). Zu dem zirkadianen Netzwerk gehören auch die Uhren-kontrollierten Gene (Ccgs) (135). Ein wichtiges Ccg kodiert für das D-site albumin promoter binding protein (DBP) (137). DBP ist imstande, als Homodimer an D-Box-Enhancer-Elemente anzudocken und so die Transkription von bestimmten Zielgenen auszulösen (87,91,97,135). So areift DBP in die zirkadianen Rhythmen bestimmter Stoffwechselprozesse der Leber, Niere oder des Herzens ein (39,51,182). DBP kann aber auch als Partner der zentralen Rückkopplungsschleife betrachtet werden. So kann es direkt die Transkription von Per1 induzieren (183). All diese Mechanismen werden zusätzlich posttranslational durch reversible Phosphorylierung, beispielsweise durch die Caseinkinase I epsilon (CKI_ε), oder durch proteosomale Proteolyse modifiziert (84,88,95). Nur so ist es möglich, einen robusten Rhythmus von knapp 24 Stunden aufrechtzuerhalten.



Abb. 1

Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der zirkadianen Uhr. Gezeigt sind die transkriptionelltranslationalen Rückkopplungsschleifen der zirkadianen Uhr. Erläuterungen siehe Punkt 1.1.3.

Abkürzungen: E-Box (Enhancer Box), RRE (Retinoid Response Element), Brain and Muscle Arnt-like Protein-1 (BMAL1), Circadian Locomotor Output Cycles Kaput Protein (CLOCK), Cryptochrom-Protein (CRY), Period-Protein (PER), Retinoic Acid-related Orphan Receptor Alpha (RORa), Reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha (Rev-erba), Uhren-kontrollierte Gene (Ccgs).

1.1.4 Zirkadiane Uhren in peripheren Geweben

Ähnlich wie der SCN können auch periphere Uhren eine endogene zirkadiane Rhythmik generieren. So konnten funktionelle zirkadiane Uhren in Leber, Niere, Nebenniere, Herz, Pankreas und im Fettgewebe beschrieben werden (69,85,94,110). Obwohl deren Zellen in Zellkultur endogen rhythmisch sind (13,180), zeigen Studien dennoch, dass die Zellen der Peripherie eine gedämpfte Oszillation aufweisen, wenn sie vom SCN losgelöst sind (6,100,185). Der SCN scheint die Zellen im Organismus untereinander und auch mit dem externen Tagesrhythmus zu synchronisieren. Er kann daher als Taktgeber des ganzen Körpers betrachtet werden (39,43,98,147). Als *Zeitgeber* für die peripheren Organe können auch andere Faktoren als das Licht genutzt werden. Periphere Organe können auch durch die Nahrungsaufnahme synchronisiert werden (39,43). Dabei dient der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme als stärkster *Zeitgeber* der inneren Uhren in peripheren Organen. So konnte aufgezeigt werden, dass eine Verschiebung der Nahrungsaufnahme in die inaktive Phase des Tages verschieben, leiden als Konsequenz

dieser internen Desynchronisierung vermehrt an metabolischen Erkrankungen wie Adipositas (22,145). Die zirkadianen Uhren der Leber greifen entscheidend in die Prozesse des Leberstoffwechsels ein. Sie regulieren zum Bespiel die zirkadiane Expression der Gene des Glukosestoffwechsels (85). So werden die Enzyme der Glukoneogenese, Glykolyse und des Glykogenstoffwechsels rhythmisch exprimiert (117). Auch die Biosynthese von Cortisol in der Nebenniere wird zirkadian reguliert (110). Man geht davon aus, dass 10 % der aktiven Gene in jedem Organ gewebsspezifisch zirkadian reguliert sind, wodurch diverse metabolische Vorgänge beeinflusst werden. Insgesamt sind ca. 45 % aller Gene in mindestens einem Gewebe rhythmisch aktiv (190).

1.2 Metabolismus

1.2.1 Die zirkadiane Uhr und Metabolismus

In der heutigen Zeit lebt der Mensch verstärkt "gegen" seine eigene innere Uhr. Ob in dem Gesundheitssystem, in der Gastronomie oder in der Industrie – überall herrscht ein 24-Stunden-Schichtsystem. Soziale- und ökonomische Veränderungen führen dazu, dass vor allem während der Abendstunden gearbeitet wird. Studien zeigen, dass diese Veränderungen zu einem erhöhten Auftreten von Unfällen und Arbeitsunfähigkeiten führen (5,49,50). Besonders Nachtschichtarbeiter leiden unter diesem System (22,172). Da sämtliche Stoffwechselprozesse unter zirkadianer Kontrolle stehen, führt eine Abweichung von der durch die innere Uhr vorgegebenen Rhythmik zu gesundheitlichen Problemen. Wie bereits beschrieben, wird der Energiestoffwechsel zirkadian reguliert (siehe Punkt 1.1.4). Daneben beteiligen sich Uhren im Pankreas an der Regulation der Insulinproduktion (174). Störungen des zirkadianen Systems führen damit zu Veränderungen im Energiestoffwechsel und begünstigen die Entwicklung von Diabetes Mellitus Typ 2 (22,70,174). Nicht nur Glucose und Insulin, auch Leptin, Triglyceride und Cholesterin zeigen zirkadiane Schwingungen (2,72,139). Störungen des zirkadianen Systems führen somit unweigerlich zu metabolischen Störungen. Viele Schichtarbeiter leiden am metabolischen Syndrom (40,75,116). Die Kombination aus Insulinresistenz, Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Adipositas bei Nachtschichtarbeitern kann also ein Resultat einer defekten inneren Uhr sein (145). Metabolische Störungen können aber auch eine intakte innere Uhr beeinflussen. Studien konnten nachweisen, dass Streptozotocin-induziert diabetische Mäuse ein verändertes Genexpressionsmuster der Uhrengene aufweisen (65,106). Des Weiteren zeigte Ando et al., dass genetisch adipöse Mäuse im Vergleich zu Wildtypen eine verminderte Genexpression der Uhrengene und Adipokine im Fettgewebe aufweisen (9). Abschließend zeigt sich damit eine enge

Verbindung zwischen den inneren Uhren und dem Metabolismus (154). Zirkadiane Uhren greifen in essentielle Stoffwechselprozesse ein und sollten daher als mögliche Ursache bei der Entstehung von metabolischen Krankheiten in Betracht gezogen werden.

1.3 Die Fettzelle

1.3.1 Die Fettgewebsarten und deren Funktionen

Das Fettgewebe übernimmt im Körper eine wichtige Schlüsselrolle in der Regulation der Energiehomöostase (81). Es ist ein einzigartiges Organ, welches in schlanken Menschen rund 5 % und in übergewichtigen Menschen mehr als 50 % der Körpermasse ausmachen kann (41). Es existieren 2 prinzipielle Formen des Fettgewebes: weißes (WAT) und braunes (BAT) Fettgewebe (71,92). Beide Gewebeformen können Fett in Form eines Depots lagern. Das braune Fettgewebe nutzt dieses Depot, um Wärme zu regulieren (17,102). Besonders bei Neugeborenen spielt diese Thermogenese eine wichtige Rolle, und deshalb ist das braune Fettgewebe gerade bei Babys stark ausgeprägt (138). Dennoch zeigen neuere Studien, dass auch gesunde Erwachsene funktionelles braunes Fettgewebe besitzen (21,23,138). Das weiße Fettgewebe nutzt die Fetteinlagerung für unterschiedliche Aufgaben. Zum einen dient es als sogenanntes Strukturgewebe den Organen. Es ummantelt fast alle Organe und schützt sie vor mechanischen und thermischen Einwirkungen (63,71,92). Zum anderen fungiert es als wichtigster Energiespeicher des Körpers. Des Weiteren ist das weiße Fettgewebe ein endokrin aktives Organ (36). Es sekretiert die Adipo(zyto)kine, z.B. Leptin, Adiponectin und Visfatin. Diese können insbesondere den Energiemetabolismus beeinflussen (35,53,173). Das weiße Fett kommt ubiguitär im Körper vor. Dabei unterscheidet man subkutanes von intra-abdominellem Fett (35,68,71,92,165,173). Letzteres kann erneut in 2 Gruppen aufgespalten werden: das viszerale und nicht-viszerale Fett (35,92,173). Vor allem die Akkumulation der viszeralen Fettdepots erhöht das Risiko, an metabolischen Folgen zu erkranken (93,184). Intra-abdominelles Fett beinhaltet zum Beispiel mesenteriale, omentale, perirenale oder epididymale Fettdepots (35,173). Subkutanes Fettgewebe findet man vor allem am Abdomen, am Gesäß und am Oberschenkel (35). Generell zeigt sich, dass die intra-abdominellen Fettdepots vornehmlich endokrinologisch aktiv sind, während die peripher gelegenen Fettdepots eher an der mechanischen und thermischen Eindämmung sowie an der Energiehomöostase beteiligt sind (63). Das weiße Fettgewebe besteht aus vielen unterschiedlichen Zelltypen. Dazu gehören reife Fettzellen, Vorläuferfettzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen (71,92). Die Fettzellen entstammen den mesenchymalen Stamm-Zellen (MSCs), welche sich in

Vorläuferfettzellen umwandeln. Im nächsten Schritt differenzieren sich die Vorläuferfettzellen in reife Fettzellen, welche dann die vollständigen Funktionen des Fettgewebes übernehmen (35).

Das Fettgewebe ist zusammenfassend ein Organ mit vielfältigen Aufgabenbereichen. Daher tragen Störungen dieses Systems, abhängig von der Akkumulation der Lipide, meist medizinische Konsequenzen mit sich (92,125,160).

1.3.2 Der Metabolismus der Fettzelle

Wie bereits beschrieben, ist das Fettgewebe der größte Energiespeicher des Körpers. Es speichert das Fett in Form von Triglyceriden (TAG). Während längeren Fastens muss es seine Lipidspeicher öffnen und die Triglyceride in Form von freien Fettsäuren (fFs) und Glycerin anderen Organen bereitstellen (131,133). Werden dem Körper jedoch täglich zu große Mengen an Fett angeboten, so sind die Depotreserven überlastet, es häufen sich Triglyceride an und Lipide zirkulieren vermehrt im Blut. In Folge dessen entsteht ein erhöhtes Risiko, an Adipositas, Diabetes Mellitus Typ 2 oder kardiovaskulären Störungen zu erkranken (171). Aus diesem Grund müssen die Stoffwechselprozesse aus Lipidspeicherung (Lipogenese) und Lipidspaltung (Lipolyse) extrem gut funktionieren und koordiniert sein. Abbildung 2 zeigt ein vereinfachtes Schema über die Lipogenese und Lipolyse. Glucose, welche wir mit der Nahrung aufnehmen, wird in der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut und mit Hilfe der Pyruvatdehydrogenase in Acteyl-CoA umgewandelt (129,130). Dabei werden in einer engmaschigen Synthese drei Acyl-CoA mit einem Glycerin zu einem Triglycerid verknüpft. Dieser Prozess findet primär in der Leber, aber auch im Fettgewebe statt (131). Anschließend werden die Lipide in Form von Lipoproteinen zum Beispiel an Muskel oder Herz übergeben oder bei Überangebot im Fettgewebe gespeichert. Die Lipogenese im Fettgewebe wird zusätzlich durch Insulin stimuliert (133). Benötigen nun andere Organe Energie, werden die Fettspeicher aufgebrochen. Aus den Triglyceriden werden wieder freie Fettsäuren und Glycerin. Dies geschieht mit Hilfe von 3 Enzymen: Zuerst werden die Triglyceride zu Diacylglycerin (DAG) und einer freien Fettsäure durch das Enzym Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) hydrolysiert. Anschließend spaltet die Hormon-sensitive Lipase (HSL) das Diacylglycerin zu Monoacylglycerin (MAG) und einer freien Fettsäure. Das Monoacylglycerin wird dann durch die Monoacylglycerid-Lipase (MGL) zu Glycerin und einer freien Fettsäure hydrolysiert (44,86,131,189). Die freien Fettsäuren werden über den Blutstrom primär an die Leber überliefert. Sie werden dort über die β -Oxidation abgebaut. Dabei entsteht Acetyl-CoA, welches in den Citratzyklus eingeschleust werden kann, sowie NADH und

FADH₂, welche zur Atmungskette transportiert werden können (131,132). Die Atmungskette baut dabei einen Protonengradienten auf, der wiederum essentiell für die ATP-Synthase ist (132). Das durch die Lipolyse freigesetzte Glycerin, kann je nach Nahrungsangebot für die Glykolyse oder Gluconeogenese genutzt werden. Erhöhte Blutspiegel an Katecholaminen oder Glucagon sind für die Lipolyse die größten Stimuli (131). Die Lipolyse kann aber auch durch den Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Koffein aktiviert werden oder durch Insulin gehemmt werden (1,3,131,140,141).



Abb. 2

Schematische Darstellung des Metabolismus der Fettzellen. Gezeigt sind die Lipogenese sowie die Lipolyse. Erläuterungen siehe Punkt 1.3.2. Abkürzungen: TAG (Triacylglycerin), DAG (Diacylglycerin), MAG (Monoacylglycerin), ATGL (Adipozyten-Triglycerid-Lipase), HSL (Hormon-sensitive Lipase), MGL (Monoacylglycerid-Lipase), fFs (freie Fettsäure), TNF α (Tumornekrosefaktor α).

1.3.3 Adipokine

Das Fettgewebe als ein endokrines Organ spielt seit der Entdeckung von Leptin im Fettgewebe im Jahr 1994 in der Medizin eine große Rolle (191). In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Adipozyten-sezernierten Signalmolekülen, sog. Adipokine, gefunden. Adipokine wirken dabei autokrin, parakrin oder systemisch und werden zum Teil im Fettgewebe aber auch in anderen Organen hergestellt (78,123,173). Sie beeinflussen neben Appetitregulation und Energieverbrauch u.a. das kardiovaskuläre System, den Salz- und Wasserhaushalt und die Reproduktion (78,123).

1.3.3.1 Leptin

Leptin (griech. leptos = dünn), ein Peptidhormon, wird hauptsächlich im weißen Fettgewebe proportional zu Körperfettmasse synthetisiert (191). Zirkulierendes Leptin gelangt über die Blut-Hirnschranke in das Gehirn und bindet an spezifische Rezeptoren des Hypothalamus (54). In Form eines negativen Feedback-Systems zwischen Gehirn und Periphere kann Leptin seine anorexigene und katabole Wirkungen vollziehen (28,52,54,58). Leptin fördert über die Expression des Neuropeptids Y und über die Stimulation der Pro-Opiomelanokortin-Neurone im Hypothalamus das Sättigungsgefühl (11). In Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen wurden Adipositas, Hyperphagie und Hyperinsulinämie festgestellt (176). In adipösen Menschen zeigen sich jedoch erhöhte Leptinwerte, dagegen erniedrigte Leptinwerte bei anorektischen Menschen (34,177). Die Ursachen dieser "Leptinresistenz" sind bis heute nicht geklärt (33,37,78). Es wird jedoch vermutet, dass unter anderem eine zu hohe und chronische Beanspruchung der Leptinrezeptoren zur Leptinresistenz führt (99,144). Neben den zentralen Effekten zeigt Leptin auch viele periphere Funktionen. So greift Leptin in das Immunsystem, in die Koagulation und Thrombozytenaggregation sowie den Glukosemetabolismus ein (46,48,78,82,119).

1.3.3.2 Adiponectin

Adiponectin wird wie Leptin im weißen Fettgewebe exprimiert (66). Dabei verhält sich seine Konzentration im Blut umgekehrt proportional zur Körperfettmasse (161). Adiponectin ist in die Regulation des Glucose- und Lipidmetabolismus' involviert. Es steigert die Fettsäureoxidation, inhibiert die Gluconeogenese und erhöht die damit verbundene Insulinsensitivität (15). Adiponectin ist deshalb ein antidiabetisches Hormon, welches aber auch antiinflammatorische und vaskuloprotektive Effekte aufweist (38,58,83,152,181). Adipositas in Mäusen oder auch eine hochkalorische Diät führen zu einer erniedrigten Expression dieses Adipokins im Fettgewebe (15,170). Umgekehrt zeigten Versuche mit vollständigem Adiponectinmangel in *Knock out*-Mäusen eine erhöhte Insulinresistenz, Glukoseintoleranz und ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose (80,83,104,114).

1.3.3.3 Visfatin

Visfatin ist ein Adipokin, welches anabole Funktionen aufweist und im weißen Fettgewebe exprimiert wird. Erstmalig wurde es 2005 durch Fukuhara *et al.* identifiziert (55). Es bindet an Insulinrezeptoren, fördert die Glykolyse sowie die Aufnahme von Glukose in periphere Organe und gilt damit als Insulin-Mimetikum (18,55). Erhöhte Konzentrationen von Visfatin führen zu Adipositas und Diabetes Mellitus Typ 2 (30,62,141,148). Im Gegensatz zu Adiponectin hat Visfatin proinflammatorische und ateriosklerotische Wirkungen (120,164). Erhöhte Visfatinspiegel konnten beispielsweise auch bei rheumatoider Arthritis und Psoriasis gefunden werden (108,111). In welchem Zusammenhang diese erhöhten Werte mit der Erkrankung stehen, ist jedoch noch nicht bekannt.

1.3.3.4 Nesfatin

Nesfatin wurde 2006 entdeckt und wird vom NEFA/nucleobinding 2 (*NUCB2*)-Gen kodiert. Es wird hauptsächlich in Kerngebieten des Hypothalamus' exprimiert (*Nucleus paraventricularis, Nucleus supraopticus*) (103). Außerdem wurde dieses Protein auch in peripheren Organen wie Herz, Pankreas und Fettgewebe detektiert (47,67,79,127). Vor allem im subkutanen Fettgewebe konnte Nesfatin-1 nachgewiesen werden (109,126). Dagegen wurden nur geringe Mengen an Nesfatin-1 im perirenalen und braunen Fettgewebe von Mäusen gefunden (126). Intracerebroventrikuläre Injektionen (i.c.v.) von Nesfatin-1 reduzieren die Nahrungsaufnahme und senken das Körpergewicht in Ratten (103). Nesfatin scheint damit anorexigene Effekte in Ratten zu haben (103,155). Die Gruppe um Ramanjaneya wies nach, dass die Expression des Proteins nach einer Fastenzeit deutlich abnimmt, während eine hochkalorische Diät zu erhöhten Werten von Nesfatin-1 im Blut führt. Die Expression von Nesfatin-1 war dabei proportional zum Body-Mass-Index (BMI). TNF α , IL-6, Insulin und Dexamethason, allesamt wichtige Parameter der Adipositas, fördern die Nesfatin-Sekretion (126). All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Nesfatin ein wichtiges Adipokin in der Regulation der Energiehomöostase ist.

