

Aus dem Institut für Neurobiologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Henrik Oster

---

Zirkadiane Rhythmen  
Immortalisierter Adipozyten  
Verschiedener Fettdepots

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

vorgelegt von  
Maureen Gäckle  
geb. Friedrichs  
aus Böblingen

- Lübeck 2021 -

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster**

**2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rosemarie Krupar**

**Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2022**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.05.2022**

**- Promotionskommission der Sektion Medizin -**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Das Fettgewebe</i>	2
1.2 <i>Die innere Uhr</i>	9
1.3 <i>Zusammenspiel zwischen Metabolismus und zirkadianer Uhr</i>	12
1.4 <i>Die zirkadiane Regulation des Fettgewebes</i>	13
1.5 <i>Fragestellung</i>	15
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 <i>Zellkultur SV40 T-Antigen immortalisierter Adipozyten</i>	16
2.2 <i>Oil Red O-Färbung und Triglycerid-Bestimmung</i>	19
2.3 <i>Lentivirale Transduktion von Luciferase-Reportern</i>	21
2.4 <i>Lumineszenz-Aufzeichnungen endogener Rhythmen</i>	25
2.5 <i>Zeitprofil endogener Expressionsrhythmen</i>	26
2.6 <i>Molekulargenetische Methoden</i>	26
2.7 <i>Datenauswertung und statistische Analyse</i>	30
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1 <i>Differenzierung immortalisierter Prä-Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	32
3.2 <i>Endogene zirkadiane Rhythmen immortalisierter Adipozyten aus murinem inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	35
3.3 <i>Expressionshöhe der Uhrgene in immortalisierten Prä- und reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	51
3.4 <i>Zeitprofil der mRNA-Expression der Adipokine Leptin und Adiponectin in immortalisierten, reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	52
3.5 <i>Zeitprofil von Ucp1 in immortalisierten, reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	53

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
4.1	<i>Ergebnisse im Überblick</i>	55
4.2	<i>Differenzierung der immortalisierten Prä-Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	55
4.3	<i>Zirkadiane Rhythmen immortalisierter Prä- und reifer Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	58
4.4	<i>Einfluss der Differenzierung auf Uhrengeneexpression und zirkadiane Rhythmik in immortalisierten Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	64
4.5	<i>Einfluss der endogenen Uhr auf die Adipokin- und Ucp1-mRNA-Expression in immortalisierten reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	66
4.6	<i>Anwendbarkeit des Zellmodells für (depotspezifische) Studien der zirkadianen Funktion des Fettgewebes</i>	68
4.7	<i>Fazit und Ausblick</i>	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>89</b>
7.1	<i>Ct-Werte der Leptin- und Ucp1-Expression in Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	89
7.2	<i>Amplitudenänderung der Uhrengene in mit Dexamethason synchronisierten Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe</i>	90
7.3	<i>Ergebnisse der JTK_Cycle-Analyse und Amplituden der Uhrengeneexpression im Zeitprofil von Prä- und reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	90
7.4	<i>Amplitudenänderung der Uhrengeneexpressionsrhythmik in reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	92
7.5	<i>Auswertung der Uhrengeneexpressionsänderung in Prä- und reifen Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT</i>	93
7.6	<i>JTK_Cycle-Analyse der Lep-, Adipoq- und Ucp1-Expression im Zeitprofil in reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe</i>	93
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>94</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acyl-CoA	Acyl Coenzym A
Adipoq	Adiponectin
AgRP	Agouti-related protein
aP2	„adipocyte protein“
ASC	"adipose derived stem cells", Stammzellen aus Fettgewebe
ATL	Adipozyten-Triglycerin-Lipase
ATP	Adenosine Triphosphat
BAT	"brown adipose tissue", braunes Fettgewebe
Bmal1	Brain and muscle ARNT-like 1
BMI	Body-Mass-Index
C/EBP $\alpha/\beta/\gamma$	CCAAT/enhancer-binding Protein $\alpha/\beta/\gamma$
cgc	„clock controlled gene“
Cd137	TNF Receptor Superfamily Member 9
cDNA	"complementary desoxy-ribonucleic acid", komplementäre DNS
$C_{\text{End}}$	Endkonzentration
Cidea	Cell Death Activator CIDE-A
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
Cry 1/2	Cryptochrome 1/2
Ct	"threshold cycle", Detektionsschwelle
DAG	Diacylglycerin
Dbp	D-Box binding protein
Dexa	Dexamethason
DLK-1	Delta-like non-canonical notch ligand
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	"deoxyribonucleic acid", Deoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eef1 $\alpha$ 1	Eukaryotic translation elongation factor1- $\alpha$ 1
EGFP	"enhanced green fluorescent protein", verstärktes grün fluoreszierendes Protein
Eppi	Wiederverschließbares Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf
EWAT	"epididymal white adipose tissue", epididymales Fettgewebe
FABP	Fatty acid binding protein
FBS	"fetal bovine serum", fötal bovines Serum, Hitze-inaktiviert
FFAs	"free fatty acids", freien Fettsäuren

GIT	Gastrointestinaltrakt
GlutaMax	L-Alanyl-L-Glutamin
GM	Grundmedium
GoI	" <i>gene of interest</i> ", Gen des Interesses
GR	Glukokortikoid Rezeptor
GRK	Graduiertenkolleg
HEK 293T	Human Embryonic Kidney 293T - Zellen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hoxc8	Homeobox 8
HSL	Hormon-sensitive Lipase
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IL6	Interleukin 6
IM	Induktionsmedium
Insulin	Rinderpankreas-Insulin
ipRGC	lichtsensitive retinale Ganglienzellen
IWAT	"inguinal white adipose tissue", inguinale Fettgewebe
kb	Kilobasen
LB	" <i>lysogeny broth</i> ", Bakterienkulturmedium
Lep	Leptin
LEPRb	Leptinrezeptor
Luc	Luciferase
LV	Lentivirus
MAG	Monoacylglycerin
mIWAT/mEWAT/ mBAT	"mature" IWAT/EWAT/BAT, reife Adipozyten aus IWAT/EWAT/BAT
mRNA	" <i>messenger ribonucleid acid</i> ", Boten-Ribonukleinsäure
MSC	"mesenchymal stem cells ", mesenchymale Stammzellen
MYF5	Myogenic factor 5
NIH-3T3	Zelllinie aus Mausembryonen
Npas2	Neuronal PAS domain protein 2
OBRb	Leptinrezeptor
OD	Optische Dichte
OPN4	Melanopsin
PAX7	Paired box 7
PBS	" <i>phosphate buffered saline</i> ", Posphat gepufferte Kochsalzlösung
PDL	Poly-D-Lysin
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
Per-2-Luc	Period-2- Luciferase
Per1-3	Period 1-3
PFA	Paraformaldehyd

PGC1- $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 $\alpha$
pIWAT/pEWAT/pBAT	Prä-Adipozyten aus IWAT/EWAT/BAT
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$
PRDM16	PR domain-containing 16 protein
Pref-1	Pre-adipocyte factor 1
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
qPCR	" <i>quantitative real-time-polymerase-chainreaction</i> ", quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
Rev-Erba $\beta$	Reverse-erythroblastosis virus $\alpha/\beta$
RHT	Retino-hypothalamischen Trakt
Ror $\alpha/\beta/\gamma$	Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha-gamma
rpm	" <i>rounds per minute</i> ", Runden pro Minute
RRE	Retinoic response Elemente
RT	Reverse Transkription
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SEM	" <i>standard eviation of the mean</i> ", Standardfehler
SV40 T	Simian-Virus-40 T-Antigen
T3	3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tcf21	Transcription factor 21
TG	Triglycerid
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Trypsin	Trypsin-EDTA (0,05%)
TTL	" <i>transcriptinal-translational feedback loops</i> ", transkriptionell-translatorische Rückkopplungsschleifen
UCP1	Uncoupling protein 1
UV	Ultraviolett
VLDL	Very low-density lipoprotein
WAT	" <i>white adipose tissue</i> ", weißes Fettgewebe
WS	Wintersemester
ZP	Zeitpunkt
$\tau$	Periode
3T3-L1	Fibroblastenzelllinie aus Mausembryonen

# 1 EINLEITUNG

Tag und Nacht; ein Rhythmus der unser Leben bestimmt. Die meisten Organismen entwickelten eine Strategie, sich an diesen immer wiederkehrenden Wechsel der äußeren Bedingungen anzupassen. Sie brachten einen inneren Zeitmesser hervor, der die Physiologie den tageszeitlichen Bedingungen anpasst, die zirkadiane Uhr (lat.: *circa* – um, herum und *dies* – Tag) (vgl. (15, 246)).

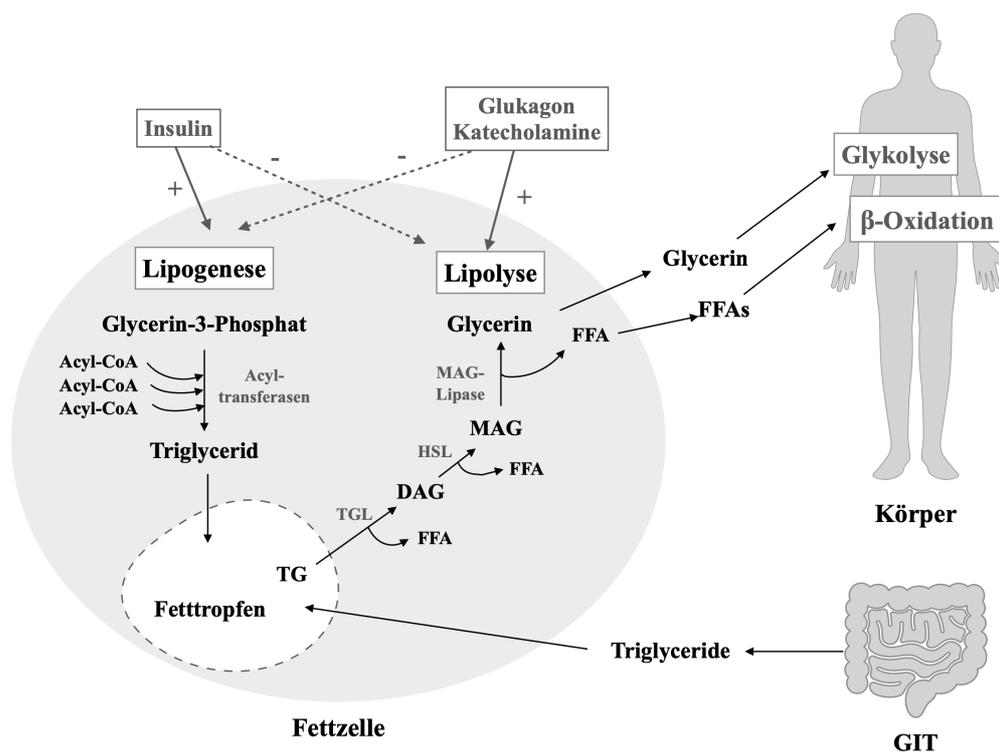
Bereits im 18. Jahrhundert bemerkten Jean-Jacques d’Ortous de Mairan und im frühen 19. Jahrhundert Augustin-Pyramus de Candolle, dass Mimosa-Pflanzen ihre Blätter im Tagesrhythmus öffnen und schließen und dieser Rhythmus in kompletter Dunkelheit ca. 24 Stunden beträgt (168). Zwei Jahrhunderte später, im Jahr 2017, erhielten Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash und Michael W. Young den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre grundlegenden Gedanken und Entdeckungen im Bereich der molekularen Mechanismen, die hinter dem Phänomen des zirkadianen Rhythmus stecken (25, 124, 198, 249, 296, 335, 365). Seitdem gibt es zahlreiche Forschungsgruppen weltweit, die daran arbeiten die innere Uhr und ihre molekularen Mechanismen und Zusammenhänge zu entschlüsseln.