1.3.4 Die zirkadiane Uhr der Fettzelle

Dass zirkadiane Rhythmen im Fettgewebe existieren, konnte bereits 2005 bewiesen werden. Anhand von gPCR-Daten wurden rhythmische Genexpressionen von Bmal1, Per1/2, Cry1/2 und Dbp im perigonadalen Fett von Wildtyp-Mäusen in vivo gefunden (10). Zvonic et al. identifizierten anhand von Microarray- und qPCR-Daten insgesamt 650 Gene, die ein rhythmisches Expressionsprofil im braunen und weißen Fettgewebe von Mäusen aufwiesen (124,192). 2009 konnten erstmals auch endogene zirkadiane Rhythmen in Vorläuferfettzellen und Fettzellen einer 3T3-L1-Zelllinie entdeckt werden. Außerdem zeigte sich dabei, dass Leptin endogen zirkadian reguliert wird (112). Diese Forschungsgruppe stellte auch unterschiedliche Aktivierungsrhythmen der Uhrengene in schlanken im Vegleich zu adipösen Menschen fest (113). Mit Hilfe von Lumineszenz-Reportern konnten Shostak et al. zirkadiane Oszillationen in dem epididymalen, peritonealen und subkutanen Fettgewebe der Maus aufnehmen. Des Weiteren konnte diese Gruppe zeigen, dass der Fettkatabolismus unter zirkadianer Kontrolle steht. Fettstücke von Wildtypen in Zellkultur zeigten eine rhythmische Expression der Enzyme Hsl und Atgl, welche in Clock-Mutanten nicht existierten (157). Andere Projektgruppen Entwicklungen von Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie, analysierten die Hyperglykämie und Hypoinsulinämie in Mäusen mit unterschiedlichen Mutationen im Clock-Gen (76,77,105,169). Per2-defiziente Mäuse zeigen unter einer Standarddiät ein geringeres Körpergewicht als die Kontrolltiere (60,186). Die Folgen einer Deletion im Bmal1-Gen der Mäuse äußern sich in Übergewicht und einer Phasenverschiebung der täglichen Nahrungsaufnahme (118). Studien belegen auch, dass BMAL1 und REV-ERB α des Fettmetabolismus wichtige Elemente sind, so zum Beispiel bei der Adipozytendifferenzierung oder der Lipogenese (25,53,153,166). Darüberhinaus zeigten Forschungsgruppen, dass die Adipokine Leptin, Adiponectin und Visfatin im Menschen zirkadian reguliert werden (19,56,158,159). Auch in der Maus wurden zahlreiche Adipokine wie zum Beispiel Adiponectin, Visfatin oder Resistin gefunden, welche eine tägliche Varianz in der Expression aufwiesen (10).

Die Existenz von zirkadianen Uhren im Fettgewebe konnte damit belegt werden. Ebenso wurde bewiesen, dass der Fettmetabolismus und einige endokrinologische Funktionen des Fettes zirkadian reguliert werden (156). Die meisten dieser Studien konnten jedoch nicht darlegen, ob diese Rhythmen lokal oder eher systemisch, also z.B. durch die Nahrungsaufnahme, den SCN, die Temperatur oder hormonell reguliert werden.

1.4 Fragestellung

Zirkadiane Uhren im Fettgewebe sind seit circa einer Dekade bekannt. Vor allem *in vivo*-Daten belegen, dass die Uhrengene im Fettgewebe im Tagesverlauf rhythmisch reguliert werden. Ebenfalls zeigt sich *in vivo*, dass einige Adipokine zirkadiane Rhythmen in Expression und Sekretion zeigen. Außerdem wurde die zirkadiane Regulation der Lipolyse und deren Einfluss auf die Körpergewichtsregulation charakterisiert. Bis jetzt ist jedoch wenig darüber bekannt, ob diese Rhythmen des Fettgewebes primär lokal (d.h. durch die Adipozytenuhren selber) oder eher systemisch (z.B. über rhythmische Hormone) reguliert werden. Es wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, um zirkadiane Rhythmen in Zellkultur zu charakterisieren. So wurde eine transgene Mauslinie (*PER2::LUC*) entwickelt, die einen an das Uhrenprotein PER2 gekoppelten Luciferase-Reporter exprimiert, um molekulare Uhrenaktivität in unterschiedlichen Geweben zu bestimmen (187). Ebenso wurde ein lentivirales Konstrukt geschaffen, um die Luciferase-Aktivität unter Kontrolle des Promotors des *Bmal1*- und *Per2*-Uhrengens in infizierten Zellen zu analysieren.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, endogen regulierende zirkadiane Rhythmen im Fettgewebe nachzuweisen. Das Projekt geht davon aus, dass die zirkadianen Uhren des Fettgewebes im Körper zwar vom SCN, der Nahrungsaufnahme und der Temperatur beeinflusst werden, in Zellkultur jedoch weiterhin – und damit endogen kontrolliert – persistieren.

In der Arbeit wird auf folgende Fragestellungen eingegangen:

- 1. Existieren zirkadiane Rhythmen im epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebe *in vitro*?
- 2. Existieren zirkadiane Rhythmen in Vorläufer- und reifen Fettzellen der PER2::LUC-Mäuse *in vitro*?
- 3. Lassen sich diese Rhythmen auch für andere Uhrengene nachweisen?
- 4. Werden neben den Uhrengenen auch für die Pysiologie des Fettgewebes wichtige Gene wie die der Adipokine und die der Enzyme *Hsl* und *Atgl* endogen rhythmisch exprimiert?

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Für alle Versuche wurden Wildtyp-Mäuse mit einem C57BL/6J-Hintergrund oder *PER2::LUC-Knock in*-Mäuse, ebenfalls mit einem C57BL/6J-Hintergrund, verwendet. Aus den *PER2::LUC*-Mäusen wurde epididymales, subkutanes und braunes Fett isoliert. Anschließend wurden die Oszillationen der Luciferase-Aktivität dieser Präparate im Luminometer aufgezeichnet und deren Periode, Phase und Dämpfung bestimmt. Des Weiteren wurden aus dem perigonadalen Fett der *PER2::LUC*-Mäuse Vorläuferfettzellen und reife Fettzellen gewonnen. Beide Zelltypen wurden 2 Stunden vor Messbeginn mit Dexamethason behandelt und die Rhythmen im Luminometer aufgezeichnet.

Auch aus Wildtyp-Mäusen wurden Vorläuferadipozyten isoliert. Die Zellen wurden mit Lentiviren (*Bmal1-Luc*-Lentivirus oder *Per2-Luc*-Lentivirus) beimpft. Diese Lentiviren wurden dafür mit Hilfe der Wirtszellinie HEK293T hergestellt. Nach erfolgreicher Transduktion wurden die Zellen mit Dexamethason für 2 Stunden synchronisiert. Danach wurden die Schwingungen der Luciferase-Aktivität im Luminometer aufgenommen.

In einem weiteren Versuch wurden epididymales, subkutanes und braunes Fettgewebe aus 18 Wildtypen für die Bestimmung von Genexpressionen isoliert. Dafür wurden an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 9 Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Das Fett wurde gesäubert, gewaschen und in 8-27 mm³ große Stücke geschnitten. Danach wurden die Fettstücke auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und in einem Inkubator für 24 Stunden bebrütet (Tag 1). Nach 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h, 54 h und 60 h wurden Fettstücke aus der Kultur entnommen und bei -20 °C tiefgefroren. Aus den Proben wurde Total-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der qPCR wurden für die Tage 2 und 3 die Genexpressionen der Uhrengene *Bmal1, Per2, Per1, Clock* sowie *Dbp* und *Rev-erba*, sowie der Hormone *Leptin, Adiponectin, Nesfatin, Visfatin* und der Enzyme *Hormon-sensitive Lipase (Hsl)* und *Adipozyten-Triglycerid-Lipase (Atgl)* gemessen.

2.2 Tierversuche

2.2.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden insgesamt 40 Wildtyp-Mäuse und 30 *PER2::LUC*- Mäuse, beide mit einem C57BL/6J-Hintergrund, genutzt. Die Wildtyp-Mäuse wurden von einem kommerziellen Züchter (Janvier) bezogen. Die *Knock in*-Mäuse wurden in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gezüchtet. Die Mäuse wurden, in Gruppen von 3 - 6 Tieren, in Käfigen (Tecniplast, Typ II L 265 x 207 x 140 mm) gehalten. Dabei hatten sie Zugang zu Wasser und Standardfutter (Ssniff V1126) *ad libitum*. In den Haltungsräumen herrschten eine konstante Temperatur von circa 20 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Die Tiere waren einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden ausgesetzt. Das Licht war von 5 Uhr (definiert als Zeitgeber-Zeit (ZT 0) bis 17 Uhr (ZT 12) angeschaltet. Vor der Versuchsdurchführung wurden die Tiere mindestens 1 Woche unter diesen Bedingungen gehalten. Alle Mäuse waren 10-12 Wochen alt. Während für die Lumineszenzmessungen weibliche und männliche Mäuse genutzt wurden, wurden für die qPCR-Daten nur männliche Mäuse verwendet.

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft und ländliche Räume Schleswig-Holsteins genehmigt (Aktenzeichen V 242. 7224. 122-4).

2.2.1.1 PER2::LUC-Mäuse

Geschaffen wurden die *Knock in*-Mäuse, um die Expression des Uhrengenproteins PER2 mit Hilfe eines Lichtsignals darzustellen. Dafür wurde die Luciferase-cDNA an das 3'-Ende der kodierenden Region des *Per2*-Gen geknüpft. Die *PER2::LUC*-Mäuse exprimieren auf diese Weise das PER2::LUCIFERASE-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *Per2*-Promoters. Das Enzym Luciferase oxidiert unter ATP-Verbrauch das Protein D-Luciferin. Es entsteht Oxyluciferin unter Lichtemission (λ_{max} = 550 nm). Die Intensität des Lichtes ist dabei proportional zur Luciferaseaktivität und reflektiert somit die Expression des PER2-Proteins (187).

2.3 Molekularbiologische und -genetische Methoden

2.3.1 Kultivierung der Plasmide mit Hilfe von *Escherichia coli*

Für die Herstellung und Vermehrung der Plasmide mit Hilfe des Bakteriums *Escherichia coli* wurden folgende Medien benötigt:

Tabelle 1: LB-Medium

Trypton (10 g/l)	10 ml
Hefeextrakt (5 g/l)	5 ml
NaCl (10 g/l)	10 ml
H ₂ O	950 ml

Tabelle 2: LB-Agar

Trypton (10 g/l)	5 ml
Hefeextrakt (5 g/l)	2,5 ml
NaCl (10 g/l)	5 ml
H ₂ O	475 ml
Agarose-Pulver (Ultra Pura Agarose)	7,5 g/l
Ampicillin (100 μg/ml)	0,5 ml

Tabelle 3: Plasmide zur Herstellung des Lentiviruses "Bmal1-Luc-Lentivirus"

Plasmid 1 (DNA 1)	"gene of interest"	"pBmal1-Luc Lenti"
Plasmid 2 (DNA 2)	Capsidproteine	"pMD2.G Lenti"
Plasmid 3 (DNA 3)	Hilfsproteine	"psPAX2 Lenti"

Tabelle 4: Plasmide zur Herstellung des Lentiviruses "Per2-Luc-Lentivirus"

Plasmid 1 (DNA 1)) "gene of interest" "pPer2-Luc Le	
Plasmid 2 (DNA 2)	Capsidproteine	"pMD2.G Lenti"
Plasmid 3 (DNA 3)	Hilfsproteine	"psPAX2 Lenti"

Die plasmidtragenden Bakterien wurden auf die vorbereiteten Agarplatten beimpft. Am Folgetag wurden 5 ml LB-Medium in Reagenzgläser vorpipettiert und mit Ampicillin (100 μ g/ml) versetzt. Anschließend konnten die einzelnen Kolonien in das Medium überführt und für einen Tag bei 37 °C auf eine Rüttlerplatte gestellt werden. Ein Teil der Bakterien wurde für die Minipräparation (Miniprep) genutzt und abzentrifugiert. Der andere Teil wurde mit 200 ml LB-Medium und 0,2 ml Ampicillin (100 μ g/ml) expandiert und für die Midipräparation (Midiprep) vorbereitet.

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)

Für die Extrahierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma QIAGEN verwendet. Es wurde sich an das entsprechende Protokoll des Herstellers gehalten. Die Miniprep wurde genutzt, um eventuelle Kontaminationen aufzudecken und dann die Kultivierung der Plasmide mit Hilfe von *E. coli* zu wiederholen.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Midiprep)

Für die Extrahierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde das NucleoBond Xtra Midi Kit der Firma Macherey und Nagel genutzt. Es wurde entsprechend des Herstellerprotokolls verfahren.

2.3.4 Photometerkontrolle

Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen und um zu überprüfen, ob die extrahierte DNA kontaminiert war, wurden die Absorptionen der DNA bei 260 und 280 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers ("Epoch", BioTek) gemessen (Programm: Nucleic Acid Quantification, Probentyp: cdDNA, Leerwert: H₂O, Menge: 2 µl).

2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese kann Aufschluss über die Größe extrahierter DNA-Stücke geben und ob es bei der Herstellung der Plasmide zu Kontaminationen gekommen ist. In Abhängigkeit der Größe wandert die DNA dabei unterschiedlich schnell durch das elektrische Feld in der Gelelektrophorese. Als Referenzmaß wurde eine 1 kb DNA-Leiter der Firma New England Biolabs ausgewählt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.

Tabelle 5: Inhaltsangabe des Agarosegel

Agarose-Pulver (Ultra Pura Agarose 1 %)	4 g
TAE-Puffer	400 ml
(40 mM Trisacetat, 1 mM EDTA, pH: 8,2-8,4)	

Tabelle 6: Inhaltsangabe für die Gelelektrophorese

DNA (bei DNA Konzentrationen um die 500 ng/ul)	2 µl
DNA-Beladungstinte	2 µl
H ₂ O	8 µl

2.3.6 Die Wirtszelllinie HEK293T

HEK-Zellen ("Human Embyronic Kidney") werden bevorzugt für die Expression fremder Proteine genutzt, da sie einfach zu handhaben, serumfrei gezüchtet werden und sehr effizient transfiziert werden können (128).

Bevor sie auf die Petrischalen (\emptyset = 10 cm) mit einem Poly-D-Lysin (PDL) bedeckten Boden gegeben werden konnten, wurden die HEK293T-Zellen (Petrischale, \emptyset = 6 cm) gesplittet. Dazu wurde das Medium abpipettiert und mit 1 ml dPBS (siehe Tab. 18) gewaschen. Danach wurde 1 ml Trypsin (0,05 %) hinzugegeben und die Petrischale für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Parallel dazu wurde eine neue Petrischale (Ø = 10 cm) mit standardisiertem Nährmedium bestehend aus DMEM, FBS (10 %) und Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) vorbereitet (siehe Punkt 2.4.1). Unter Berücksichtigung der benötigten Verdünnung (1:4) und der Einberechnung der Grundfläche (Faktor 2,78) wurde ermittelt, welches Volumen benötigt wurde, um genügend Zellen in die neue Petrischale zu transferieren. Je nach Verdünnung wurden anschließend die Zellen 2-5 Tage im Inkubator (HeraTherm, Thermo Scientific) bei 37 °C belassen, bis sie zu 50-80 % konfluierten. Danach konnten die HEK293T-Zellen auf die PDL-beschichteten Petrischalen gegeben werden. Dafür wurde das Nährmedium abpipettiert, mit 1 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin versetzt. Nach 5 Minuten im Inkubator wurden die Zellen nach erneuter Verdünnungsberechnung tröpfchenweise auf die Petrischalen gegeben. Um eine erfolgreiche Transfektion zu ermöglichen, mussten sich die Wirtszellen um 50-80 % anreichern.

2.3.7 Transfektion der Wirtszelle

Die Transfektion erfolgte nach der Protkollvorlage des Xfect Transfection Reagents von Clontech. Für eine Petrischale (\emptyset = 10 cm) wurden 20-40 µg DNA benötigt. Das Volumen für die DNA-Verdünnung mit dem Xfect-Reaktionspuffer betrug 600 µl. Anschließend wurden die HEK293T-Zellkulturen mit der endgültigen Plasmidlösung beimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Plasmidlösung von den Zellkulturen abpipettiert und mit neuem Nährmedium (10 ml) aufgefüllt. Bei 37 °C wurde dann für einen weiteren Tag inkubiert.

Tabelle 7: Inhaltsangabe Mikrozentrifugenröhrchen 1

DNA " <i>pBLuF</i> "	15 µg
DNA "pPax2"	10 µg
DNA " <i>pMD2.G</i> "	5 µg
Xfect-Reaktionspuffer	600 µl

Tabelle 8: Inhaltsangabe Mikrozentrifugenröhrchen 2

Xfect-Polymer	9 µl
Xfect-Reaktionspuffer	600 µl

2.3.8 Ernten des Lentiviruses

Das komplette Medium wurde aus der Petrischale abpipettiert und bei 4 °C gekühlt. Die Zellkultur wurde mit 10 ml Nährmedium versetzt. Dieser Vorgang erfolgte 24 Stunden später erneut. Im Anschluss konnte das Lenti-X Concentrator-Protokoll von Clontech genutzt werden, um das Lentivirus aus der Lösung heraus zu konzentrieren. Gelagert wurde das Lentivirus bei -80 °C im S2-Labor.

2.3.9 Transduktion von *Bmal1-Luc-* und *Per2-Luc-*Reportern

Für die Transduktion von *Bmal1-Luc-* und *Per2-Luc-*Lentiviren wurden gesplittete Vorläuferfettzellen (Generation P1) genutzt. Die Nährmedien- und Medienzusätze sind unter Punkt 2.4.1. näher beschrieben, ebenso wie die Isolation von Fettzellen unter Punkt 2.4.2. Für das Beimpfen der *Bmal1-Luc-* oder *Per2-Luc-*Lentiviren mussten sich die Vorläuferfettzellen zu 50-80 % in der Petrischale anreichern. Die Petrischale der P1-

Generation hatte einen 35 mm großen Durchmesser und war mit PDL bedeckt. Die Zellen wurden mit 2 ml Nährmedium versetzt. Für die Virusinfektion wurden 2 µl Polybrene (Hexadimethrinbromid 8 µg/ml) zur Lösung hinzugeben. Danach wurde das Lentivirus tröpfchenweise auf das Medium gegeben und die Petrischale leicht geschwenkt. Die Zellen verblieben einen weiteren Tag im Inkubator. Am nächsten Tag wurde das verbrauchte Medium abpipettiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (je 1 ml) gewaschen, mit neuem Nährmedium versetzt und für 2 weitere Tage inkubiert. Nach insgesamt 72 Stunden und abgeschlossener Transduktion wurden die Vorläuferfettzellen mit 20 µl Dexamethason (100 µM) synchronisiert und für 2 Stunden in den Inkubator gestellt. Nach diesen 2 Stunden wurde das Medium abpipettiert und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Zum Abschluss wurden 10 µl D-Luciferin (1 µM) in das Medium gegeben. Bei diesem Arbeitsschritt war es wichtig, in einem abgedunkelten Raum zu arbeiten, um das D-Luciferin nicht zu oxidieren. Die Ränder der Petrischale wurden mit Silikonfett (Losimol) bedeckt und mit einem Deckgläschen (\emptyset = 40 mm) versiegelt. Im Luminometer (LumiCycle, Actimetrics) konnten dann die Rhythmen in 10-Minuten-Intervallen aufgenommen werden.