Inzwischen ist bekannt, dass die zirkadiane Uhr Körperfunktionen wie Schlaf, Aktivität, Appetit, Regeneration und Körpertemperatur mit einer Periode von ca. 24 Stunden steuert. Dieser Rhythmus bleibt auch dann erhalten, wenn externe Zeitsignale vorübergehend fehlen (vgl. nachfolgende Abschnitte). In Säugetieren wie beim Menschen gibt es nicht eine, sondern viele zirkadiane Uhren, die durch äußere Reize (sog. Zeitgeber) reguliert werden. Der bekannteste und wichtigste Zeitgeber ist das Licht, aber auch Nahrungsaufnahme, soziale Interaktion und die Umgebungstemperatur können unsere Uhren beeinflussen (vgl. (177)). Wenn es zur Desynchronisation der inneren Uhr und der äußeren Zeit, wie im Falle von Schichtarbeit, Jetlag oder bei der Zeitumstellung, kommt, kann dies zu kurzfristigen Folgen wie Müdigkeit und Appetitlosigkeit, aber bei anhaltender Desynchronisation auch zu langfristigen Folgen wie Fatigue, Adipositas, *Diabetes mellitus* Typ 2 und Hypertonie führen (134, 135, 322, 323, 340, 366, 147, 156, 159, 180, 188, 211, 272, 316). Man spricht dann von Chronodisruption (griech.: *chronos* – (Gott der) Zeit; lat.: *disrumpere* – zerbrechen). Aufgrund seiner entscheidenden Rolle im Stoffwechsel, gelang das Fettgewebe und dessen zirkadiane Eigenschaften in den Fokus der Wissenschaft.

## 1.1 Das Fettgewebe

### 1.1.1 Der Fettstoffwechsel

Das Fettgewebe ist der größte Energiespeicher des Körpers (50). Die Energie wird in den Fettzellen in Form von Triglyceriden (TG) gespeichert. Der Aufbau dieser TGs wird Lipogenese, der Abbau Lipolyse genannt (Abbildung 1). Körperzellen, vor allem Leber und Muskulatur, können aufgenommene oder aus TGs stammenden freie Fettsäuren (engl.: *free fatty acids*, FFAs) zuerst zu Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA) umwandeln und anschließend das Acyl-CoA durch  $\beta$ -Oxidation, den Zitratzyklus und die Atmungskette zu Energie umwandeln (vgl. (232)). Fettzellen speisen Acyl-CoA wiederum in die Lipogenese ein. Acyltransferasen bauen an aktiviertes Glycerol (Glycerin-3-phosphat, Produkt der Glykolyse) nacheinander drei aktivierte Fettsäuren (Acyl-CoA) an. Die so entstandenen TGs werden mit einer Perilipin-Schicht umhüllt und bilden die später mikroskopisch sichtbaren Lipidtropfen (232). Insulin fördert die Expression oder Aktivierung beteiligter Enzyme, während Glukagon und adrenerge Stimuli (z.B. Katecholamine) die Expression und Aktivierung hemmen (29, 163, 232, 256). Der Abbau der TGs geschieht ähnlich wie der Aufbau in Teilschritten und endet wieder mit Glycerin und FFAs. Zuerst hydrolysiert die Adipozyten-Triglycerin-Lipase (ATL) das TG und macht daraus ein Diacylglycerin (DAG) und eine FFA, in einem zweiten Schritt wird aus dem DAG durch die Hormon-sensitive Lipase ein Monoacylglycerin (MAG) und die zweite FFA und in einem dritten Schritt aus dem MAG durch die Monoacylglycerin Lipase die dritte FFA zu Glycerin. Das Glycerin wird anschließend von den Zellen des Körpers zur Glykolyse und die FFAs für die  $\beta$ -Oxidation (Energiegewinn durch Verstoffwechslung von Fettsäuren) genutzt, um daraus Energie zu machen (257, 364). Glukagon und Katecholamine fördern, Insulin hemmt die Lipolyse (77, 167). Weitere Einflussfaktoren sind der Kohlenhydrat- oder Lipidanteil der Nahrung, sowie wie später näher beschrieben, die innere Uhr der Fettzellen (163, 329).



**Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Fettstoffwechsel**

Triglyceride können entweder aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) direkt aufgenommen oder durch Lipogenese synthetisiert werden. Glycerin-3-Phosphat wird durch Acyltransferasen mit drei Acyl-CoA Molekülen zu Triglyceriden (TG) verestert und anschließend in Fetttropfen gespeichert. Die Lipolyse unterteilt sich in drei Schritte: Zuerst werden TGs durch die Adipozyten-Triglycerin-Lipase (TGL) in Diacylglycerin (DAG) gespalten. DAG wird mit der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) zu Monoacylglycerin (MAG) und anschließend mit der MAG-Lipase zu Glycerin. Bei jedem der Schritte wird eine freie Fettsäure (FFA) abgespalten. Glycerin und FFAs gelangen dann über das Blut in den Rest des Körpers und werden dort in die Glykolyse und  $\beta$ -Oxidation eingeschleust. Insulin steigert (+) die Lipogenese und hemmt (-) die Lipolyse. Glukagon und Katecholamine fördern wiederum die Lipolyse und hemmen die Lipogenese.

### 1.1.2 Zusammensetzung

Im Allgemeinen unterscheidet man zwei Arten von Fettgewebe; weißes und braunes (232). Während das weiße Fettgewebe (engl. *white adipose tissue* - WAT) vor allem für die Energiespeicherung zuständig ist, dient braunes, Mitochondrien-reiches Fettgewebe (engl. *brown adipose tissue* - BAT) der zitterfreien Thermogenese (41). WAT ist als Ursprung und Wirkungsort diverser Hormone zusätzlich wichtiger Bestandteil des endokrinen Systems und unterteilt sich in subkutanes (Unterhaut-) und viszerales (Eingeweide-)Fettgewebe (317). Fettgewebe selbst setzt sich aus verschiedenen Zellarten zusammen. Den größten Anteil bilden die reifen Fettzellen (Adipozyten), die in ihren Vakuolen die Triglyceride speichern. Während WAT-Zellen einen einzelnen, bis zu 200  $\mu\text{m}$  großen Fetttropfen enthalten (univakuolär), befinden sich in reifen braunen Adipozyten viele kleinere Fetttropfen (multivakuolär)(81). Weitere Bestandteile des Fettgewebes sind die Endothelzellen der Gefäße, Fibroblasten, diverse Immunzellen und die

Fettvorläuferzellen, die Prä-Adipozyten. Die fibroblastenähnlichen Prä-Adipozyten reifen während der Adipogenese zu Fett akkumulierenden reifen Adipozyten heran. Sie bilden die Grundlage für die Expansion von Fettgewebe und ersetzen alte Fettzellen (81, 232, 263).

### 1.1.3 Differenzierung

Während die Gesamtzahl der Adipozyten bei schlanken Erwachsenen annähernd gleich bleibt, werden jedes Jahr ca. zehn Prozent der reifen durch frische Adipozyten ersetzt (305). Hierzu differenzieren mesenchymale Stammzellen (MSC) erst zu Prä-Adipozyten und dann zu reifen Adipozyten aus (Abbildung 2) (62). Braune Adipozyten besitzen einen gemeinsamen Vorläufer mit Myoblasten ( $MYF5^+PAX7^+$ ) (132, 315).

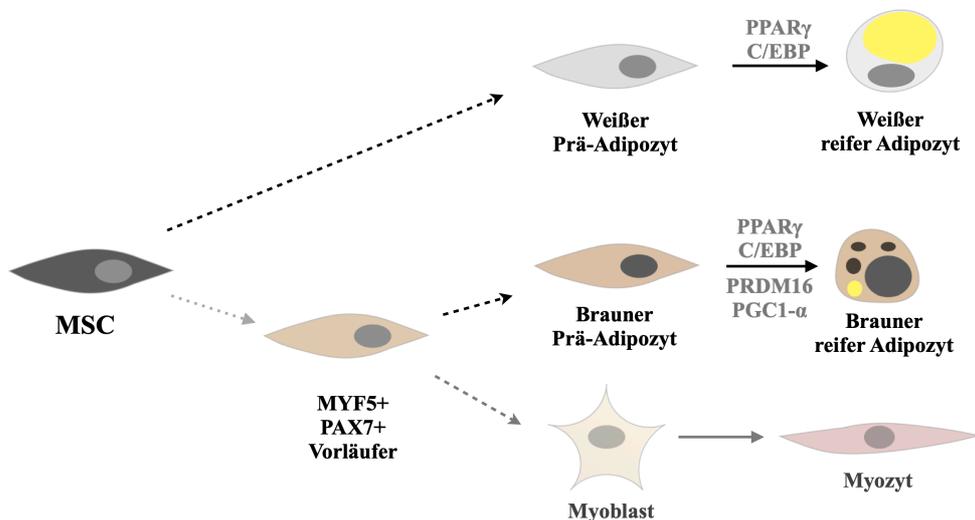
Die Differenzierung der Prä-Adipozyten zu reifen Adipozyten nennt man terminale Differenzierung (62, 216). Während Prä-Adipozyten klonal expandieren können, verlieren reife Fettzellen diese Eigenschaft und treten final in die G0-Phase des Zellzyklus über (51, 216). Bei der terminalen Differenzierung kommt es durch epigenetische Modifikationen zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, darunter peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 1/2 (PPAR $\gamma$ 1/2) sowie CCAAT/enhancer-binding Protein  $\alpha/\beta/\gamma$  (C/EBP  $\alpha/\beta/\gamma$ ). Durch adipogene Faktoren wie Glukokortikoide, Insulin, und Schilddrüsenhormone führt die Aktivierung von C/EBPs zur zunehmenden Expression von PPAR $\gamma$ 2 (62). Während C/EBPs in verschiedensten Zellen den Differenzierungsprozess vorantreiben, ist PPAR $\gamma$ 2 der Haupttranskriptionsfaktor in der Adipozyten-Differenzierung und führt zur Expression metabolisch relevanter Gene wie adipocyte protein 2 (aP2, auch bekannt als fatty acid-binding protein 4, FABP4) und Adipokinen wie Leptin, Adiponectin oder (im Falle des braunen Fettgewebes) *uncoupling protein-1* (engl., UCP1) (62, 216, 275). Das im Zytosol vorkommende aP2 gehört zur Familie der Fettsäuretransporter und transportiert freie Fettsäuren innerhalb der Adipozyten zu ihrem Bestimmungsort (z.B. Mitochondrien) (5, 142). Es kommt sowohl in weißen, als auch in braunen Adipozyten vor und dient in der Forschung als Differenzierungsmarker von Fettzellen (73, 229, 244, 269, 336, 337).