2.3.10 RNA-Isolation

Für alle Arbeitsschritte mit RNA wurden sämtliche Geräte, Hilfsmittel und Flächen zuvor mit einer RNA-Dekontaminationslösung gereinigt und besonders darauf geachtet, direkte Kontaminationen zu vermeiden. Die Proben wurden aufgetaut und in Reaktionsröhrchen, welche 6 Keramikkügelchen (Sarstedt) und 500 µl Trizol (Thermo Fisher) enthielten, gegeben. Über den gesamten Zeitraum wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Proben wurden im Homogenisator (BeadRuptor 24, Omni International) aufgeschlossen. Das Programm zum Homogenisieren wurde folgendermaßen eingestellt: S (speed): 5,65; C (cycle): 02; T (duration): 0:20; D (delay): 15. Die homogenisierten Proben wurden in frische 1.5-ml-Reaktionsgefäße gefüllt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde zu den Proben 100 µl Chloroform (Sigma Aldrich) gegeben und miteinander vermischt. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurden die Proben bei 14.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. 3 Phasen waren danach erkennbar. Die obere wässrige Phase wurde in neue 1.5-ml-Reaktionsgefäße pipettiert und mit 300 µl Isopropanol und 1 µl GlyoBlue (Thermo Fisher) versetzt. Nach erneutem Mischen wurden die Proben für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert und dann für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der RNA-Niederschlag mit 500 µl Ethanol (70 %) versetzt. Bei 14.000 rpm und 4 °C wurden die Proben für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag für 5-10 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl Nuklease-freiem Wasser (Promega) aufgenommen. Die RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers (Absorption bei 260/280 nm) (siehe Punkt 2.3.4) gemessen. Die Proben wurden dann bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.11 cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet. 2-3 µg RNA wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl verdünnt und in PCR-Röhrchen gegeben. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 65 °C in einen ThermoCycler (Analytik-Jena) gestellt. Parallel konnte der Reverse Transkriptase-Master-Mix angefertigt werden. 10 µl des Master-Mix' wurden dann zu den 10 µl RNA gegeben und vermischt. Nun konnten die Proben im ThermoCycler in cDNA umgeschrieben werden. Danach wurden die Proben mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt (1:20) und bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 9: Master Mix für die Reverse Transkriptase-Reaktion

Für 1 Probe:	
10x RT Puffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT random Primer	2 µl
MultiScribe RT (50 U/µI)	1 µl
Nuklease-freies Wasser	4,2 µl
Total	10 µl

Tabelle 10: Programm des ThermoCycles für die Reverse Transkriptase-Reaktion

25 °C (1x)	10 min
37 °C (4x)	120 min
85 °C (1x)	5 min
4 °C	∞

2.3.12 Quantitative *Real-time*-PCR (qPCR)

Für die Bestimmung der mRNA-Expression von ausgewählten Genen wurde der GoTaq qPCR Master Mix von Promega genutzt. SYBR Green diente dabei als fluoreszierender Farbstoff. Die Primerpaare wurden zuvor mittels linearer Regression einer Standardkurve und mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (1:10, 1:40, 1:160, 1:640, 1:2.560) auf ihre

Amplifikationseffizienz hin validiert. Akzeptabel waren dabei Duplikationseffizienzen zwischen 90 und 110 %. Für die relative Quantifizierung wurde eine Normalisierung von 3 Referenzgenen vorgenommen. Daraus resultierend, wurde für das epididymale und braune Fettgewebe der Mittelwert aus *Eef1a*, *Gapdh* und β -Actin als Referenzgen genutzt. Für das subkutane Fettgewebe wurde der Mittelwert von Eef1 α und Gapdh gewählt. Während des Pipettiervorganges stand die 96-Loch-PCR-Mikrotiterplatte auf einem eisgekühlten Ständer. Auch die Substrate waren auf Eis gelagert. Zuerst wurde der Primer-Mix vorbereitet. Anschließend wurden 5 µl DNA in die Löcher der PCR-Platte vorgelegt und 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Währenddessen wurde der Master-Mix fertiggestellt. 15 µl des Master-Mixes wurden zu der DNA gegeben. Abschließend wurde ein Klebefilm auf die PCR Platte geklebt, gevortext und nochmals 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Amplifikationsprotokoll wurde dann im Thermocycler (CFX-96 Touch, BioRad) gestartet. Durch anschließenedes Erhitzen mit 0,5 °C/s auf 90 °C wurden die Schmelzkurven der Produkte bestimmt, welche für die Beurteilung der Produktspezifität wichtig waren. Für die Datenanalyse wurde die BioRad CFX-Software verwandt. Automatisch wurden die Detektionsschwellwerte gemessen (CT-Werte). CT-Werte über 38 wurden als "nicht exprimiert" betrachtet. Für das braune Fettgewebe wurden CT-Werte bis 40 zugelassen, da sonst keine Datenauswertung möglich gewesen wäre. Die relative Quantifizierung wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT- Methode berechnet (115).

Tabelle 11 Inhaltsangabe des Primer-Mix'

Primer forward (100 µM)	14 µl
Primer reverse (100 µM)	14 µl
Nuklease-freies Wasser	972 µl

Tabelle 12: Inhaltsangabe des Master-Mix'

Primer-Mix (1.4 mM)	5 µl
SYBR-Mix	10 µl

Tabelle 13: Standard Amplifikationsprogamm des Thermocyclers

94 °C (1x)	5 min
94 °C (40x)	15 sec
60 °C (40x)	15 sec
72 °C (40x)	20 sec
72 °C (1x)	5 min

Tabelle 14: Primerpaare

Gen	Primer forward / DNA Sequenz	Primer reverse / DNA Sequenz
Bmal1	5'-TGACCCTCATGGAAGGTTAGAA-3'	5'-CAGCCATCCTTAGCACGGT-3'
Per2	5'-GCCAAGTTTGTGGAGTTCCTG-3'	5'-CTTGCACCTTGACCAGGTAGG-3'
Per1	5'-TGGCTCAAGTGGCAATGAGTC-3'	5'-GGCTCGAGCTGACTGTTCACT-3'
Clock	5'-GTGGTGACTGCCTATCCTACCT-3'	5'-AAGGAGGGAAAGTGCTCTGTTG-3'
Dbp	5'-AATGACCTTTGAACCTGATCCCGCT-3'	5'-GCTCCAGTACTTCTCATCCTTCTGT-3'
Reverba	5'-AGCTCAACTCCCTGGCACTTAC-3'	5'-CTTCTCGGAATGCATGTTGTTC-3'
Leptin	5'-GAGACCCCTGTGTCGGTTC-3'	5'-CTGCGTGTGTGAAATGTCATTG-3'
Adiponectin	5'-GCAGGCATCCCAGGACATC-3'	5'-GCGATACATATAAGCGGCTTCT-3'
Nesfatin	5'-GGACAAGACCAAAGTACACAACA-3'	5'-CCGCTCCTTATCTCCTCTATGT-3'
Visfatin	5'-GCAGAAGCCGAGTTCAACATC-3'	5'-TTTTCACGGCATTCAAAGTAGGA-3'
Hsl	5'-GGCTCACAGTTACCATCTCACC-3'	5'-GAGTACCTTGCTGTCCTGTCC-3'
Atgl	5'-CAACGCCACTCACATCTACGG-3'	5'-TCACCAGGTTGAAGGAGGGAT-3'
Eef1α	5'-TGCCCCAGGACACAGAGACTTCA-3'	5'-AATTCACCAACACCAGCAGCAA-3'
Gapdh	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3'
β-Actin	5'-CCCTGAAGTACCCCATTGAA-3'	5'-AGGTGTGGTGCCAGATCTTC-3'

2.4 Zellkultur

2.4.1 Medien und Medienzusätze

Tabelle 15: Medium für die HEK293T Zellen

DMEM
FBS (10 %)
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)

Tabelle 16: Medium für die Vorläuferadipozyten

DMEM
HEPES (15 mM)
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)
Gentamicin (50 µg/ml)
Glutamin (2 mM)

Tabelle 17: Medium für epididymale, subkutane und braune Fettgewebsbiopsien

DMEM
HEPES (15 mM)
FBS (10 %)
Adenosin (50 nM)
BSA (10 g/ml)
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)
Glutamin (2 mM)
Insulin (20 nM)

Tabelle 18: Medienzusätze

Medienzusatz	Funktion
Dexamethason (100 µM)	Synchronisation der Zellrhythmen
Luciferin (1 µM)	Substrat der Luciferase
Polybrene (Hexadimethrinbromid) (8 µg/ml)	Polymer; erleichtert Eintritt des Viruses in die Zelle
Kollagenase (1 mg/ml)	Enzym; dient der Verdauung von Fettgewebe
FBS (10 %)	Serum; enthält Wachstumsfaktoren
dPBS (NaCl 8000 mg/l, KCl 200 mg/l, Na₂HPO₄ 1150 mg/l, KH₂PO₄ 200 mg/l, MgCl₂6H₂O 100 mg/l, CaCl₂ 100 mg/l)	Puffer; säubert das Medium
Trypsin-EDTA 0,05%	Digestion von Proteinen
Trypanblau	Diazofarbstoff; Bestimmung der Zelllzahl

2.4.2 Isolierung der Vorläufer- und reifen Adipozyten

Das perigonadale Fett wurde aus je 3 *PER2::LUC*-Mäusen oder aus 3 Wildtyp- Mäusen entnommen. Aus den *PER2::LUC*-Mäusen wurden die Vorläufer- und reifen Fettzellen isoliert. Aus den Wildtyp-Mäusen wurden nur die Vorläuferfettzellen benötigt. Versuchsbeginn war täglich um 10 Uhr (ZT 5). Die Tiere wurden zügig durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde der Bauchraum der Tiere eröffnet und das perigonadale Fett abpräpariert. In einem 50 ml Röhrchen (Falcon, Thermo Fisher) wurde das Fett in kaltem DMEM aufgefangen. Unter dem Abzug wurde das Fett gesäubert und von Haaren oder Gefäßen abgetrennt. Mehrmalige Waschvorgänge mit kaltem DMEM ermöglichten ein Präparat frei von Gefäßen, Nerven und Haaren. Das Fettgewebe wurde während dieses Vorgangs in 8-27 mm³ große Stücke geschnitten. Ein weiteres 50-ml-Röhrchen wurde mit 1 ml DMEM versehen und mit den Fettgewebsstücken bestückt. Zu dieser Lösung kamen 100 µl Kollagenase (1 mg/dl). Für 45 Minuten verblieb das Röhrchen auf den Rüttler, der auf 37 °C temperiert war (Infors AG). Nach 20 Minuten

wurde das Röhrchen etwa 10x durch Auf- und Abpipettieren nochmals gemischt und für die restliche Zeit wieder auf die Rüttlerplatte gestellt. Parallel dazu wurde ein weiteres 50ml-Gefäß mit einer Netzeinlage vorbereitet. Das digestierte Fettgewebe wurde in dieses Röhrchen gegeben und mit 1 ml FBS (10 %) befüllt. Auch das vorherige Gefäß wurde mit 1 ml FBS ausgespült und zu der übrigen Lösung gegeben. Danach konnte das Netz herausgenommen und das Röhrchen bei 200 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Nach diesem Vorgang konnte man deutlich 3 unterschiedliche Phasen in der Lösung erkennen. Die obere, weiße, dickflüssige Phase beinhaltete die reifen Fettzellen. Die mittlere Phase war klar und konnte verworfen werden. Unten am Boden befand sich eine rötliche Masse, welche die Vorläuferfettzellen beinhaltete. Unter vorsichtigem Arbeiten wurde die obere Phase langsam abgenommen und in ein 15-ml-Röhrchen gegeben. Erneut wurden circa 5 ml DMEM zu dem alten 50-ml-Röhrchen gegeben. Beide Röhrchen wurden abermals für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert, um restliche Fettzellen darzustellen. Zwei 35-mm-Petrischalen wurden bereitgestellt. Für die Vorläuferfettzellen wurden speziellen Petrischalen verwendet (Falcon tissue culture dish, Thermo Fisher).

Für die Vorläuferfettzellen wurde das obere Medium mit einer Glaspipette abgenommen, so dass nur noch der unten sichtbare Zellklumpen vorhanden blieb. 1 ml Nährmedium wurde in das Röhrchen gegeben und mitsamt den Zellen auf- und in die Petrischale hineinpipettiert. Mit einem weiteren Milliliter Medium wurde das 50-ml-Gefäß gespült, von restlichen Zellbestandteilen befreit und auf die Petrischale gegeben.

Der Überstand mit den reifen Adipozyten wurde vorsichtig mit einer Glaspipette aufgenommen, bis nur noch die weiße Phase übrig blieb. Diese Zellen wurden mit einer Pipettenspitze auf die Petrischale übertragen. Die Petrischale beinhaltete bereits 1 ml reifes Fettzellmedium. Mit einem weiteren Milliliter Medium wurden das 15-ml-Gefäß und die Glaspipette gesäubert. Auch dieser Milliliter wurde dann vorsichtig zu der restlichen Zellmenge gegeben. Beide Petrischalen wurden anschließend im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

2.4.3 Zellkultur der Vorläuferadipozyten

Nach der Isolation der Vorläuferfettzellen wurde am nächsten Tag die Zellkultur mit PBS gewaschen und mit neuem Nährmedium versetzt. Bis zur Konfluenz von 50-80 % wurden die Zellen alle 2 Tage mit dem Vorläuferzellmedium gefüttert. Anschließend wurden sie zur P1-Generation aufgesplittet. War auch dort das Wachstum in der Petrischale auf 50-80 % vorangeschritten, konnte der nächste Arbeitsschritt mit den Zellen eingeleitet

werden. Bei den Wildtyp-Präparaten erfolgten anschließend die Transduktion des Lentiviruses und die Luminometermessung (siehe Punkt 2.3.9). Die Vorläuferadipozyten aus den *PER2::LUC*-Mäusen wurden für 2 Stunden mit 20 µl Dexamethason (100 µM) synchronisiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit neuem Zellmedium bestückt. Das Substrat der Luciferase, D-Luciferin (1 µM), wurde dem Medium beigemischt (10 µl). Der Rand der Petrischale wurde mit Silikonfett bedeckt und mit einem Deckgläschen versiegelt. Danach schloss sich die 7-tägige Messung im Luminometer an.

2.4.4 Splitten der konfluierenden Vorläuferadipozyten

Für die P1-Generation wurden Petrischalen (\emptyset = 35mm) mit PDL vorbereitet. Die P0-Generation wurde mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin versetzt. Nach 5 Minuten im Inkubator wurde das Zellmedium aufpipettiert und in ein bereits vorbereitetes Röhrchen gegeben. Dieses 50-ml-Röhrchen beinhaltete bereits 2 ml des Vorläufermediums. 5 Minuten lang wurden die Zellen bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Vorläufermedium aufgenommen. Um die genaue Zellzahl zu ermitteln, wurden 50 µl Zelllösung und 50 µl Trypanblau in ein Eppendorfgefäß gegeben. 10 µl der verdünnten Lösung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Auf den 4 Großquadraten wurden die lebenden Zellen gezählt. Das beste Ergebnis wurde mit 5 x 10⁵ Zellen erreicht. Anschließend konnten die berechnete Zellmenge und das Nährmedium auf die neuen Petrischalen gegeben werden.

2.4.5 Zellkultur der reifen Adipozyten

Die reifen Fettzellen der transgenen *PER2::LUC*-Mauslinie wurden 24 Stunden nach der Isolation für 2 Stunden mit Dexamethason (100 μ M) synchronisiert. Mit Hilfe einer Glaspipette wurde das Medium danach entfernt und durch frisches Medium ersetzt. D-Luciferin (10 μ M) wurde dem Nährmedium beigefügt. Der Rand der Petrischale wurde mit Silikonfett bestrichen und mit einem Deckgläschen versehen. Danach wurden die Zellen für 7 Tage bei 32,5 °C im Luminometer gemessen.

2.4.6 Isolierung des epididymalen, braunen und subkutanen Fettgewebes

Für eine Messung im Luminometer wurde jeweils eine *PER2::LUC*-Maus benötigt. Die Mäuse wurden standardisiert um 10 Uhr (ZT 5) mit Genickbruch getötet. Anschließend konnte mit der Fettgewebsentnahme begonnen werden. Für das braune Fettgewebe wurde der Interscapularaum eröffnet. Das trapezförmige braune Fettgewebe konnte daraufhin leicht abpräpariert werden. Zügig wurde dann das Fettgewebe im Bauchraum lokalisiert. Epididymales Fettgewebe wurde entnommen. Anschließend konnte das Unterhautfettgewebe oberhalb und seitlich der Leistenregion gewonnen werden. Alle Fettgewebsbiopsien wurden im kalten DMEM aufbewahrt. Unter dem Abzug wurden die Fettstücke gesäubert, mehrmals mit DMEM gewaschen und von Haaren und Gefäßen befreit. Für jede Fettgewebsart wurde eine Petrischale (\emptyset = 35 mm), welche 2 ml Medium enthielt, vorbereitet. Die Biopsien wurden auf die unterschiedlichen Petrischalen verteilt. In jede Petrischale wurden 2 µl D-Luciferin (1 µM) gegeben. Die Ränder der Schale wurden mit Silikonfett und einem Deckgläschen versehen. Danach wurden die Zellen für 7 Tage bei 32,5 °C im Luminometer gemessen. (Beginn der Messung 11 Uhr).

2.5 Aufnahme von Rhythmen mit Hilfe des Luminometers

Die Lumineszenzmessungen wurden mit Hilfe des LumiCycles der Firma Actimetrics durchgeführt. Das Luminometer befand sich während der Messungen in einem 32,5 °C warmen Inkubator. Alle Zellen und Fettgewebsbiopsien befanden sich für 7 Tage im Luminometer. Für die Datenauswertung wurde das "LumiCycle Analysis"-Programm (Version 2.40, Actimetrics) genutzt. Mit Hilfe des genannten Programmes war es möglich, Parameter wie Periode, Phase und Dämpfung von Schwingungen durch Anpassung einer gedämpften Sinuskurve an Grundsignal-subtrahierte (24-h-Durchschnitt) Datenreihen zu bestimmen. Für die Bestimmung der Phasenlage wurde das erste und zweite Maximum der Regressionskurve ausgewählt.

2.6 Datenauswertung

Für die Datenauswertung wurde das Programm Prism 5.0 (GraphPad) genutzt. Bei allen Versuchen handelte es sich um unabhängige Stichproben. Da es sich bei den Versuchen um relativ kleine Versuchsgruppen handelte (n = 4), konnten keine Normalverteilungstests angewendet werden. Da jedoch keine Decken- oder Bodeneffekte auftraten und auch sonst keine Hinweise auf veränderte Distributionen vorlagen, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Proben, um normalverteilte Ergebnisse handelte. Bei einem Vergleich von 2 Stichproben wurde daher der zweiseitige, ungepaarte t-Test ausgewählt. Für den Vergleich von 3 unabhängigen Stichproben wurde eine 1-Weg-ANOVA mit Tukeys Posttest zum Gruppenvergleich verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Auswertung der Genexpressionsrhythmik wurde CircWave verwendet (110). Dabei wurde für alle 24-Stundenintervalle ein eigener p-Wert bestimmt. Das Signifikansniveau betrug α = 0,05. Somit wurden p-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Endogene Rhythmen des epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebes

Shostak *et al.* konnten mit Hilfe eines Serum-Schocks zirkadiane Rhythmen *in vitro* in epididymalen, subkutanen und peritonealen Fettgewebsbiopsien von *PER2::LUC*-Mäusen nachweisen (157). In diesem Teil der Arbeit sollten diese Ergebnisse zunächst bestätigt und so die Methodik etabliert werden. Der Fokus lag dabei auf epididymales, subkutanes und braunes Fettgewebe (Abb. 3, 4, 5).

Die Periodenlänge der PER2::LUC-Rhythmik bei epididymalen Fettgewebe in vitro betrug 26,0 h (\pm 0,39 h), die bei subkutanem Fettgewebe 26,5 h (\pm 0,78 h) und bei braunem Fettgewebe 25,4 h (\pm 0,52 h). Im Vergleich waren die Periodenlängen jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 6A). Auch die Dämpfungen waren in allen drei Gewebetypen nicht statistisch verändert. Die Dämpfungsraten lagen allesamt zwischen 1,2 d und 1,4 d (eWAT: 1,3 d \pm 0,13 d, s.c.WAT: 1,2 d \pm 0,15 d, BAT: 1,4 d \pm 0,19 d) (Abb. 6B). Die Phasenlage wurde anhand der Lage des ersten und zweiten Maximums in der Regression der Luciferase-Rhythmik bestimmt. Das epididymale Fettgewebe zeigte ein erstes Maximum bei 3,1 h (\pm 0,37 h) nach Isolierung. Für subkutane Fettstücke lag dieses bei 7,1 h (\pm 1,0 h). Das erste Maximum des braunen Fettgewebes wurde im Schnitt erst bei 10,0 h (\pm 0,87 h) erreicht. Im Vergleich war die Phasenlage des epididymalen im Vergleich zu dem braunen sowie zu dem subkutanen Fettgewebe statistisch signifikant unterschiedlich. Diese Signifikanzen blieben auch für das zweite erhalten. epididymale Fettgewebe Maximum Das erreichte sein nächstes Aktivitätsmaximum bei 28,4 h (\pm 0,35 h) nach Isolierung, das subkutane Fettgewebe bei 33,2 h (\pm 1,6 h) und das braune Fettgewebe bei 35,0 h (\pm 1,1 h) (Abb. 6C, 6D).

Somit konnte der Versuch von Shostak *et al.* reproduziert werden. Auch ohne zusätzliche Synchronisation zeigten sich endogene, zirkadiane Rhythmen in allen drei Gewebsarten. Unterschiede zwischen den Depots zeigten sich dabei primär in der Phasenlage; Periodik und Dämpfung waren zwischen den untersuchten Depots weitesgehend vergleichbar.


Repräsentative PER2::LUC-Aktivitätsrhythmen einzelner Biopsien des epididymalem Fettgewebes der PER2::LUC-Knock in-Mäuse in vitro. Die Rohdaten wurden mit Hilfe eines gleitenden Mittelwertes über 24 Stunden normalisiert.



Repräsentative PER2::LUC-Aktivitätsrhythmen einzelner Biopsien des subkutanen Fettgewebes der PER2::LUC-Knock in-Mäuse in vitro. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des gleitenden Mittelwertes über 24 Stunden normalisiert.



Repräsentative PER2::LUC-Aktivitätsrhythmen der einzelnen Biopsien des braunen Fettgewebes der PER2::LUC-Knock in-Mäuse in vitro. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des gleitenden Mittelwertes über 24 Stunden normalisiert.



A) Periodenlängen der PER2::LUC-Rhythmik des epididymalen (eWAT), sukutanen (s.c. WAT) und braunen (BAT) Fettgewebes von PER2::LUC-Knock in-Mäusen in vitro (n= 4).

B) Dämpfungsraten der PER2::LUC-Rhythmik des epididymalen (eWAT), subkutanen (s.c. WAT) und braunen (BAT) Fettgewebes von PER2::LUC-Knock in-Mäusen in vitro (n= 4).

C & D) Phasenlagen (C - 1. Maximum; D – 2. Maximum) von der PER2::LUC-Rhythmik des epididymalen (eWAT), sukutanen (s.c. WAT) und braunen (BAT) Fettgewebes von PER2::LUC-Knock in-Mäusen in vitro (n=4).

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. * = $p \le 0.05$, ** = $p \le 0.01$, *** = $p \le 0.001$, ns = nicht signifikant. Die Daten wurden mit Hilfe von 1-Weg-ANOVAs mit Tukey-Posttest ausgewertet.

3.2 Endogene Rhythmen von Vorläufer- und reifen Fettzellen der *PER2::LUC-*Mäuse

Dass das weiße Fettgewebe eine endogene zirkadiane Rhythmik aufweist, konnte der vorherige Versuch bestätigen. Doch existieren diese Rhythmen sowohl in reifen Adipozyten als auch in deren Vorläuferstufen? Um diese Frage zu beantworten, wurden die Vorläufer- und reifen Adipozyten aus dem perigonadalen weißen Fettgewebe isoliert, getrennt kultiviert und nach Synchronisierung deren PER2::LUC-Rhythmik bestimmt (Abb. 7,8). Dabei zeigte sich für die Vorläuferfettzellen eine Periodenlänge von 24,5 h (\pm 0,43 h) und für die reifen Adipozyten eine Periodenlänge von 27,9 h (\pm 0,58 h). Damit waren die Periodenlängen von beiden signifikant unterschiedlich (Abb. 9A).

Auch die Dämpfungsraten beider Zellarten waren statistisch signifikant unterschiedlich. Die Vorläuferadipozyten zeigten eine Dämpfung ihrer Rhythmik um 50 % innerhalb von 1,4 d (\pm 0,11 d). Die reifen Zellen dagegen zeigten bereits nach 0,6 d (\pm 0,03 d) einen um 50 % gedämpften Rhythmus (Abb. 9B).

Bei den Vorläuferfettzellen lag das erste PER2::LUC-Maximum bei 14,2 h (\pm 0,49 h) nach Synchronisation; für die reifen Fettzellen lag es bereits bei 7,9 h (\pm 0,71 h) nach Synchronisation. Damit waren die Phasenlagen der beiden Zelltypen signfikant unterschiedlich (Abb. 9C). Die Analyse des zweiten Maximums bestätigte dieses Ergebnis: Die Vorläuferadipozyten erreichten das zweite Maximum bei 38,5 h (\pm 0,56 h), die reifen Adipozyten bei 35 h (\pm 0,50 h) nach Synchronisation (Abb. 9D).

Zusammenfassend zeigten sich sowohl in den Vorläuferfettzellen als auch in den reifen Fettzellen der *PER2::LUC*-Mäuse endogene, zirkadiane Rhythmen. Die Charakterisitk dieser Rhythmik (Periode, Dämpfung, Phasenlage) war jedoch sehr verschieden mit längerer Periodik, verstärkter Dämpfung und früherer Phasenlage in den reifen Adipozyten.



Repräsentative PER2::LUC-Aktivitätsrhythmen der Vorläuferadipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe der PER2::LUC-Knock in-Mäuse in vitro. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des gleitenden Mittelwertes über 24 Stunden normalisiert.



Repräsentative PER2::LUC-Aktivitätsrhythmen der reifen Adipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe der PER2::LUC-Knock in-Mäuse in vitro. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des gleitenden Mittelwertes über 24 Stunden normalisiert.



Abb. 9

A) Periodenlängen der PER2::LUC-Rhythmik der Vorläufer- und reifen Adipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe von PER2::LUC-Knock in-Mäusen nach Synchronisation mit Dexamethason in vitro (n= 4).

B) Dämpfungsraten der PER2::LUC-Rhythmik der Vorläufer- und reifen Adipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe von PER2::LUC-Knock in-Mäusen nach Synchronisation mit Dexamethason in vitro (n= 4).

C & D) Phasenlagen (C - 1. Maximum; D – 2. Maximum) der Vorläufer- und reifen Adipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe von PER2::LUC-Knock in-Mäusen nach Synchronisation mit Dexamethason in vitro (n=4).

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. ** = $p \le 0,01$, *** = $p \le 0,001$. Die Daten wurden mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten t-Testes ausgewertet.

3.3 Endogene Rhythmen von Vorläuferfettzellen der Wildtypen

In reifen sowie Vorläuferfettzellen von *PER2::LUC*-Mäusen konnten endogene zirkadiane Rhythmen in der PER2::LUC-Aktivität – und damit der Proteinexpression von PER2 – *in vitro* festgestellt werden. Der folgende Versuch sollte untersuchen, ob diese endogenen Rhythmen sich auch in Wildtyp-Mäusen und mit Hilfe anderer Uhren-Reporter nachweisen lassen.

Dazu wurden Adipozyten-Vorläuferzellen aus Wildtyp-Mäusen entweder mit einem lentiviralen Bmal1-Luciferaseoder *Per2-Luciferase*-Reporter infiziert. um die Oszillationen der transkriptionellen Aktivierung des Bmal1- bzw. des Per2-Gens nach Synchronisierung sichtbar zu machen (Abb. 10, 11). Dabei zeigten die Zellen mit beiden Reportern vergleichbare Periodenlängen von knapp 24 h (Bmal1-Luc-Lv: 23,9 h ± 0,17 h, *Per2-Luc-Lv*: 23,8 h \pm 0,53 h) (Abb. 12A). Die Dämpfungsraten lagen für *Bmal1-Lucinfizierte* Vorläuferadipozyten bei 2,7 d (\pm 0,27 d) und für *Per2-Luc-infizierte* Vorläuferadipozyten bei 3,2 d (\pm 1,1 d) nach Synchronisation. Es wurde eine statistische Signifikanz erreicht (Abb 12B). Die Bmal1-Luc-positiven Vorläuferadipozyten erreichten ihr erstes Maximum 16,4 h (\pm 1,16 h) und die *Per2-Luc-positiven* Vorläuferadipozyten 12,7 h (± 0,81 h) nach Synchronisation. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant (Abb. 12C). Auch die Phasenlagen der zweiten Maxima zeigten statistisch signifikante Unterschiede: Die Bmal1-Luc-Vorläuferadipozyten lagen dabei bei 41,2 h (\pm 1,1 h), die *Per2-Luc*-Vorläuferadipozyten bei 36,6 h (\pm 0,89 h) nach Synchronisation (Abb. 12D). Somit konnte auch in den Vorläuferadipozyten der Wildtypen eine zirkadiane Rhythmik in vitro mit vergleichbarer Periodenlänge und Dämpfungsrate festgestellt werden. Unterschiede gab es – erwartungsgemäß – in der Phasenlage (107). Die beiden Reporter lagen dabei 4 - 5 h auseinander.



Repräsentative BMAL1::LUC-Aktivitäsrhythmen der Vorläuferadipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe der Wildtyp-Mäuse in vitro. Die Vorläuferadipozyten wurden zuvor mit einem Bmal1-Luciferase-Reporter (Bmal1-Luc-Lv) infiziert.

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des gleitenden Mittelwertes über 24 Stunden normalisiert.



Repräsentative PER2::LUC-Aktivitätsrhythmen der Vorläuferadipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe der Wildtyp-Mäuse in vitro. Die Vorläuferadipozyten wurden zuvor mit einem Per2-Luc-Reporter (Per2-Luc-Lv) infiziert.

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des aleitenden Mittelwertes über 24 Stunden normalisiert



Abb. 12

A) Periodenlängen der Bmal1-Luc- oder Per2-Luc-infizierten Vorläuferadipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe der WIIdtypen nach Synchronisation mit Dexamethason in vitro (n= 4).

B) Dämpfungsraten der Bmal1-Luc- oder Per2-Luc-infizierten Vorläuferadipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe der WIIdtypen nach Synchronisation mit Dexamethason in vitro (n= 4).

C & *D*) Phasenlagen (*C* - 1. Maximum; *D* – 2. Maximum) der Bmal1-Luc- oder Per2-Luc-infizierten Vorläuferadipozyten aus dem perigonadalen Fettgewebe der WIldtypen nach Synchronisation mit Dexamethason in vitro (n= 4).

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. * = $p \le 0,05$, ns = nicht signifikant. Die Daten wurden mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten t-Testes ausgewertet.

3.4 Genexpressionsdaten von unterschiedlichen Fettgeweben der *PER2::LUC-Mäuse in vitro*

Dass Uhrengene in dem Fettgewebe rhythmisch exprimiert werden, konnten bereits einige Studien aufzeigen (10,112,192). Ob diese Gene auch *in vitro* rhythmisch exprimiert werden, wenn sie von dem SCN, Lichteinfluss oder rhythmischer Nahrungszufuhr getrennt werden, war bis zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Die Reporter-Daten aus den vorhergehenden Experimenten legten eine Expressionsrhythmik zumindest für *Per2* und *Bmal1* nahe (Abb. 10, 11, 12). Um diese Ergebnisse zu validieren und auf andere Uhrengene zu erweitern, wurden Genexpressionsprofile aus dem epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebe *in vitro* untersucht. Über 48 h wurden alle 6 h Aliquots der Zellen aus der Zellkultur entnommen und mittels qPCR auf die Expression von Uhrengenen hin untersucht.

3.4.1 Bestimmung von Referenzgenen

Eine Voraussetzung für die optimale Analyse der Genexpressionsrhythmik von Uhrengenen ist eine konstante Expression der verwendeten Referenzgene. Um eventuelle Oszillationen der Haushaltsgene in den verschiedenen Geweben auszuschließen, wurden drei unterschiedliche, häufig verwendete Referenzgene $Eef1\alpha$, *Gapdh* und β -*Actin* in ihrer zirkadianen Expressionsrhythmik miteinander verglichen (Abb. 13). Dabei zeigte Gapdh in epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebsproben relativ zu den anderen Genen eine weitestgehend zeitunabhängige Expression, so dass davon ausgegangen wurde, dass es nicht rhythmisch exprimiert wird. Dies wurde auch statistisch bestätigt. *Eef1a* verhielt sich ähnlich wie *Gapdh*. Eine zirkadiane Rhythmik bestand nicht. β -Actin zeigte in dem epididymalen und in dem braunen Fettgewebe eine ebenfalls weitestgehend konstante Expression und keine zirkadiane Rhythmik, so dass das Haushaltsgen für diese beiden Fettgewebsarten einbezogen werden konnte. Allein in dem subkutanen Fettgewebe konnte eine zirkadiane Rhythmik für den zweiten Tag relativ zu *Eef1* α festgestellt werden (Abb.13A, 13B). Daher konnte β -Actin nicht als Referenzgen für das subkutane Fettgewebe herangezogen werden. In dem epididymalen und braunen Fettgewebe wurden somit die Referenzgene Eef1 α , Gapdh und β -Actin verwendet. Für das subkutane Fettgewebe wurden die Haushaltsgene Eef1 α und Gapdh als Referenz eingesetzt.



Abb. 13

A) Normalisierung der Referenzgene Eef1 α und β -Actin.

Die Abbildung zeigt die Normalisierungen der relativen mRNA Expressionen der Gene Eef1 α und β -Actin in dem epididymalen (eWAT), subkutanen (s.c.WAT) und braunen (BAT) Fettgewebe (n = 6).

B) Normalisierung der Referenzgene β -Actin und Gapdh.

Die Abbildung zeigt die Normalisierungen der relativen mRNA Expressionen der Gene Gapdh und β -Actin in dem epididymalen (eWAT), subkutanen (s.c.WAT) und braunen (BAT) Fettgewebe (n = 6).

C) Normalisierung der Referenzgene Eef1 α . und Gapdh.

Die Abbildung zeigt die Normalisierungen der relativen mRNA Expressionen der Gene Gapdh und Eef1 α in dem epididymalen (eWAT), subkutanen (s.c.WAT) und braunen (BAT) Fettgewebe (n = 6).

Über 24 Stunden wurden alle 6 Stunden Proben aus der Zellkultur entnommen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. ** = $p \le 0,01$, ns = nicht signifikant. Für die statistische Auswertung der Tagesprofile wurde das Programm CircWave genutzt.

3.4.2 Uhrengenexpressionen des epididymalen Fettgewebes

Bmal1, als ein Gen des positiven Schenkels, zeigte in dem epididymalen Fettgewebe in vitro eine zirkadiane Rhythmik an beiden Tagen (Abb. 14). Am zweiten Tag befanden sich das Minimum bei 30 h und das Maximum bei 42 h nach Isolierung. Für den dritten Tag lagen diese bei 48 h bzw. bei 60 h nach Isolierung. Betrachtete man den negativen Schenkel, also Per2, so lag sein Maximum für den zweiten Tag bei 30 h. Eine statistische Signifikanz zeigte sich für den zweiten Tag zwar nicht, jedoch ließ sich ein Trend dahingehend ausmachen. Für den dritten Tag bestand ebenfalls keine signifikante zirkadiane Rhythmik. Ein weiteres Glied des positiven TTL-Schenkels ist Clock. Seine Minimal- und Maximalwerte für den zweiten Tag lagen, wie bei Bmal1, bei 30 und 42 h. Am dritten Tag präsentierte sich ein ähnliches Bild. Allerdings bot Clock weder am zweiten noch am dritten Tag eine statistische Signifikanz für eine rhythmische Expression. Per1, als ein Teil des negativen Schenkels, war an Tag 2 deutlich rhythmisch exprimiert. Für den dritten Tag ließ sich keine statistische Signifikanz ausmachen. Wie Per2 hatte auch Per1 sein erstes Maximum bei 30 h. Das Per1-Minimum an Tag 2 lag bei 36 h nach Isolierung. In dem zirkadianen System sind *Dbp* und *Rev-erb* α Teile der Rückkopplungsschleifen. Sie zeigen als E-Box-kontrollierte Gene in vielen Geweben eine den Pers ähnliche Expressions-Rhythmik (14,137). Dbp in dem epididymalen Fettgewebe zeigte für den zweiten Tag eine zirkadiane Rhythmik. Dessen Maximalwert lag bei 30 h, der Minimalwert bei 24 h nach Isolierung. Für den dritten Tag war ein Maximum und Minimum kaum auszumachen, so dass auch keine statistische Signifikanz zu ermitteln war. Rev-erb α wurde wie Dbp am zweiten Tag rhythmisch exprimiert. Auch sein Maximalwert lag bei 30 h nach Isolierung. Bei 42 h nach Isolierung befand sich sein Minimalpunkt. *Rev-erb* α war am dritten Tage nicht rhythmisch exprimiert.