Für die Differenzierung zu braunen Adipozyten spielen zusätzlich das PR domain-containing 16 protein (PRDM16) und der peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1  $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) als Co-Aktivator von PPAR $\gamma$  eine wichtige Rolle (153, 251, 284, 285). Beide unterstützen die Expression von UCP-1 und dadurch die Entwicklung zur braunen Fettzelle (62).

Neben proadipogenen Proteinen gibt es auch antiadipogene Proteine. Zu diesen gehört das Transmembranprotein pre-adipocyte factor (Pref-1, auch bekannt als delta-like non-canonical notch ligand, DLK-1), dessen Spaltung zur Freisetzung eines anti-adipogenen Faktors führt und damit die Differenzierung hemmt (298–300, 339). Wie aP2 dient auch PREF-1 als Differenzierungsmarker in der Fettzellen-Forschung (11, 339).

In Zellexperimenten hat sich gezeigt, dass neben Glukokortikoiden, Insulin und Triiodthyronin ( $T_3$ ) auch der Cyclooxygenase-Hemmer Indometacin und das Koffeinanalogon 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)

adipogene Effekte haben und daher zusammen zur Induktion der terminalen Differenzierung eingesetzt werden (283). Der metabolisch aktive Zustand kann *in vitro* anschließend mit Insulin und T<sub>3</sub> aufrechterhalten werden (173, 336).



**Abbildung 2: Adipozyten-Ursprung und Differenzierung**

Aus mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich weiße Prä-Adipozyten und myogenic factor 5 (MYF5) und paired box 7 (PAX7) exprimierende Vorläuferzellen. Weiße Prä-Adipozyten differenzieren zu reifen weißen Adipozyten (terminale Differenzierung). Daran beteiligt sind die Transkriptionsfaktoren peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) und CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP). Aus MYF5+ /PAX7+ Vorläuferzellen entstehen, je nach Umgebung, braune Prä-Adipozyten oder Myoblasten. Myoblasten und braune Prä-Adipozyten differenzieren anschließend zu Myozyten und reifen braunen Adipozyten (terminale Differenzierung). An der terminalen Differenzierung der braunen Adipozyten sind neben PPAR $\gamma$  und C/EBP die Co-Aktivatoren PR domain-containing protein 16 (PRDM16) und peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1  $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) beteiligt (abgewandelt von Cristancho und Lazar 2011 (62)).

#### 1.1.4 Das weiße Fettgewebe

Die Aufgaben von WAT im Körper sind vielfältig. Neben der Speicherung von Energie dient es auch dem Schutz der Organe (viszeral), als Isolierfett unter der Haut und als Baufett, zum Beispiel an der Fußsohle, in der Orbita oder im Nierenlager (58, 103, 152). Das weiße Fettgewebe teilt sich hauptsächlich in zwei Unterkategorien auf; das subkutane und viszerale Fettgewebe. Beide Fettgewebsarten zeigen unterschiedliche Verteilungen an Rezeptoren, reagieren verschieden auf Hormone und unterscheiden sich in ihrer Sekretion von Adipokinen (s. Abschnitt 1.1.6) (17, 126, 140, 255, 347). Inzwischen wurde eine dritte Unterart beschrieben. Unter bestimmten Umständen kommt es zur vermehrten Anreicherung Mitochondrien-reicher, multivakuolärer Fettzellen innerhalb des weißen Fettgewebes (53, 115, 148, 200, 223, 268, 293). Diese UCP-1 exprimierenden Zellen nennt man beige Adipozyten (oder auch „brite“ von „brown-in-white“). Sie bilden eine spezielle Unterart der Adipozyten.

Der menschliche Körper besteht durchschnittlich zu ca. 20-30 % aus Fett (95). Aufgrund des sehr geringen Anteils an braunem Fettgewebe (64) ist der größte Anteil hiervon weißes Fettgewebe. Bei einer Zunahme des weißen Fettgewebes über das normale Maß hinaus, entsteht das Krankheitsbild der Fettleibigkeit (Adipositas, *lat.*: *adeps* – Fett). Als Surrogatmarker dient hierbei der Körpermaßindex (*engl.*: *body-mass-index*, BMI). Bei der Berechnung wird das Körpergewicht in Relation zur Körpergröße im Quadrat ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) gesetzt. Ab einem BMI von  $> 30 \text{ kg}/\text{m}^2$  spricht man von Adipositas. Ein steigender BMI korreliert ab einem BMI von  $18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$  mit dem Risiko an metabolischen (z.B. Diabetes mellitus Typ 2) oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (z.B. Koronare-Herzerkrankung) zu erkranken (181). Allerdings eignet sich der BMI nicht immer zur Erstellung eines individuellen Risikoprofils, da der BMI lediglich das Körpergewicht, nicht aber die Körperzusammensetzung einrechnet. Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Folgen der Adipositas mehr von der Fettverteilung als von der Gesamtfettmenge abhängen und somit die unterschiedlichen Arten von Fettgeweben für die Wissenschaft von Bedeutung sind (109). So ist seit längerem bekannt, dass vor allem die Vermehrung des viszeralen Fettgewebes, die viszerale Adipositas (Taille-Hüft-Verhältnis  $\text{♂} > 0,85$ ;  $\text{♀} > 1,0$ ), mit einem erhöhten Risiko für u.a. *Diabetes mellitus* Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen einhergeht (31).