Zusammenfassend zeigten die Gene *Bmal1*, *Per1*, *Dbp* und *Rev-erbα* eine zirkadiane Rhythmik in dem epididymalen Fettgewebe *in vitro*. Diese zirkadiane Rhythmik war vornehmlich am zweiten Tag zu erkennen, mit der typischen antiphasischen Phasenlage für *Clock/Bmal1* im Vergleich zu den E-Box-regulierten Genen. Für *Per1* und *Clock* waren diese Rhythmen allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant. An Tag 3 ließen sich nur noch für *Bmal1* signifikante Rhythmen nachweisen.



Relative mRNA-Expressionen der Uhrengene Bmal1, Per2, Clock, Per1, Dbp und Rev-erb α in dem epididymalen Fettgewebe von Wildtypen in vitro. Über 48 Stunden wurden alle 6 Stunden Proben aus der Zellkultur entnommen (n = 6). Als Referenzgene wurden Eef1 α , Gapdh und β -Actin ausgewählt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. * = $p \le 0,05$, ** = $p \le 0,01$, ns = nicht signifikant. Für die statistische Auswertung wurde das Programm CircWave genutzt. Es wurden zwei Tagesprofile (Tag 2 & 3 nach Isolation) getrennt analysiert. Für die bessere Darstellung wurde eine

3.4.3 Uhrengenexpressionen des subkutanen Fettgewebes

Auch in dem subkutanen Fettgewebe zeigte das Uhrengen Bmal1 eine zirkadiane Expressionsrhythmik (Abb. 15). Am zweiten Tag wurden ein Maximum bei 30 h und ein Minimum bei 42 h nach Isolierung ermittelt. Bmal1 erreichte am dritten Tag kein statistisches Signifikanzniveau. Per2 verhielt sich zu Bmal1 in dem subkutanen Fettgwebe nicht antiphasisch. Dennoch konnte eine signifikante zirkadiane Rhythmik der Per2-Expression für den zweiten Tag verzeichnet werden. Der Maximalwert lag dabei bei 30 h und der Minimalwert bei 42 h. Die Per2-Rhythmik erzielte keine statistische Signifikanz am dritten Tag. Clock erreichte, ähnlich wie Bmal1, einen Maximalwert bei 30 h und einen Minimalwert bei 42 h für den zweiten Tag. Eine signifikante Rhythmik konnte aber an beiden Tagen nicht gezeigt werden. Die Per1-Rhythmik erreichte am zweiten Tage keine statistische Signifikanz. Am dritten Tage konnte Per1 ein Erhöhung bei 60 h erzielen, welches auch Per2 aufzeigen konnte, dennoch zeigte sich keine statistische Signifkanz. *Dbp* zeigte eine zirkadiane Expressionsrhythmik am zweiten Tag. Der Maximalwert wurde bei 30 h und der Minimalwert bei 42 h erreicht. Am dritten Tag konnte für Dbp keine statistische Signifikanz erreicht werden. Für *Rev-erb* α konnte weder am zweiten noch am dritten Tag eine statistische Signifikanz verzeichnet werden.

Abschließend konnten die Gene *Bmal1*, *Per2* und *Dbp* für den zweiten Tag in dem subkutanen Fettgewebe *in vitro* eine zirkadiane Rhythmik aufweisen. *Bmal1* und *Per2* zeigten jedoch keine antiphasische Phasenlage. Für *Clock, Per1* und *Rev-erb* α waren keine signifikanten Expressionsrhythmiken feststellbar. Am dritten Tag erreichte keiner der Uhrengene statistische Signifikanzen.







Abb. 15

Relative mRNA-Expressionen der Uhrengene Bmal1, Per2, Clock, Per1, Dbp und Rev-erb α in dem subkutanen Fettgewebe von Wildtypen in vitro. Über 48 Stunden wurden alle 6 Stunden Proben aus der Zellkultur entnommen (n = 4-6). Als Referenzgene wurden Eef1 α und Gapdh ausgewählt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. * = $p \le 0,05$, ** = $p \le 0,01$, ns = nicht signifikant. Für die statistische Auswertung wurde das Programm CircWave genutzt. Es wurden zwei Tagesprofile (Tag 2 & 3 nach Isolation) getrennt analysiert. Für die bessere Darstellung wurde eine gestrichelte Trennlinie gezogen.

3.4.4 Uhrengenexpressionen des braunen Fettgewebes

Analog zu dem epididymalen und subkutanen Fettgewebe wurde auch in dem braunen Fettgewebe nach rhythmischen Uhrengenexpressionen gesucht. *Bmal1* zeigte im Verlauf des zweiten Tages mehrere Maximalwerte (30 h, 42 h). Am dritten Tag konnte ein Maximum bei 54 h erreicht werden (Abb. 16). Dennoch ließ sich keine statistisch signifikante Expressionsrythmik nachweisen. Auch bei *Per2* zeigten sich mehrere Maxima am zweiten Tag (30 h, 42 h). Der dritte Tag wies eine ähnliche Phasenlage auf wie der zweite Tag. Für beide Tage konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden. Des Weiteren zeigten *Bmal1* und *Per2* keine antiphasische Lage. Für das Uhrengen *Clock* konnte an keinen der beiden Tage ein statistisch signifikanter zirkadianer Rhythmus erreicht werden.

Per1 erzielte am zweiten Tag ein deutliches Maximum bei 30 h und hatte eine ähnliche Phasenlage wie *Per2*. Dennoch war *Per1* weder am zweiten noch am dritten Tag statistisch signifikant verändert. *Dbp* und *Rev-erba* als Teile der erweiterten Rückkopplungsschleifen zeigten weder am zweiten noch am dritten Tag eine signifikante zirkadiane Rhythmik. Zusammenfassend wurden in dem braunen Fettgewebe an keinen der beiden Tage Uhrengene oder Rückkopplungsgene rhythmisch *in vitro* exprimiert.



Abb. 16

Relative mRNA-Expressionen der Uhrengene Bmal1, Per2, Clock, Per1, Dbp und Rev-erb α in dem braunen Fettgewebe von Wildtypen in vitro. Über 48 Stunden wurden alle 6 Stunden Proben aus der Zellkultur entnommen (Bmal1, Per1, Dbp, Reverb α n = 3 – 6; Per2, Clock n = 1 – 6). Als Referenzgene wurden Eef1 α , Gapdh und β -Actin ausgewählt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. ns = nicht signifikant. Für die statistische Auswertung wurde das Programm CircWave genutzt. Es wurden zwei Tagesprofile (Tag 2 & 3 nach Isolation) getrennt analysiert. Für die bessere Darstellung wurde eine

3.4.5 Genexpressionen von Adipokinen und Enzymen des epididymalen Fettgewebes

Die Uhrengenexpressionenanalyse in den drei Fettgewebsarten konnte darlegen, dass das epididymale Fettgewebe hinsichtlich der Rhythmik das stabilste Verhalten aufwies. Vor allem am zweiten Tag zeigte sich für die meisten Uhrengene eine robuste zirkadiane Rhythmik und auch die Phasenlagen der einzelnen TTL-Komponenten zueinander entsprachen weitestgehend denen aus anderen Geweben (10,107,157,192). Daher wurden die Proben der ersten 42 h des epididymalen Fettgewebes für weitere Analysen herangezogen. Untersucht wurden dabei die physiologisch interessanten Expressionen der Adipokine und der Lipolysen-Schritttmacherenzyme *Hormon-sensitive Lipase* und *Adipozyten-Triglycerid-Lipase*. Dass die Gene von *Leptin, Adiponectin* und *Visfatin in vivo* rhythmisch exprimiert werden, konnte bereits gezeigt werden (56,72,112).

In vitro wies die *Leptin*-mRNA-Expression ein Maximum bei 30 h nach Isolierung auf; der Rhythmus konnte aber keine statistische Signifikanz erreichen (Abb. 17). Auch *Adiponectin* zeigte ein erhöhtes Expressionsniveau bei 30 h nach Isolierung. Es konnte jedoch ebenfalls keine signifikante Rhythmik ermittelt werden. *Visfatin* blieb über die 42 h der Untersuchung weitestgehend unverändert in seiner Expression. *Nesfatin* zeigte ein ähnliches Expressionsverhalten wie *Leptin* und *Adiponectin*. Sein Maximalwert trat bei 30 h nach Isolierung auf. Aber auch der *Nesfatin*–Rhythmus blieb unter dem Signifikanz-Niveau. Die Genexpressionsdaten der Enzyme *Hsl* und *Atgl* wurden bereits in einer früheren Studie erfasst (157). Die dort ermittelte Rhythmik konnte in diesem Versuch allerdings nicht reproduziert werden. Die *Hsl*–mRNA zeigte ein Maximum bei 36 h, war allerdings nicht signifikant rhythmisch. Die *Atgl*-Expression hatte ein Maximum bei 24 h und nahm danach stetig ab.

Abschließend konnte für keines der untersuchten Adipokine *in vitro* eine endogen zirkadiane Rhythmik nachgewiesen werden. Auch die mRNA-Expression der beiden Enzyme *Hsl* und *Atgl* zeigte keine statistisch signifikante Rhythmik *in vitro*.





Relative mRNA Expressionen der Adipokine Leptin, Adiponectin, Visfatin und Nesfatin sowie der Enzyme Hormon-sensitive Lipase (Hsl) und Adipozyten-Triglycerid-Lipase (Atgl) in dem epididymalen Fettgewebe von Wildtypen in vitro. Über 24 Stunden wurden alle 6 Stunden Proben aus der Zellkultur entnommen (n = 6). Als Referenzgene wurden Eef1 α , Gapdh und β -Actin ausgewählt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. ns = nicht signifikant. Für die statistische Auswertung wurde das Programm CircWave genutzt

4 Diskussion

4.1 Überblick über die Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, endogen regulierte zirkadiane Rhythmen in dem Fettgewebe darzustellen. Mit Hilfe der transgenen Mauslinie (*PER2::LUC*) war es möglich, zirkadiane Rhythmen des epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebes in Zellkultur sichtbar zu machen. Des Weiteren zeigten auch die Vorläuferadipozyten und die reifen Adipozyten der *PER2::LUC*-Mäuse zirkadiane Oszillationen. Diese Ergebnisse konnten mithilfe lentiviraler Luciferase-Konstrukte unter Kontrolle der *Bmal1*- und *Per2*- Promotoren in Wildtyp-Zellen bestätigt werden. Zudem wurden in epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebs-Kulturen Rhythmen in den Uhrengenen *Bmal1*, *Per2*, *Per1*, *Clock*, *Dbp* und *Rev-erbα* per qPCR detektiert. Zusätzlich wurden die Genexpressionen einiger Adipokine sowie von *Hsl* und *Atgl* im epididymalen Fettgewebe unter *in vitro* Bedingungen gemessen. Dabei konnten endogene, zirkadiane Rhythmen in den diversen Fettgewebsarten dargestellt werden, die auf eine wichtige Rolle der Adipozytenuhr bei der Regulation metabolischer Prozesse hindeuten.

4.2 Zirkadiane Rhythmen des epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebes

Viele *in vivo* Studien weisen bereits zirkadiane Rhythmen u.a. in dem epididymalen, inguinalen oder braunen Fettgewebe nach (10,192). Mit Hilfe der transgenen Mauslinie (*PER2::LUC*), die einen an das Uhrenprotein PER2-gekoppelten Luciferace-Reporter exprimiert, konnten Yoo *et al.* erstmals zirkadiane Rhythmen in unterschiedlichen Gewebearten identifizieren. Über 7 d war es damals möglich, robuste und kontinuierliche Schwingungen in dem SCN, in Kornea, Leber und Niere *in vitro* mit Hilfe des Luminometers aufzuzeichnen (187). Shostak *et al.* arbeiteten an der Darstellung von molekularen Uhrenaktivitäten in dem epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebe (157). Ihnen war es mit der Methode von Yoo *et al.* gelungen, endogene zirkadiane Rhythmen unter *in vitro* Bedingungen in dem Fettgewebe zu detektieren. Die vorliegende Arbeit reproduzierte diese Ergebnisse zunächst. Während Shostak *et al.* noch zusätzlich einen Serumschock mit FBS nutzten, um die Oszillationen darzustellen, wurde in dem aktuellen Versuch auf die direkte Synchronisation der Zellen verzichtet. Die *PER2::LUCIFERASE*-Aktivitätsrhythmen, welche mit einem Luminometer aufgezeichnet

wurden, zeigten deutliche Schwingungen über 70 - 140 h (Abb. 3, 4, 5). Die endogenen Periodenlängen der drei Fettgewebsarten waren nicht statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 6). Der damalige Versuch wies kürzere Periodenlängen von 24,5 -25,5 h auf und konnte einen Unterschied in der Periode zwischen eWAT und BAT nachweisen. Dass dies im jetzigen Versuch nicht erkennbar war, könnte an der fehlenden Resynchronisation des Gewebes liegen. Auch die Dämpfungen waren im Mittel mit 1,2 -1,4 d nach Isolierung früher erreicht als im damaligen Versuch. Depletionen von D-Luciferin oder Nährstoffen beeinflussen die Dämpfungsraten (178,179,185,187). Möglicherweise könnten so unterschiedliche Mengen an D-Luciferin oder auch andere Nährstoffmedien zu den früher einsetzenden Dämpfungen geführt haben. Die Phasenbestimmungen zeigten signifikante Unterschiede zwischen eWAT und BAT sowie eWAT und s.c.WAT. Die diversen Funktionen der Fettgewebsarten und deren metabolische Aktivitäten könnten u.a. dazu geführt haben. Es ist vorstellbar, dass das eWAT eine frühere Phase erreichen muss, da es deutlich gesteigerte endokrine und metabolische Funktionen im Vergleich zu den beiden anderen Fettarten aufweist (35,63,173). Außerdem ist die unterschiedliche Lage im Körper eine weitere Möglichkeit wie es zu den Phasenverschiebungen kommen konnte. Da es sich in diesem Versuch um reine Fettbiopsien handelte, ist es durchaus möglich, dass Störfaktoren wie Gefäße, Nerven und Endothelzellen die Periodenlänge, Dämpfung und die Phasenlage beeinflusst haben. Dennoch ist festzuhalten, dass es mit Hilfe der transgenen PER2:LUC-Mauslinie gelungen ist, ohne vorherige Synchronisation der Fettbiopsien endogene zirkadiane Rhythmen darzustellen. Losgelöst u.a. von dem SCN, von der Nahrungsaufnahme und der Umgebungstemperatur konnten über Tage hinweg Oszillationen in allen drei Fettgewebsarten aufgezeichnet werden.

4.3 Zirkadiane Rhythmen von Vorläufer- und reifen Fettzellen der *PER2::LUC-*Mäuse

Um Diskrepanzen, die durch Störfaktoren wie Gefäße oder Nervenzellen entstehen, zu vermeiden, wurde versucht, in isolierten Fettzellen endogene Rhythmen darzustellen. Dabei wurden jeweils aus den *PER2::LUC*-Mäusen Vorläufer- sowie reife Fettzellen aus dem perigonadalen Fettgewebe isoliert, kultiviert und anschließend die *PER2::LUC*-Aktivitätsrhythmen im Luminometer aufgenommen (Abb. 7, 8). Nach Auswertung der Daten konnten zirkadiane Rhythmen, signifikant veränderte Perioden- und Phasenlängen sowie Dämpfungen in den beiden Zellarten festgestellt werden (Abb. 9). Die reifen Fettzellen erreichten eine deutlich längere Periodendauer, aber dafür eine frühere

Phasenlage als die Vorläuferfettzellen. Vermutlich könnten die diversen Aufgabengebiete der Fettzellen diese Ergebnisse bedingen. Die reifen Fettzellen übernehmen die Hauptfunktionen des Fettgewebes (53,71,92) und erfordern möglicherweise daher andere Perioden-und Phasenlängen. Auch die deutlich früher einsetzende Dämpfung kann in diesem Zusammenhang stehen. Reife Fettzellen benötigen für ihre vielfältigen Aufgaben ausreichend Energie (71). In Zellkultur kam es aber zu einem raschen Nährstoffverbrauch, da das Nährmedium während der Aufzeichnung nicht erneuert wurde, und so der erste Zellzerfall einsetzte. Eine Erklärung, warum auf das Wechseln des Nährmediums verzichtet worden war, geben Studien, die zeigen, dass das Wechseln des Mediums weitere Synchronisationen auslösen kann und damit zu einer Phasenverschiebung führt (61,178,179,185). Des Weiteren kann aber auch die einmalige Synchronisation der Zellen Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben. Es ist nicht exakt zu klären, wie jeder Zelltyp auf die Dexamethason-Dosen reagiert hat. Studien beweisen auch, dass Dexamethason, zumindest in 3T3-L1-Adipozyten, eine Differenzierung von Vorläuferadipozyten zu reifen Adipozyten auslösen kann (101). Auch das subkutane Fettgewebe von Ratten wird durch Dexamethason stimuliert. In den Adipozyten-Progenitor-Zellen entstehen durch diesen Reiz u.a. reife Fettzellen (8). Insgesamt ist bis jetzt wenig über Lumineszenzmessungen in Vorläufer- und reifen Fettzellen bekannt. Lediglich in anderen Zellarten wurden mit Hilfe der PER2::LUC-Mäuse zirkadiane Rhythmen verzeichnet. So gibt es beispielsweise Lumineszenzaufnahmen in primären Hepatozyten. Diese Hepatozyten zeigen stabile Rhythmen über Wochen. Zwar kam es dort auch zur verstärkten Dämpfung der Amplitude, doch durch kontinuierliche Medienwechsel konnten die Schwingungen weiter aufrechtgehalten werden (61).

Letztlich konnten in der vorliegenden Arbeit zirkadiane Rhythmen in den Vorläufer- und reifen Fettzellen identifiziert werden. Die unterschiedlichen Perioden-, Phasenlängen und auch Dämpfungen deuten aber auch darauf hin, dass jeder Zelltyp, abhängig von seinen individuellen Funktionen, einen eigenen, spezifischen Rhythmus aufweisen muss.

4.4 Zirkadiane Rhythmen von Wildtyp-Vorläuferfettzellen

Nachdem in den Vorläuferfettzellen der transgenen *PER2::LUC*-Mäuse deutliche Oszillationen detektiert werden konnten, wurde des Weiteren versucht, in Vorläuferfettzellen des perigonadalen Fettgewebes von Wildtypen endogene Rhythmen mit Hilfe von *Bmal1-Luc-* und *Per2-Luc*-Reportern nachzuweisen. Diese Methode wurde erst selten an Vorläuferfettzellen von Wildtypen erprobt. Bis jetzt gibt es nur vereinzelte *in vitro* Studien an Vorläuferfettzellen, die allesamt jedoch der Darstellung von Uhrengenexpressionen dienen. In diesen waren rhythmische Expressionen in *Per2, Reverba* und *Dbp* gefunden worden. Aber weder in *Per1, Cry1, Bmal1* noch in metabolischen Genen waren zirkadiane Rhythmen nachgewiesen worden (112).

Umso wichtiger erscheint es, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Methodik kontinuierliche Schwingungen in beiden Zelltypen, je nach Uhrengen, aufzeigen konnte (Abb. 10, 11).

Die Perioden waren bei beiden nicht statistisch signifikant verändert und deren Längen waren mit knapp 24 h in etwa so lang wie die Tagesperiodik der Menschen (Abb. 12) (12). Die beiden Zelltypen wiesen unterschiedliche Dämpfungsraten auf. Dabei wurden die Bmal1-Luc-Vorläuferadipozyten etwas stärker gedämpft als die Per2-Luc-Vorläuferadipozyten. Auch in diesem Versuch wurde auf den Mediumwechsel während der Messungen verzichtet, so dass der Verbrauch der Nährstoffe als Ursache für eine starke Dämpfung herangezogen werden kann. Demnach scheint das lentivirale Bmal1-Luc-Konstrukt einen höheren Nährstoffverbrauch als das Per2-Luc-Konstrukt zu besitzen. Signifikante Unterschiede zeigten die Phasenlagen der Bmal1-Luc- und Per2-Luc-Vorläuferfettzellen. Dabei erreichten die Per2-Luc-Vorläuferadipozyten stets eine frühere Phase als die Bmal1-Vorläuferadipozyten. Dieses antiphasische Verhalten von Bmal1 und Per2 konnte bereits die Gruppe um Oishi mit Hilfe von mRNA-Daten in dem SCN der Ratten aufdecken (107). Auch in dem Fettgewebe der Mäuse konnte die Antiphase beider Gene detektiert werden. Zvonic et al. wiesen mRNA-Expressionen von Bmal1 mit einem Zenit bei ZT 0 und einem Nadir bei ZT 12 sowie von Per2 mit einem Zenit bei ZT 12 und einem Nadir bei ZT 0 nach (192). Eine weitere wichtige Rolle bei der Beurteilung der Ergebnisse spielt u.a. der Vorgang der Virustransduktion. Zum einen löst das Beimpfen der Zellen mit einem Virus einen enormen Zellstress aus (149), zum anderen verbraucht die Luciferase einen Anteil des ATPs, welches den Zellen normalerweise alleine zur Verfügung steht (24,45,121,187). Diese Faktoren könnten somit Veränderungen in Periodenlängen, Phasenverschiebungen und Dämpfungen verursacht haben. Ebenso ist es möglich, wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, dass auch die Zellen der Wildtypen durch die Synchronisation mit Dexamethason beeinflusst worden sind. So

könnte auch hier der Dexamethasonreiz zu einer Differenzierung der Vorläuferfettzellen zu reifen Fettzellen geführt haben (8).

Zusammenfassend zeigte der Versuch, dass Präadipozyten eine endogene zirkadiane Rhythmik aufwiesen. Das deutet darauf hin, dass in Zellen auch ohne Differenzierung endogene Uhren existieren. Außerdem wurden mit Hilfe dieser Methode zirkadiane Rhythmen der Uhrengene *Bmal1* und *Per2 in vitro* nachgewiesen.

4.5 Uhrengenexpressionen des epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebes

Um auch auf molekularer Ebene endogene zirkadiane Rhythmen zu detektieren, wurden Uhrengenexpressionen mit Hilfe der *real-time*-PCR gemessen. Dafür wurden Fettbiopsien aus dem epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebe isoliert und für einen Tag kultiviert. Anschließend wurden die Genexpressionen für *Bmal1*, *Per2*, *Per1*, *Clock* sowie *Dbp* und *Rev-erbα* nach 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h, 54 h und 60 h bestimmt.

In dem epididymalen Fettgewebe der Wildtypen konnten überwiegend am zweiten Tag zirkadiane Expressionen der Uhrengene festgestellt werden (Abb. 14). Dabei wies der positive Schenkel der Uhrengene mit Bmal1 und Clock ähnliche Minimal- und Maximalphasen für den zweiten und dritten Tag auf. Obwohl Clock eine Tendenz zur zirkadianen Rhythmik zeigte, wurde nur *Bmal1* signifikant rhythmisch exprimiert. Beide Uhrengene verzeichneten jedoch ein antiphasisches Verhalten im Bezug zu Per1 und Per2. Die Ergebnisse von Bmal1 und Clock ähnelten den Ergebnissen der in vivo Studie von Zvonic et al.. Auch dort konnte eine rhythmische Expression von Bmal1 nachgewiesen werden, während Clock nicht rhythmisch exprimiert war (192). Die Zenitund Nadirangaben von Bmal1 im Zvonics Versuch (Zenit: 0 h, 24 h, 48 h; Nadir: 12 h, 36 h) waren vergleichbar mit der *in vivo* Studie von Ando *et al.*, die jedoch nur 4 Messpunkte über 24 h nutzten (10). Der aktuelle Versuch wies unterschiedliche Höchstwerte auf. Nach 24 h konnte nur eine leichte Erhöhung verzeichnet werden. Das Maximum war nach 42 h und das Minimum nach 30 h für den zweiten Tag erreicht. Es scheint so, dass es zu einer leichten Phasenverschiebung bei den in vitro Daten im Vergleich zu den in vivo Daten gekommen ist. Das mag zum einen an der eigentlichen Isolierung liegen, welche wie eine Art Serumschock auf die Zellen gewirkt haben könnte (14). Zum anderen können die Zellen aber auch anders gestört worden sein. Bei jeder Probeentnahme waren die Zellen von ihrer gewohnten Umgebung getrennt. Sie waren in diesen Minuten anderen Verhältnissen, z.B. Temperatur- und Lichtveränderungen, ausgesetzt. Per1 und Per2 als Teile des negativen Uhrengenschenkels wiesen identische Maximalphasen für den

zweiten Tag auf und waren im Vergleich zu den *in vivo* Studien phasenverschoben. Sie erreichten wie Bmal1 und Clock ihre Maximalwerte 6 h früher. Dennoch wurde nur Per1 am zweiten Tag signifikant rhythmisch exprimiert. Neben den Hauptrückkopplungsschleifen existieren weitere Mechanismen, welche die Uhrengene beeinflussen können. Rev-erb α ist beispielsweise in der Lage, Bmal1 zu inhibieren, während *Bmal1* seinerseits *Rev-erba* aktiviert (4,122). Diese Aktivierungs- und Deaktivierungsprozesse ließen sich auch in den erhobenen Expressionsdaten wiederfinden. Rev-erba wies die gleiche Phasenlage wie Per1/2 auf und war damit antiphasisch zu *Bmal1* und *Clock*. Da *Rev-erb* α u.a. an der Regulierung der Lipogenese beteiligt ist (53), erscheint es umso wichtiger, dass es am zweiten Tag rhythmisch exprimiert wurde. Im Vergleich zu den *in vivo* Daten zeigte $Rev-erb\alpha$ eine leicht verspätete Phasenlage. Das kann auch in dem Isolierungsprozess begründet sein. Es ist außerdem möglich, dass unterschiedliche Hormone oder auch Zytokine des Fettgewebes an der Regulation der zirkadianen Rhythmik beteiligt waren (29,166) und beispielsweise zu Phasenverschiebungen beitrugen. Zum zirkadianen Netzwerk gehören auch Uhrenkontrollierten Gene wie zum Beispiel Dbp (134). Dbp ist in der Lage, die zirkadiane Rhythmik an dem Herzen, in der Leber oder in den Nieren zu beeinflussen (39,51,182). Dbp wird u.a. vom Heterodimer BMAL1/CLOCK aktiviert. Dies zeigte auch der durchgeführte Versuch. Dbp wies ein antiphasisches Verhalten im Bezug zu Bmal1 und Clock auf. Der in der Literatur bekannte Mechanismus, dass DBP die Transkription von Per1 induziert (183), konnte hier nicht reproduziert werden. Es zeigten sich gleiche Maximalwerte bei 30 h. Abschließend waren die zirkadianen Rhythmen dieser Uhrengene vornehmlich am zweiten Tag sichtbar. Es ist denkbar, dass einige Fettzellen in Kultur wegen des Verzichts auf ein Mediumwechsel- bereits nach 48 h abgestorben waren und eine sinnvolle Rhythmusanalyse für den dritten Tag dadurch nicht mehr möglich war.

Die Datenlage im Bezug auf Uhrengenexpressionen des subkutanen Fettgewebes ist aktuell noch unzureichend erforscht. Es sind lediglich Studien vorhanden, die in subkutanen Biopsien von Frauen und Männern rhythmische Oszillationen der Uhrengene nachweisen konnten (188). In dem aktuellen Versuch konnten einige Uhrengene rhythmisch exprimiert werden (Abb. 15). *Bmal1* sowie *Clock* erreichten die gleichen Maximalwerte am zweiten Tag. Dabei war jedoch nur *Bmal1* signifikant rhythmisch exprimiert. Dennoch konnten weder *Bmal1* noch *Clock* ein antiphasisches Verhalten im Bezug auf die *Per-* Gene aufzeigen. *Per2* wies zwar für den zweiten Tag eine zirkadiane Rhythmik auf, besaß dabei aber fast eine identische Phasenlage wie *Bmal1* und konnte somit die in der Literatur bekannten Ergebnisse nicht erneut wiedergeben (107). *Per1* verzeichnete weder am zweiten noch am dritten Tag eine signifikante zirkadiane Rhythmik. *Rev-erbα* war ähnlich wie *Per1* nicht rhythmisch exprimiert. Lediglich *Dbp*, als

Uhren-kontrolliertes Gen, war am zweiten Tag zirkadian reguliert. Am dritten Tag wurde für *Dbp* zwar ein ähnliches Expressionsmuster wie am zweiten Tag beschrieben, jedoch wurde keine statistisch signifikante Veränderung gezeigt. Dbp erreichte das gleiche Maximum zeitgleich mit *Bmal1* und *Clock*. Somit wäre es theoretisch möglich, dass *Dbp* in dem subkutanen Fettgewebe nicht unter der Kontrolle von BMAL1/CLOCK steht und andere Gene für die Aktivierung von Dbp zuständig sind. Weitere Studien sind notwendig, um diese These zu überprüfen. Wie bereits in dem epididymalen Fettgewebe zeigte auch dieser Versuchsaufbau für den dritten Tag keine relevanten Auslenkungen. Dies deutet u.a. daraufhin, dass die Fettzellen 66 h, ohne einen weiteren Mediumwechsel, nicht überdauern können. Unterstützt wird diese These dadurch, dass den Fettgewebsbiopsien auf der 96-Loch-Mikrotiterplatte nur geringe Mengen Nährmedium für die Dauer von 66 h zu Verfügung standen. Außerdem waren nach 66 h bereits deutliche makroskopische Veränderungen, wie z.B. Farb- und Größenveränderungen, an den Biopsien feststellbar, die in Degenerationsprozessen begründet sein können. Des Weiteren zeigen Studien, dass Zellen in Zellkultur meist stark gedämpft werden (187). Gegen die obengenannte These spricht jedoch auch, dass für einige Zielgene Auslenkungen in dem Expressionsprofil erkennbar waren und somit einige Zellen eventuell noch vital waren. Mikroskopische Aufnahmen von den Biopsien nach 66 h in Zellkultur könnten u.a. diese Problematik überprüfen. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Betrachtung der Ergebnisse ist, dass die Isolierung des subkutanen Fettgewebes aufwändiger war als die des epididymalen Fettgewebes. Deutlich geringere Mengen an s.c. WAT standen im Vergleich zu dem eWAT bei identischer Anzahl an Versuchstieren zur Verfügung.

In dem braunen Fettgewebe der Wildtypen konnten Studien von Zvonic *et al.* gleiche Ergebnisse erzielen wie bereits in dem epididymalen Fettgewebe (siehe Seite 56-57). Die aktuelle *in vitro* Studie konnte keine rhythmischen Uhrengenexpressionsprofile nachweisen (Abb. 16). *Bmal1* und *Clock* zeigten keine einheitlichen Phasen. Schwierig war die Beurteilung auch dadurch, dass es während eines Tagesprofils oft sogar zu zwei Maximalpunkten gekommen war. *Per2* und *Per1* erzielten zwar einen gemeinsamen Maximalwert, dennoch waren diese im Verlauf nicht statistisch signifikant. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Zvonic waren die Maxima von *Per1/2* einige Stunden früher erreicht. Ein antiphasisches Verhalten ließ sich nur in Ansätzen in *Clock* und *Per1/2* darstellen. *Rev-erba*, als ein Teil der externen Rückkopplungsschleife, konnte nicht tagesrhythmisch exprimiert werden und wies stattdessen zwei Maximalwerte auf. Als Uhren-kontrolliertes Gen konnte *Dbp* am zweiten Tag einen Höchstwert bei zirka 42 h erreichen, zeigte aber dennoch keinen signifikanten zirkadianen Rhythmus. Eine annähernde Antiphasik zwischen *Bmal1* und *Dbp* bestand. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Methode zur Detektion von Uhrengenexpressionsprofilen in dem braunen Fettgewebe nur

unzureichend funktionierte. Nur geringe Mengen an braunem Fettgewebe standen für das Experiment zur Verfügung. Es wären deutliche mehr Versuchstiere nötig gewesen, um ausreichend Material zu gewinnen. Braunes Fettgewebe findet man hauptsächlich bei Säuglingen, da diese eine gesonderte Thermoregulierung bedürfen (92,138). In dem aktuellen Versuch waren die Tiere bereits 10 - 12 Wochen alt und hatten möglicherweise dadurch ein geringeres BAT-Depot. Außerdem zeigten hohe Schwankungen innerhalb der Replikate, dass die Methode für das braune Fettgewebe ungeeignet war. Zum Teil konnten nur wenige qPCR-Daten für manche Gene einbezogen werden. Eine weitere Ursache, warum es zu so unterschiedlichen Maximal- und Minimalwerten gekommen war, scheint möglicherweise die hohe Zahl an Versuchstieren gewesen zu sein. Jedes Tier, und damit auch dessen Fettgewebe, besitzt eine eigene individuell regulierte innere Uhr. Die vielen Fettgewebsbiopsien könnten so zu einer scheinbaren Desynchronisation geführt haben, weshalb keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Es bedarf weiterer Forschung, um die Methode zur Analyse von Uhrengenexpressionen in dem BAT unter *in vitro* Bedingungen zu optimieren.

Die vorliegende Arbeit zeigte zirkadiane Uhrengenexpressionen in unterschiedlichen Fettgewebsarten unter *in vitro* Bedingungen. Die in der Literatur bekannten Ergebnisse über das epididymale Fettgewebe konnten in Ansätzen bestätigt werden. In dieser Gewebeart zeigten sich zirkadian regulierende Expressionen für Bmal1, Per1, Dbp und $Rev-erb\alpha$. Diese zirkadiane Kontrolle kann besonders wegen der endokrinen Funktionen des epididymalen Fettgewebes wichtig sein. Durch die zirkadiane Rhythmik in dem eWAT könnten die Produktion und Sekretion bestimmter Hormone oder Enzyme engmaschig reguliert und z.B. an den Bedarf des Körpers angepasst werden. Zum ersten Mal ist es gelungen in dem subkutanen Fettgewebe endogene zirkadiane Rhythmen für Bmal1, Per2 und Dbp festzustellen. Das subkutane Fettgewebe ist für seine mechanischen und thermischen Funktionen sowie für die Energiehomöostase bekannt. Besonders für den Energiebedarf des Körpers könnte die zirkadiane Uhr des subkutanen Fettgewebes eine wichtige Rolle spielen und so die Lipolyse und Lipogenese beeinflussen. In dem braunen Fettgewebe, das hauptsächlich für die Thermogenese des Körpers verantwortlich ist, konnte aktuell keine endogene zirkadiane Rhythmik nachgewiesen werden. Ob das braune Fettgewebe und die Thermogenese im Allgemeinen durch endogene Uhrengene beeinflusst oder reguliert werden, ist derzeit nicht geklärt.

Insgesamt wurde gezeigt, dass Uhrengene unabhängig von externen Einflussfaktoren in dem Fettgewebe exprimiert werden und es damit ein eigenes individuelles und endogenes Uhrwerk in dem Fettgewebe existieren muss.

4.6 Adipokin- und Enzymexpressionen des epididymalen Fettgewebes

Das Fettgewebe ist eines der wichtigsten Organe des Menschen und trägt – neben seiner Funktion als Energiespeicher - mit der Sekretion von Adipokinen wie beispielsweise Leptin, Adiponectin oder Visfatin zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Menschen bei. Die vorliegende Arbeit und bereits veröffentlichte Studien belegen die Existenz von funktionellen zirkadianen Uhren in dem Fettgewebe. Umso interessanter erscheint die These, dass möglicherweise auch die Expressionen und Sekretionen von Hormonen und Enzymen des Fettgewebes lokal zirkadian reguliert werden. Störungen der inneren Uhren in dem Fettgewebe könnten somit bei der Entstehung von Adipositas oder Diabetes Mellitus Typ 2 eine Rolle spielen. Aus diesem Grunde wurde versucht, Genexpressionen von Leptin, Adiponectin, Visfatin und Nesfatin sowie von Hsl und Atgl im Tagesverlauf in Adipozytenkulturen zu messen. Da sich in den vorherigen Experimenten abzeichnete, dass das epididymale Fettgewebe einen relativ robusten zirkadianen Rhythmus besitzt, wurden die mRNA-Profile nur in dem eWAT gemessen. Trotz der Tatsache, dass sich Tendenzen hinsichtlich eines zirkadianen Expressionsprofiles in manchen Adipokinen abbildeten, zeigte keines der 4 untersuchten Adipokine einen signifikanten endogenen Expressions-Rhythmus (Abb. 17). In vivo Studien wiesen jedoch bereits vor einigen Jahren zirkadiane Oszillationen nach. Ando et al. dokumentierten während einer Analyse über 24 h stabile Rhythmen in Adiponectin und Visfatin (10). Des Weiteren deutet die in vitro Studie von Otway, welche Leptinakkumulationen im Zellmedium feststellte, darauf hin, dass Leptin unter lokaler zirkadianer Kontrolle steht (112). Obwohl Nesfatin laut Literaturrecherchen ein wichtiges Glied in der Energiehomöostase des Menschen ist (103,153), konnte bis jetzt keine zirkadiane Expression oder Sekretion des Hormons nachgewiesen werden. Die in dem Versuch untersuchten Transkripte der Enzyme Hsl und Atgl zeigten ebenfalls keine statistisch signifikanten Rhythmen. Die rhythmischen Expressionen von Hsl und Atal in vitro wurden bereits in einer Studie gezeigt (157). Diese Ergebnisse konnten somit hier nicht reproduziert werden. Hsl stellte zwar eine annähernde Phasenlage wie im Shostak-Versuch dar, Atgl erreichte dagegen nur für die ersten 30 h eine ähnliche Phasenlage. In dem damaligen Versuch wurden die Zellkulturen mit Hilfe eines Serumschocks synchronisiert. Da bei der aktuellen Methodik auf die direkte Synchronisation verzichtet worden war, könnte dies ursächlich für die unterschiedliche Datenlage sein. Möglicherweise ist ein sensibleres Verfahren nötig, um endogene mRNA-Profile von Adipokinen zu messen. Beispielsweise könnten die Fettstücke durch die zeitversetzten Probeentnahmen in ihrer Aktivität gestört oder wie weiter oben beschrieben generell gedämpft worden sein (siehe Seite 56-59). Des Weiteren könnten die Expressionsprofile der Hormone und Enzyme durch Störfaktoren beeinflusst worden sein.