#### 1.1.4.1 Subkutanes weißes Fettgewebe

Subkutanes (*lat.* *sub* - unter und *cutis* - Haut) Fettgewebe macht über 80 % des Gesamtfettgewebes im Körper aus und ist damit der Hauptenergiespeicher (317). Die größten Fettpolster finden sich dabei am Bauch und im gluteofemorale Bereich (58). Bei Mäusen ist das größte subkutane Fettdepot das inguinale Fettpolster (IWAT). Es befindet sich ventral im Leistenbereich der Maus, ist somit gut zugänglich und wird vielfach für Forschungsarbeiten genutzt (166). Im Gegensatz zu viszeralem Fettgewebe zeigt es einen höheren Gehalt und eine höhere Sekretion der Adipokine Leptin und Adiponectin (17, 126, 127, 140, 255).

#### 1.1.4.2 Viszerales weißes Fettgewebe

Viszerales Fettgewebe umhüllt Organe, dient unter anderem deren Schutz und macht je nach Geschlecht ca. 10-20 % der Fettmasse aus (145). Bei Mäusen findet man viszerale Fettpolster u.a. retroperitoneal, mesenterial und perigonadal. Das perigonadale Fettpolster männlicher Mäuse nennt man auch epididymales Fettpolster (EWAT) (166). Da dieses Polster groß und gut zugänglich ist, wird EWAT daher gerne für die Forschung mit viszeralem Fettgewebe, so auch in dieser Arbeit, eingesetzt.

Mikroskopisch zeigen sich in viszeralem Fettgewebe vergleichsweise große Adipozyten (89, 237, 347). Die Adipozyten des viszeralen Fettgewebes besitzen eine vermehrte Katecholamin-Sensitivität, höhere Insulinresistenz, eine erhöhte Lipolyserate und eine erhöhte Freisetzung von freien Fettsäuren und very low-density lipoprotein (VLDL) (93, 347). Adipozyten des viszeralen Fettgewebes weisen zusätzlich mehr Glukokortikoid- und Adrenorezeptoren auf und sind gleichzeitig stärker innerviert und vaskularisiert als subkutanes Fettgewebes (93, 145).

### 1.1.4.3 Beige-farbene Adipozyten

Bereits 1984 zeigte sich, dass unter bestimmten Bedingungen Adipozyten mit den Eigenschaften brauner Adipozyten in weißem Fettgewebe zu finden sind (363). Man findet die so genannten beige-farbenen Adipozyten sowohl in subkutanem als auch in viszeralem Fettgewebe, wobei sie im subkutanen Fettgewebe überwiegen (268). Sie sind gekennzeichnet durch multivakuoläre Fetttropfen und eine größere Anzahl an Mitochondrien (22, 53, 55). Unter normalen Bedingungen zeigen beige-farbene Adipozyten lediglich eine sehr niedrige UCP1-Expression (115, 348). Kommt es allerdings z.B. zu einem Kälte- oder adrenergen Stimulus, steigt die UCP1-Expression (22, 53, 115, 224, 248, 268, 293). Man kann deshalb sagen, im „Ruhezustand“ zeigen beige-farbene Adipozyten mehr Ähnlichkeit zu weißen, im aktivierten Zustand mehr Ähnlichkeit zu braunen Adipozyten. Kommt es unter Stimulation zu einer Vermehrung der beige-farbenen Adipozyten in WAT, spricht man von *beigeing*, *browning* oder *britening*.

### 1.1.5 Das braune Fettgewebe

Die Erstbeschreibung von braunem Fettgewebe erfolgte bereits 1551, als bei Murmeltieren Fett entdeckt wurde, dass weder wie normales Fett noch wie Muskel aussah (102, 328). Später wurde es bekannt als das Gewebe, das bei Winterschläfern für die erneute Erwärmung im Frühjahr zuständig ist (297, 301). Studien der letzten zwei Jahrzehnte konnten nachweisen, dass braunes Fettgewebe auch bei Erwachsenen durch Kälte reaktiviert und durch das sympathische Nervensystem stimuliert werden kann (64, 123, 148, 223, 326, 332). Mit diesem Hintergrund wurde BAT für die Adipositas-Forschung interessant, da BAT die Möglichkeit bietet, mit seiner „zitterfreien Thermogenese“, Energie wortwörtlich zu verbrennen (259). Makroskopisch hat BAT eine, durch einen hohen Gehalt an Mitochondrien entstehende, bräunliche Färbung und zeigt eine multivakuoläre Fetttropfen Verteilung (54). Im Menschen befinden sich die braunen Fettpolster unter anderem supraklavikulär, entlang des *Musculus sternocleidomastoideus*, paraaortal, in den Achselhöhlen und auch im Bereich der Nebennieren (223). Bei Säuglingen und Mäusen befindet sich das größte Polster interskapulär am Rücken (54). Braune Adipozyten erzeugen Wärme, indem sie, den durch die Atmungskette in den Mitochondrien entstehenden Protonengradienten über den Protonenkanal UCP aus dem Mitochondrium ausleiten, anstatt ihn für die Erzeugung von Adenosintriphosphat (ATP) zu nutzen. Insgesamt gibt es fünf Isoformen des Protonenkanals (UCP1-5), die sich in ihrer Struktur ähneln, jedoch unterschiedliche Lokalisationen aufweisen (41, 258). UCP1 trägt, durch seine Lokalisation in braunen Fettzellen, den größten Teil zur zitterfreien Thermogenese bei, sodass bei Studien an braunen Fettzellen vor allem UCP1 untersucht wird.

### 1.1.6 Die endokrine Funktion

Neben der Energiespeicherung übernimmt das Fettgewebe auch endokrine Funktionen, indem es über die Ausschüttung diverser Peptidhormone mit anderen Organen und dem zentralen Nervensystem interagiert. Über diese Adipokine können unter anderem Energiehaushalt, Immunsystem, Fettstoffwechsel, Blutdruck, Arteriosklerose, Insulinsensitivität und auch die Angiogenese beeinflusst werden (94, 162, 190). Beispiele

für Adipokine sind Leptin und Adiponectin, Visfatin, Resistin, Interleukin-6 und TNF $\alpha$  (57, 94, 344). Teilweise besteht ein Depotunterschied der Adipokine. So werden zum Beispiel Leptin, Adiponectin und TNF $\alpha$  vermehrt in subkutanem WAT, und Il-6 und Resistin in viszeralem WAT sezerniert (162). In dieser Arbeit soll besonderes Augenmerk auf die zwei wichtigsten und gut untersuchten Adipokine, Leptin und Adiponectin, gelegt werden.

#### 1.1.6.1 *Leptin*

Leptin (griech.: *leptos* – dünn) ist wohl das bekannteste Adipokin (Entdeckung 1994) (368). Es ist ein 16 kDa großes Protein, welches vornehmlich von Fettzellen sezerniert wird (108, 130, 208, 368). Seine Konzentration im Blut steigt nach der Nahrungsaufnahme an, verhält sich proportional zur Körperfettmasse und zählt damit als Indikator für den Energiezustand des Körpers (203, 228, 318). Eine wichtige Funktion von Leptin ist die zentrale Reduktion der Nahrungsaufnahme über Bindung an Leptinrezeptoren (LEPRb, OBRb) im mediobasalen Hypothalamus, dem wichtigsten zentralen Energiehaushaltsregler. Die Leptinbindung führt zur Aktivierung von Pro-Opiomelanocortin (POMC)- und Hemmung von Neuropeptid Y/agouti-related protein (AgRP)-Neuronen. POMC-Neuronen mindern den Appetit, während AgRP-Neuronen Appetit fördern (91, 131). Störungen dieses Leptinsignalwegs führen entsprechend zu gestörter Appetitregulation im Menschen. Außerdem hat sich gezeigt, dass es in vielen adipösen Patienten zu einer zentralen Leptin-Resistenz kommt. Das heißt, bei einer Adipositas kann trotz hoher peripherer Leptinspiegel die appetithemmende Wirkung ausbleiben (151).

Zusätzlich zur Appetitregulation steuert Leptin den peripheren Energieverbrauch und die Energiespeicherung durch Interaktion mit Insulin und Glukokortikoiden und damit Modulation von Glukose- und Fettstoffwechsel (206). Außerdem beeinflusst es unter anderem die Thermoregulation (72, 84, 225), die Fortpflanzung (206, 243) sowie systemische Entzündungsreaktionen (242). Insulin, Glukokortikoide und Glukose steigern die Synthese und Sekretion von Leptin, während Glukagon und Katecholamine sowie Kälte eine hemmende Wirkung besitzen (186, 206). Außerdem ist bekannt, dass der Leptinspiegel morgens steigt und nachts, nahrungsunabhängig, absinkt (290). Auf die Beteiligung der zirkadianen Uhr an diesem Rhythmus wird im Abschnitt 1.4 genauer eingegangen.

#### 1.1.6.2 *Adiponectin*

Ein zweites gut studiertes Adipokin ist das 30 kDa große Protein Adiponectin, welches physiologisch im Gegensatz zu Leptin ausschließlich von Fettgewebe sezerniert wird (280). Der Adiponectinspiegel im Blut verhält sich antiproportional zur Körperfettmasse und steigt, wenn der Körper Energie benötigt (9, 139). Adiponectin hemmt die Glukoneogenese der Leber und die Glukosefreisetzung unabhängig von Insulin und fördert die periphere Insulinsensitivität. Es steigert u.a. die  $\beta$ -Oxidation im Muskel und reduziert dadurch FFAs im Blut und deren Anreicherung in der Leber (162, 186). Im zentralen Nervensystem führt Adiponectin, durch Steigerung des Energieverbrauchs, zur Gewichtsabnahme und eine Verringerung des Körperfettanteils (338). Eine Hypoadiponectinämie ist wiederum assoziiert mit gesteigerter

Insulinresistenz und *Diabetes mellitus* Typ 2 (343). Neben metabolischen Effekten konnten zusätzlich anti-atherosklerotische Eigenschaften nachgewiesen werden (63, 120). Die Sekretion von Adiponectin wird z.B. gefördert durch Insulin und gehemmt durch die Entzündungsfaktoren TNF $\alpha$  und IL-6 (186).