In den Fettbiopsien befanden sich u.a. Gefäße, Endothel- und Nervenzellen. Eine Expressionsanalyse wäre daher in einer reinen Zellkultur mit reifen Fettzellen sinnvoller. Außerdem ist bis jetzt ungeklärt, in wie weit das epididymale Fettgewebe die unterschiedlichen Hormone ausschüttet. Es bedarf folglich weiterer Forschung, um die genaue Chronophysiologie von Adipokinen und Enzymen zu verstehen.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden das epididymale, subkutane sowie braune Fettgewebe auf endogene zirkadiane Rhythmen untersucht. Dabei konnten mit Hilfe von PER2::LUC-Knock in-Mäusen und lentiviraler Konstrukte Oszillationen von unterschiedlichen Fettgewebearten sowie von Vorläufer- und reifen Adipozyten grafisch dargestellt werden. Fraglich bleibt weiterhin, ob die Expression sowie Sekretion von Hormonen und die Aktivierung von Enzymen unter lokalen zirkadianen Kontrollen in dem Fettgewebe stehen. In der Zusammenschau wirft die Arbeit aber auch neue Fragen auf, die in der weiteren Forschung geklärt werden müssten. Bis jetzt wurden nur zirkadiane Rhythmen in Vorläufer- und reifen Fettzellen des eWATs aufgezeichnet. Es wäre sinnvoll zu wissen, ob sich die gleichen Prozesse auch in dem s.c. WAT und in dem BAT finden lassen. Außerdem wurden nur Oszillationen in Vorläuferfettzellen der Wildtypen aufgenommen. Wie reife Fettzellen der Wildtypen auf Virustransduktion nicht Die eine reagieren, ist bis jetzt bekannt. Genexpressionsanalyse von Fettbiopsien war zwar für einige Gene in dem eWAT und s.c.WAT erfolgreich, dennoch benötigt es eine neue Methode, um genauere mRNA-Daten zu gewinnen. Es ist dabei vor allem darauf zu achten, eine Methode zu entwickeln, die die Fettzellen länger in Zellkultur überleben lassen, wie zum Beispiel mit Hilfe eines kontinuierlichen Durchflusses des Mediums.

Im Allgemeinen sind Tiermodelle immer nur begrenzt auf den Menschen übertragbar. Das Ziel ist es demnach, an einer Vorgehensweise zu arbeiten, die es gestattet, zirkadiane Rhythmen in dem menschlichen Fettgewebe zu identifizieren. Es sollten Möglichkeiten etabliert werden, um humane Fettgewebsbiopsien zu kultivieren. Diese neuen Forschungsoptionen könnten es ermöglichen, ein klares Bild über die zirkadiane Rhythmik von Fettzellen und deren pathophysiologischen Veränderungen zu schaffen. Das Verständnis über die inneren Uhren des Fettgewebes kann möglicherweise helfen, Diagnostiken und Therapieverfahren bei metabolischen Erkrankungen wie Adipositas oder Diabetes Mellitus Typ 2, z.B. bei Nachtschichtarbeitern, zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Um sich an im Tagesverlauf veränderliche Umweltbedingungen optimal anzupassen, haben die meisten Organismen interne, sog. zirkadiane Uhren (lat.: circa diem = um den Tag herum) entwickelt. Zahlreiche Prozesse im menschlichen Körper werden von diesen Uhren reguliert. Werden die zirkadianen Rhythmen gestört, führt dies zu erheblichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen wie zum Beispiel zu Herz-Kreislauf-Symptomen, zu metabolischen Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes Mellitus Typ 2 und sogar zu Krebs (22). Studien belegen, dass diese Pathologien gehäuft bei Nachtschichtarbeitern auftreten können (40,75,116,145). Der zentrale Schrittmacher des zirkadianen Systems bei Säugetieren befindet sich im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) (43,147,162). Doch nicht nur die Neuronen des SCN exprimieren Uhrengene rhythmisch. Wahrscheinlich tickt in jeder Zelle des Körpers eine eigene zirkadiane Uhr (98). So konnten auch in dem Fettgewebe zirkadiane Uhren gefunden werden (10,192). Des Weiteren ist bereits bekannt, dass genetische Störungen der Adipozytenuhr zur Akkumulation von Triglyceriden führen und damit die Entwicklung von Adipositas begünstigen (118). In Human- und Tierstudien konnten außerdem zahlreiche Adipokine zirkadian rhythmisch sezerniert werden (10,158,159). Ob diese Rhythmen aber lokal durch die Adipozytenuhr oder systemisch reguliert sind, ist bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Fettgewebsarten und deren Fettzellen mit Hilfe von zirkadianen Luciferase-Reporter-Systemen und molekulargenetischen Methoden auf endogene Rhythmen hin untersucht. Es ließen sich deutliche zirkadiane Rhythmen in dem epididymalen, subkutanen und braunen Fettgewebe darstellen. Ebenso konnten in Vorläufer- und reifen Fettzellen Oszillationen von unterschiedlichen Uhrengenen in vitro aufgezeichnet werden. Die Uhrengenexpressionsdaten zeigten für das epididymale und subkutane Fettgewebe ebenfalls endogene Rhythmen. Bisher konnten jedoch keine rhythmischen Expressionen von Adipokinen oder Enzymen unter in vitro-Bedingungen nachgewiesen werden. Zusammenfassend charakterisiert diese Studie zirkadiane endogene Rhythmen und Uhren in drei Fettgewebsarten. Diese Uhren funktionieren unabhängig von dem SCN, von der Nahrungsaufnahme oder anderen systemischen Zeitsignalen in dem Organismus.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Acheson KJ, Gremaud G, Meirim I, Montigon F, Krebs Y *et al.*: Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? The American journal of clinical nutrition 79, 40-46 (2004)
- 2. Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS: Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. The Journal of clinical investigation 101, 1020-1027 (1998)
- 3. Ahmadian M, Wang Y, Sul HS: Lipolysis in adipocytes. The international journal of biochemistry & cell biology 42, 555-559 (2010)
- Akashi M, Takumi T: The orphan nuclear receptor RORα regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. Nature structural & molecular biology 12, 441-448 (2005)
- 5. Akerstedt T, Billiard M, Bonnet M, Ficca G, Garma L *et al.*: Awakening from sleep. Sleep medicine reviews 6, 267-286 (2002)
- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM *et al.*: Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. Current biology 12, 540-550 (2002)
- 7. Albrecht, U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC: A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. Cell 91, 1055-1064 (1997)
- Anayama H, Fukuda R, Yamate J: Adipose progenitor cells reside among the mature adipocytes: morphological research using an organotypic culture system. Cell Biol Int. 39, 1288-1298 (2015)
- 9. Ando H, Oshima Y, Yanagihara H, Hayashi Y, Takamura T *et al.*: Profile of rhythmic gene expression in the livers of obese diabetic KK-A(y) mice. Biochemical and biophysical research communications 346, 1297-1302 (2006)
- 10. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S *et al.*: Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. Endocrinology 146, 5631-5636 (2005)
- 11. Arora S, Anubhuti: Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. Neuropeptides 40, 375-401 (2006)
- 12. Aschoff J: Circadian Rhythms in Man. Science 148, 1427-1432 (1965)
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C *et al.*: Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. Science 289, 2344-2347 (2000)
- 14. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U: A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell 93, 929-937 (1998)

- 15. Barnea M, Madar Z, Froy O: High-fat diet followed by fasting disrupts circadian expression of adiponectin signaling pathway in muscle and adipose tissue. Obesity 18, 230-238 (2010)
- 16. Barrett RK, Takahashi JS: Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. Journal of Neuroscience 15, 5681-92 (1995)
- 17. Bartelt A, Heeren J: Adipose tissue browning and metabolic health. Nature reviews Endocrinology 10, 24-36 (2014)
- 18. Beltowski J: Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? Medical science monitor 12, RA 112-119 (2006)
- 19. Benedict C, Shostak A, Lange T, Brooks SJ, Schiöth HB *et al.*: Diurnal rhythm of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt/visfatin/PBEF): impact of sleep loss and relation to glucose metabolism. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 97, E218-222 (2012)
- 20. Berson DM, Dunn FA, Takao M: Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. Science 295, 1070-1073 (2002)
- 21. Betz MJ, Enerbäck S: Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. Diabetes 64, 2352-2360 (2015)
- 22. Boivin DB, Tremblay GM, James FO: Working on atypical schedules. Sleep Medicine 8, 578-589 (2007)
- 23. Boon MR, van Marken Lichtenbelt WD: Brown Adipose Tissue: A Human Perspective. Handbook of experimental pharmacology 2, 521-526 (2015)
- 24. Branchini BR, Magyar RA, Murtiashaw MH, Anderson SM, Helgerson LC *et al*.: Sitedirected mutagenesis of firefly luciferase active site amino acids: a proposed model for bioluminescence color. Biochemistry 38, 13223-13330 (1999)
- 25. Bray MS, Young ME: Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. Obesity reviews 8, 169-181 (2007)
- 26. Buijs RM, Kalsbeek A: Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. Nature reviews Neuroscience 2, 521-526 (2001)
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA *et al.*: Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. Cell 103, 1009-1017 (2000)
- Buyse M, Bado A, Daugé V: Leptin decreases feeding and exploratory behaviour via interactions with CCK(1) receptors in the rat. Neuropharmacology 40, 818-825 (2001)
- 29. Challet E: Keeping circadian time with hormones. Diabetes Obes Metab. 17, 76-83 (2015)
- Chen M, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF *et al.*: Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 91, 295-299 (2006)

- 31. Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam M *et al.*: Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . Nature 485, 123-127 (2012)
- 32. Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE *et al.*: Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. Journal of Neuroscience 22, 977-990 (2002)
- 33. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S: The hormonal control of food intake. Cell 129, 251-262 (2007)
- 34. Considine RV, Caro JF: Leptin: genes, concepts and clinical perspective. Hormone research 46, 249-256 (1996)
- 35. Cook A, Cowan C: Adipose. Cell 119, 693-705 (2008)
- Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS *et al.*: Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. Science 237, 402-405 (1987)
- 37. Crujeiras AB, Carreira MC, Cabia B, Andrade S, Amil M *et al.*: Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. Life sciences 53, 95-101 (2015)
- Dalamaga M, Christodoulatos GS: Adiponectin as a biomarker linking obesity and adiposopathy to hematologic malignancies. Hormone molecular biology and clinical investigation 23, 5-20 (2015)
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F *et al.*: Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. Genes & development 14, 2950-2961 (2000)
- 40. De Bacquer D, Van Risseghem M, Clays E, Kittel F, De Backer G, *et al.*: Rotating shift work and the metabolic syndrome: a prospective study. International journal of epidemiology 38, 848-854 (2009)
- 41. Després JP: Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. Circulation 126, 1301-1313 (2012)
- Deurveilher S, Semba K: Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. Neuroscience 130, 165-183 (2005)
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U: The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. Annual review of physiology 72, 517-549 (2010)
- 44. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS: Regulation of lipolysis in adipocytes. Annual review of nutrition 27, 79-101 (2007)
- 45. Fan F, Wood KV: Bioluminescent Assays for High-Troughput Screening. ASSAY and Drug Development Technologies 5, 127-136 (2007)
- 46. Fasshauer M, Bluher M: Adipokines in health and disease. Trends in pharmacological sciences 106, 4453-4458 (2015)

- 47. Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, García-Rúa V, Mosquera-Leal A, Otero MF *et al.*: Nesfatin-1 in human and murine cardiomyocytes: synthesis, secretion, and mobilization of GLUT-4.. Endocrinology 154, 4757-4767 (2013)
- 48. Fernandez-Sanchez A , Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A *et al.*: Inflammation, oxidative stress, and obesity. International journal of molecular sciences 12, 3117-3132 (2011)
- 49. Folkard S, Lombardi DA, Tucker PT: Shiftwork: safety, sleepiness and sleep. Industrial health 43, 20-23 (2005)
- 50. Folkard S, Tucker P: Shift work, safety and productivity. Occupational medicine 53, 95-101 (2003)
- 51. Fonjallaz P, Ossipow V, Wanner G, Schibler U: The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences.. The EMBO journal 15, 351-362 (1996)
- 52. Friedman JM, Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395, 763-770 (1998)
- 53. Froy O: Circadian rhythms and obesity in mammals.. ISRN obesity 2012, 437198 (2012)
- 54. Fujikawa T, Coppari R: Living without insulin: the role of leptin signaling in the hypothalamus. Frontiers in neuroscience 9, 108 (2015)
- 55. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M *et al.*: Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. Science 307, 426-430 (2005)
- 56. Gavrila A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL *et al.*: Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88, 2838-2843 (2003)
- 57. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD *et al.*: Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science 280, 1564-1569 (1998)
- Ghantous CM, Azrak Z, Hanache S, Abou-Kheir W, Zeidan A *et al.*: Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. International journal of endocrinology 2015, 534320 (2015)
- 59. Golombek DA, Rosenstein RE: Physiology of circadian entrainment. Physiological reviews 90, 1063-1102 (2010)
- 60. Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J *et al.*: PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARγ. Cell metabolism 12, 509-520 (2010)
- Guenthner CJ, Luitje ME, Pyle LA, Molyneux PC, Yu JK et al.: Circadian Rhythms of PER2::LUC in Individual Primary Mouse Hepatocytes and Cultures. PLoS ONE 9, 1-10 (2014)
- 62. Haider DG, Holzer G, Schaller G, Weghuber D, Widhalm K *et al.*: The adipokine visfatin is markedly elevated in obese children. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 43, 548-549 (2006)
- 63. Hassan M, Latif N, Yacoub M: Adipose tissue: friend or foe? Nature reviews Cardiology 9, 689-702 (2012)
- 64. Hastings MH: Circadian clocks: self-assembling oscillators? Current biology 13, R681-682 (2003)
- 65. Herichova I, Zeman M, Stebelová K, Ravingerová T: Effect of streptozotocininduced diabetes on daily expression of per2 and dbp in the heart and liver and melatonin rhythm in the pineal gland of Wistar rat. Molecular and cellular biochemistry 270, 223-229 (2005)
- 66. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. Journal of biological chemistry 271, 10697-10703 (1996)
- 67. Imbrogno S, Angelone T, Cerra MC: Nesfatin-1 and the cardiovascular system: central and pheripheral actions and cardioprotection. Current drug targets 96, E2045-9 (2015)
- 68. Jensen MD: Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. Journal of clinical endocrinology and metabolism 93, S57-63 (2008)
- 69. Jeyaraj D, Haldar SM, Wan X, McCauley MD, Ripperger JA *et al.*: Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis. Nature 483, 96-99 (2001)
- 70. Johnston JD, Frost G, Otway DT: Adipose tissue, adipocytes and the circadian timing system. Obesity reviews 10, 52-60 (2009)
- 71. Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH, Schneider F: Fettgewebe, in: Histologie, 3. Aufl. Kp. 8, 172-179, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1991)
- 72. Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J *et al.*: The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. Endocrinology 142, 2677-2685 (2001)
- 73. Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V *et al.*: Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. The European journal of neuroscience 12, 3146-3154 (2000)
- Kalsbeek A, van Heerikhuize JJ, Wortel J, Buijs RM: A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. Journal of neuroscience 16, 5555-5565 (1996)
- 75. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B: Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. Occupational and environmental medicine 58, 747-752 (2001)

- Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Boden MJ, Varcoe TJ.: Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative 293, R1528-1537 (2007)
- 77. Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Wight N: Adipokines and adipocyte function in Clock mutant mice that retain melatonin rhythmicity. Obesity 20, 295-305 (2012)
- 78. Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 89, 2548-2556 (2004)
- 79. Kim J, Chung Y, Kim H, Im E, Lee H *et al.*: The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse. Development & Reproduction 18, 301-309 (2014)
- 80. Kishida K, Nagaretani H, Kondo H, Kobayashi H, Tanaka S *et al.*: Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome. Biochemical and biophysical research communications 306, 286-292 (2003)
- 81. Klein J, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M.: Adipose tissue as source and target for novel therapies. Trends in endocrinology and metabolism 17, 26-32 (2006)
- 82. Kraus D, Fasshauer M, Ott V, Meier B, Jost M *et al.*: Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes. The Journal of endocrinology 175, 185-191 (2002)
- 83. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M *et al.*: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. Journal of biological chemistry 277, 25863-25866 (2002)
- 84. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR *et al.*: mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. Cell 98, 193-205 (1999)
- Lamia KA, Storch K, Weitz CJ: Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 15172-15177 (2008)
- Laurencikiene J, Skurk T, Kulyté A, Hedén P, Aström G *et al.*: Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject. Journal of clinical endocrinology and metabolism 96, E2045-2049 (2011)
- 87. Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F *et al.*: Circadian expression of the steroid 15 *α*-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. Molecular and cellular biology 19, 6488-6499 (1999)
- 88. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM: Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. Cell 107, 855-867 (2001)
- 89. Levine JD, Funes P, Dowse HB, Hall JC: Resetting the circadian clock by social experience in Drosophila melanogaster. Science 298, 2010-2012 (2002)
- Levine JD, Weiss ML, Rosenwasser AM, Miselis RR: Retinohypothalamic tract in the female albino rat: a study using horseradish peroxidase conjugated to cholera toxin. Journal of comparative neurology 306, 344-360 (1991)

- 91. Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U: The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. EMBO journal 16, 6762-6771 (1997)
- 92. Lüllmann-Rauch R: Binde- und Stützgewebe: Fettgewebe, in: Taschenlehrbuch Histologie, 2. Aufl. Kp. 8, 132-135, Thieme, Stuttgart (2006)
- 93. Luna-Luna M, Medina-Urrutia A, Vargas-Alarcón G, Coss-Rovirosa F, Vargas-Barrón J *et al.*: Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis. Archives of medical research 73, 608-614 (2015)
- 94. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H *et al.*: Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. Nature 466, 627-631 (2010)
- 95. Meng QJ, Logunova L, Maywood ES, Gallego M, Lebiecki J *et al.*: Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. Neuron 58, 78-88 (2008)
- 96. Mistlberger RE: Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. Neuroscience and biobehavioral reviews 18, 171-195 (1994)
- Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H: Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. Genes & development 15, 995-1006 (2001)
- 98. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS: Central and peripheral circadian clocks in mammals. Annual Rev. Neuroscience 35, 445-462 (2012)
- Myers MGJ, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW: Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. Trends in endocrinology and metabolism 21, 643-651 (2010)
- Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F *et al.*: Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. Cell 119, 693-705 (2004)
- Nie XQ, Yang JW, Shi HX, Zhang YJ, Zhang JY *et al.*: Establishment of a cell model of insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 35, 103-108 (2015)
- Oelkrug R, Polymeropoulos ET, Jastroch M: Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. Journal of comparative physiology B 186, 587-606 (2015)
- 103. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S *et al.*: Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature 443, 709-712 (2006)
- Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Murohara T, Ouchi N: Adiponectin as a Target in Obesity-related Inflammatory State. Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets 15, 145-150 (2015)
- 105. Oishi K, Atsumi G, Suiyama S, Kodomari I, Kasamatsu M *et al.*: Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. FEBS letters 580, 127-130 (2006)

- 106. Oishi K, Ohkura N, Kasamatsu M, Fukushima N, Shirai H *et al.*: Tissue-specific augmentation of circadian PAI-1 expression in mice with streptozotocin-induced diabetes. Thrombosis research 114, 129-135 (2004)
- 107. Oishi K, Sakamoto, Okada T, Nagase T, Ishida N: Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. Biochemical and biophysical research communications 253, 199-203 (1998)
- 108. Okan, Baki AM, Yorulmaz E, Doğru-Abbasoğlu S, Vural P: Serum Visfatin, Fetuin-A, and Pentraxin 3 Levels in Patients With Psoriasis and Their Relation to Disease Severity. Journal of Clinical Laboratory Analysis 00, 1-6 (2015)
- 109. Osaki A, Shimizu H, Ishizuka N, Suzuki Y, Mori M *et al.*: Enhanced expression of nesfatin/nucleobindin-2 in white adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. Neuroscience letters 521, 46-51 (2012)
- 110. Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D *et al.*: The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism. Cell metabolism 4, 163-173 (2006)
- 111. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C *et al.*: Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases 65, 1198-1201 (2006)
- 112. Otway DT, Frost G, Johnston JD: Circadian rhythmicity in murine pre-adipocyte and adipocyte cells. Chronobiology international 26, 1340-1354 (2009)
- 113. Otway DT, Mäntele S, Bretschneider S, Wright J, Trayhurn P *et al.*: Rhythmic diurnal gene expression in human adipose tissue from individuals who are lean, overweight, and type 2 diabetic. Diabetes 60, 1577-1581 (2011)
- 114. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K.: Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. Current opinion in lipidology 14, 561-566 (2003)
- 115. PfaffI MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, e45 (2001)
- 116. Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB: Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. PLoS medicine 8, e1001141 (2011)
- 117. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB *et al.*: Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. Cell 109, 307-320 (2002)
- 118. Paschos GK, Ibrahim S, Song WL, Kunieda T, Grant G *et al.*: Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. Nature medicine 18, 1768-1777 (2012)
- 119. Paz-Filho G, Wong M, Licinio J: Ten years of leptin replacement therapy. Obesity reviews 12, e315-23 (2011)
- Pilz S, Mangge H, Obermayer-Pietsch B, März W: Visfatin/pre-B-cell colonyenhancing factor: a protein with various suggested functions. Journal of endocrinological investigation 30, 138-144 (2007)

- 121. Pon LA, Schon EA: Assay of Mitochondrial ATP Synthesis in Animal Cells and Tissues, in: Methods in Cell Biology, Mitochondria, 2.Aufl. Kp. 7, 156-158, Elsevier, New York (2007)
- 122. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D *et al.*: The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. Cell 110, 251-260 (2002)
- 123. Prins JB: Adipose tissue as an endocrine organ. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism 16, 639-651 (2002)
- 124. Ptitsyn AA, Zvonic S, Conrad SA, Scott LK, Mynatt RL *et al.*: Circadian clocks are resounding in peripheral tissues. PLoS computational biology 2, e16 (2006)
- 125. Rakinic J, Takimoto G, Barrett JA, Lange DA, Robin AP: Adipose tissue response to insulin following injury. Journal of parenteral and enteral nutrition 11, 513-520 (1987)
- 126. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M *et al.*: Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. Endocrinology 151, 3169-3180 (2010)
- 127. Ramesh N, Mohan H, Unniappan S: Nucleobindin-1 encodes a nesfatin-1-like peptide that stimulates insulin secretion. General and comparative endocrinology 216, 182-189 (2015)
- 128. Ramezani A, Hawley RG: Overview oft he HIV-1 Lentiviral Vector System. Current Protocols in Molecular Biology 16.21 (2002)
- 129. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Abbau der Kohlenhydrate zu Pyruvat bzw. Lactat, in: Duale Reihe Biochemie, 2. Aufl. Kp. 6, 74-102, MLP, Thieme, Stuttgart (2008)
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Oxidativer Abbau von Pyruvat: Die Reaktionen der Pyruvat-Dehydrogenase und des Citratzyklus, in: Duale Reihe Biochemie, 2. Aufl. Kp. 7, 103-122, MLP, Thieme, Stuttgart (2008)
- 131. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Abbau von Triacylglycerinen und Ketonkörpern, in: Duale Reihe Biochemie, 2. Aufl. Kp. 8, 123-141, MLP, Thieme, Stuttgart (2008)
- 132. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Die mitochondriale ATP-Synthese, in: Duale Reihe Biochemie, 2. Aufl. Kp. 10, 164-182, MLP, Thieme, Stuttgart (2008)
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Die Bereitstellung von Fettsäuren, Triacylglycerinen und Ketonkörpern, in: Duale Reihe Biochemie, 2. Aufl. Kp. 13, 221-250, MLP, Thieme, Stuttgart (2008)
- 134. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL: NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. Science 293, 506-509 (2001)
- 135. Reppert SM, Weaver DR: Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. Annual review of physiology 63, 647-676 (2001)
- 136. Reppert SM, Weaver DR: Coordination of circadian timing in mammals. Nature 418, 935-941 (2002)

- 137. Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, Schibler U: CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. Genes & development 14, 679-689 (2000)
- Rockstroh D, Landgraf K, Wagner IV, Gesing J, Tauscher R *et al.*: Direct evidence of brown adipocytes in different fat depots in children. PloS one 10, e0117841 (2015)
- 139. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S *et al.*: BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in in glucose homeostasis. PLoS biology 2, e377 (2004)
- 140. Rydén M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A *et al.*: Targets for TNFalpha-induced lipolysis in human adipocytes. Biochemical and biophysical research communications 318, 168-175 (2004)
- 141. Rydén M, Dicker A, van Harmelen V, Hauner H, Brunnberg M *et al.*: Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha -mediated lipolysis in human fat cells. The Journal of biological chemistry 277, 1085-1091 (2002)
- 142. Sandeep S, Velmurugan K, Deepa R, Mohan V.: Serum visfatin in relation to visceral fat, obesity, and type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. Metabolism: clinical and experimental 56, 565-570 (2007)
- 143. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD *et al.*: A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. Neuron 43, 527-537 (2004)
- Scarpace PJ, Zhang Y: Leptin resistance: a prediposing factor for diet-induced obesity. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative 296, R493-500 (2009)
- 145. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA: Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 4453-4458 (2009)
- 146. Schibler U: Circadian time keeping: the daily ups and downs of genes, cells, and organisms. Progress in brain research 153, 271-282 (2006)
- 147. Schmidt R, Lang, F, Heckmann M: Wachen, Aufmerksamkeit und Schlafen, in: Physiologie des Menschen, 31. Aufl. Kp.9 203-205, Springer, Berlin (2010)
- 148. Sethi JK, Vidal-Puig A: Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? Trends in molecular medicine 11, 344-347 (2005)
- 149. Shayakhmetov DM, Di Paolo NC, Mossman KL: Recognition of Virus Infection and Innate Host Responses to Viral Gene Therapy Vectors. Molceular Therapy 18, 1422-1429 (2010)
- 150. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I *et al.*: Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. Science 288, 1013-1019 (2000)

- Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR: Expression of basic helix-loophelix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. Neuroscience 89, 387-397 (1999)
- 152. Shibata R, Ouchi N, Murohara T: Adiponectin and cardiovascular disease. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society 73, 608-614 (2009)
- 153. Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y *et al.*: Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 12071-12076 (2005)
- 154. Shimba S: The roles of clock genes in obesity. Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine 71, 244-248 (2013)
- 155. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M: Nesfatin-1: an overview and future clinical application. Endocrine journal 56, 537-543 (2009)
- 156. Shostak A, Husse J, Oster H: Circadian regulation of adipose function. Adipocyte 2, 201-206 (2013)
- 157. Shostak A, Meyer-Kovac J, Oster H: Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues. Diabetes 62, 2195-2203 (2013)
- 158. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW *et al.*: Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. Journal of clinical investigations 97, 1344-1347 (1996)
- 159. Sinha MK, Sturis J, Ohannesian J, Magosin S, Stephens T *et al.*: Ultradian oscillations of leptin secretion in humans.. Biochemical and biophysical research communications 228, 733-738 (1996)
- 160. Solinas G, Borén J, Dulloo AG: De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? Molecular metabolism 4, 367-377 (2015)
- 161. Staiger H, Tschritter O, Machann J, Thamer C, Fritsche A *et al.*: Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans. Obesity research 11, 368-372 (2003)
- 162. Stephan FK, Zucker I: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 69, 1583-1586 (1972)
- Takahashi JS, Menaker M: Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, Passer domesticus. Journal of neuroscience 2, 815-828 (1982)
- 164. Takebayashi K, Suetsugu M, Wakabayashi S, Aso Y, Inukai T: Association between plasma visfatin and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. Metabolism: clinical and experimental 56, 451-458 (2007)
- 165. Tchoukalova YD, Koutsari C, Karpyak MV, Votruba SB, Wendland E *et al.*: Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. American journal of clinical nutrition 87, 56-63 (2008)

- Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V *et al.*: Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erbalpha expression in liver. Endocrinology 141, 3799-3806 (2000)
- Touitou Y, Haus E: Chronobiology of Endocrine-Immune Interactions, in: Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine 1. Aufl. Kp. 10, 365-368, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1992)
- 168. Trivers RL: The Evolution of Reciprocal Altruism. Quarterly Review of Biology 46, 35-57 (1971)
- 169. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G *et al.*: Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. Science 308, 1043-1045 (2005)
- 170. Turer AT, Khera A, Ayers CR, Turer CB, Grundy SM *et al.*: Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. Diabetologia 54, 2515-2524 (2011)
- 171. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L: Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. Biochimica et biophysica acta 1801, 209-214 (2010)
- 172. Ursin R, Bjorvatn B, Holsten F: Sleep duration, subjective sleep need, and sleep habits of 40- to 45-year-olds in the Hordaland Health Study. Sleep 28, 1260-1269 (2005)
- 173. Van der Spek R, Kreier F, Fliers E, Kalsbeek A: Circadian rhythms in white adipose tissue. Progress in brain research 199, 183-201 (2012)
- 174. Vieira E, Burris TP, Quesada I: Clock genes, pancreatic function, and diabetes. Trends in molecular medicine 20, 685-693 (2014)
- 175. Vujovic N, Davidson AJ, Menaker M: Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative 295, R355-360 (2008)
- Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ: Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. Current diabetes reviews 10, 131-145 (2014)
- 177. Wauters M, Considine RV, van Gaal LF: Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies 143, 293-311 (2000)
- 178. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM: Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. Neuron 14, 697-706 (1995)
- 179. Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA: Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. Current Biology 14, 2289-2295 (2004)
- Whitmore D, Foulkes NS, Strähle U, Sassone-Corsi P: Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. Nature neuroscience 1, 701-707 (1998)

- 181. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE: Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. Digestive diseases and sciences 54, 1847-1856 (2009)
- 182. Wuarin J, Falvey E, Lavery D, Talbot D, Schmidt E *et al.*: The role of the transcriptional activator protein DBP in circadian liver gene expression. Journal of cell science. Supplement 16, 123-127 (1992)
- Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S *et al.*: Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. Molecular and cellular biology 20, 4773-4781 (2000)
- 184. Yamamoto Y, Gesta S, Lee KY, Tran TT, Saadatirad P *et al.*: Adipose depots possess unique developmental gene signatures. Obesity 18, 872-878 (2010)
- 185. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R *et al.*: Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. Science 288, 682-685 (2000)
- Yang S, Liu A, Weidenhammer A, Cooksey RC, McClain D *et al.*: The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms. Endocrinology 150, 2153-2160 (2009)
- 187. Yoo S, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH et al.: PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 5339-5346 (2004)
- 188. Zanquetta MM, Correa-Giannella ML, Giannella-Neto D, Alonso PA, Guimaraes LM *et al.*: Expression of clock genes in subcutaneous and visceral adipose tissues, Chronobiology International 3, 252-260 (2012)
- Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G *et al.*: FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. Cell metabolism 15, 279-291 (2012)
- 190. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB: A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 11, 16219-16224 (2014)
- 191. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L *et al.*: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372, 425-432 (1994)
- 192. Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE *et al.*: Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. Diabetes 55, 962-970 (2006)

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zu allererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Henrik Oster. Ohne Ihre ausgezeichnete Betreuung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Danke, dass Sie mir Ihr Vertrauen geschenkt haben, diese experimentelle Arbeit durchzuführen. Sie waren stets für mich da, um sich meine Fragen und Probleme anzuhören und nach entsprechenden Lösungen zu suchen. Danke auch für Ihre Hilfsbereitschaft und vor allem für Ihre geschätzte Zeit bei der gründlichen Korrektur dieser Arbeit.

Ein weiteres Dankeschön geht an meinen Betreuer Anthony Tsang. Anthony, du bist wirklich ein beeindruckender "verrückter Professor". Ich weiß nicht, wie du es geschafft hast, mir alle Grundlagen für die Laborarbeiten beizubringen. Deine Ruhe und Gelassenheit haben mir geholfen, das kleine 1x1 der Wissenschaft zu begreifen. Ohne deine individuellen und besonderen Tipps & Tricks wäre das eine oder andere Experiment nicht gelungen. Ich danke dir auch dafür, dass du versucht hast deinen Biorhythmus anzupassen, damit wir auch tagsüber in dem Labor arbeiten konnten.

Vielen lieben Dank auch an die komplette Arbeitsgemeinschaft Chronophysiologie.

Liebe /r, Nadine Naujokat, Isa Kolbe, Christiane Koch, Olga Matveeva, Ludmila Skrum, Jana Kiehn, Lisbeth Harder, Rebecca Dumbell und Alexei Leliavski danke für eure herzliche Aufnahme in die Gruppe. Es hat wirklich sehr viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Danke, dass auch ihr jederzeit für mich da gewesen seid und mir bei der einen oder anderen Sache geholfen habt. Jeder einzelne hat ein Stückchen dazu beigetragen, dass ich diese Doktorarbeit anfertigen konnte.

Zu allerletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und bei meinen Freunden, insbesondere bei meinen Eltern, meiner Schwester Wibke, meinen Großeltern, meinen Tanten und Onkels und meinem Lebensgefährten Benjamin bedanken. Was wäre ich ohne euch? Ihr habt mir die Kraft gegeben, mein Medizinstudium und die Doktorarbeit erfolgreich zu meistern. Bei jener noch so kleinen Prüfung habt ihr mitgefiebert und die Daumen gedrückt. Ihr habt immer ein offenes Ohr, einen guten Ratschlag zur Hand und seid jederzeit zu Stelle. Egal was passiert, ihr lasst mich nie im Stich. Danke!

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Julia Johanna Seemann
Geburtsdatum und -ort:	16.02.1991, Hansestadt Wismar
Schulische Ausbildung:	
1997- 2001	Fritz-Reuter-Grundschule ,Wismar
2001- 2009	Gerhart-Hauptmann-Gymnasium, Wismar
Schulabschluss:	Allgemeine Hochschulreife erworben am 23. Juni 2009
	Note: "sehr gut" (1,4)
Berufsausbildung:	
10.2010-10.2012	Studium der Medizin, Universität zu Lübeck, Vorklinischer Studienabschnitt, Abschluss des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung, Note "sehr gut" (1,5)
10.2012-10.2015	Studium der Medizin, Universität zu Lübeck, Klinischer Studienabschnitt, Abschluss des zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung, schriftl. Teil, Note "gut" (2,0)
11.2015-03.2016	PJ, 1.Tertial, Geriatrie, DRK-Krankenhaus, Lübeck
03.2016-06.2016	PJ, 2.Tertial, Innere Medizin, Sana-Hanse-Klinikum, Wismar
06.2016-10.2016	PJ, 3.Tertial, Chirurgie, Sana Kliniken, Lübeck
12.2016	Studium der Medizin, Universität zu Lübeck, Abschluss des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung, mündl. Teil, Note "sehr gut" (1,0)
09.12.2016	Abschluss des Medizinstudiums, Note "sehr gut" (1,5), Erteilung der Approbation als Ärztin
seit 01.01.2017	Assistenzärztin für Innere Medizin, Sana Kliniken, Lübeck
Praktika und Famulaturen	:
06.02.2008- 13.02.2008	Kinderchirurgische Gemeinschaftspraxis, Wismar
21.04.2008- 30.04.2008	Zahnarztpraxis Dr. Stefan Müller, Wismar

-

- 10.05. 2010- 10.06.2010 Pflegepraktikum Sana-Hanse-Klinikum, Wismar
- 21.02.2011- 22.03.2011 Pflegepraktikum Krankenhaus Bad Doberan

25.02.2013- 10.03.2013	Famulatur, Notaufnahme Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Lübeck
11.03.2013- 28.03.2013	Famulatur, Gynäkologische Praxis Dr. Hildebrandt, Dresden
12.08.2013- 25.08.2013	Famulatur, Allgemeinmedizinpraxis Dr. Hallmann, Wismar
02.09.2013- 15.09.2013	Famulatur, Gynäkologische Praxis Dr. Hildebrandt, Dresden
24.03.2014- 06.04.2014	Famulatur, Pädiatrie, Ernst-von-Bergmann-Klinikum, Potsdam
31.07.2014-31.08.2014	Famulatur , Endokrinologie Medizinische Klinik I, UKSH, Lübeck
15.09.2014-28.09.2014	Famulatur, Klinik für Anästhesiologie, UKSH, Lübeck
Promotion:	
10.2013-09.2014	Durchführung der experimentellen Arbeit in der AG Chronophysiologie der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck
07.2014-12.2014	Promotionsstipendium "Exzellenzmedizin" der Universität zu Lübeck
seit 7/2014	assoziiertes Mitglied im GRK1957 "Adipocyte-Brain Crosstalk" der Universität zu Lübeck
Publikation:	
08.2014	"Interaction of circadian and stress systems in the regulation of adipose physiology." Tsang AH, Kolbe I, Seemann J, Oster, H. HMBCI. PMID: 25390019
Universitäres Engagement	:
08.2011	Teilnahme am Lübecker Projekt "Hilfe für Kinder in sozialen Brennpunkten"
10.2011- 07.2012	Tutorin am Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck
10.2013-10.2014	Tutorin am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck
Auslandserfahrungen	
27.09.2009- 12.02.2010	Au-Pair in Surfers Paradise, Australien