## 1.2 Die innere Uhr

### 1.2.1 Molekularer Aufbau der zirkadianen Uhr

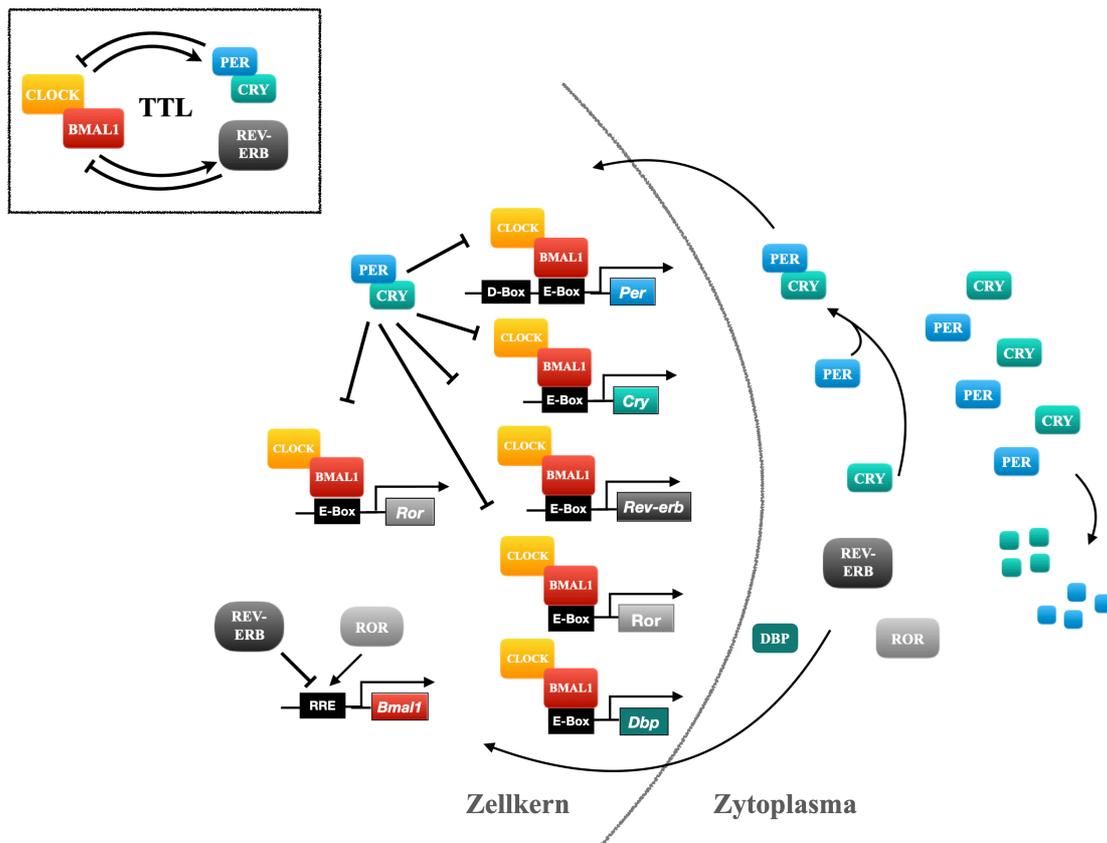
Wie jede Uhr besitzt auch die zirkadiane Uhr ein komplexes Uhrwerk (Abbildung 3). Das Uhrwerk der zirkadianen Uhr wird durch transkriptionell-translatorische Rückkopplungsschleifen (*transcriptional-translational feedback loops* - TTLs) gebildet und führt zu einer gleichmäßigen Oszillation von UhrengenenmRNAs und -proteinen mit einer Periode ( $\tau$ ) von ungefähr 24 Stunden (241). Der Kern-TTL bei Säugetieren besteht aus circadian locomotor output cycles kaput (**CLOCK**), dessen Autolog neuronal PAS domain protein 2 (**NPAS2**), brain and muscle ARNT-like 1 (**BMAL1**, oder auch ARNTL bzw. MOP3), period 1-3 (**PER1-3**) und cryptochrome 1/2 (**CRY1/2**) (Abbildung 3) (99, 138, 185, 241, 262, 288). Wie jede Rückkopplungsschleife besteht der TTL aus einem positiven und einem negativen Arm. Der positive Arm wird durch die Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK gebildet, die über Per-Arnt-Sim-Domänen miteinander interagieren und Heterodimere bilden (BMAL1:CLOCK) (39, 138). CLOCK kann hierbei in einigen Geweben funktionell durch NPAS2 ersetzt werden (189, 262). BMAL1:CLOCK binden an *E-box*-Elemente in den Promotorregionen der *Per*- und *Cry*-Gene (360). Die Proteine PER- und CRY akkumulieren über den Tag im Zytoplasma und formen – ebenfalls über PAS-Domänen – Heterodimere. Diese translozieren verzögert in den Zellkern und blockieren dort die Aktivität von BMAL1:CLOCK. Somit unterdrücken sie ihre eigene Transkription. Durch Methylierung, Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung kommt es zum langsamen proteosomalen Abbau von PER und CRY in der Nacht (96). Dadurch nimmt die Aktivität von BMAL1:CLOCK am Morgen wieder zu und der TTL beginnt von vorne (166).

Zusätzliche Rückkopplungsschleifen führen zur Stabilisierung des Systems und verbinden den TTL mit metabolisch relevanten Signalwegen. Die Verbindung zu diesen Signalwegen läuft z.B. über *E-Box*-Elemente in den Promotorregionen sogenannter uhrengesteuerter Gene (ccg's – *engl.* clock-controlled genes), die ebenfalls durch BMAL1:CLOCK aktiviert werden (357).

Eine der zusätzlichen Stabilisierungsschleifen besteht aus reverse-erythroblastosis virus alpha/beta (**REV-ERB $\alpha/\beta$**  oder NR1D1/2) und retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha-gamma (**ROR $\alpha/\beta/\gamma$** ) (241, 278, 321). Beide Gen-Familien besitzen *E-box*-Elemente im Promotor und sind damit Zielgene von BMAL1:CLOCK. REV-ERBs und RORs binden konkurrierend an ROR/REV-ERB-*response*-Elemente (*RREs*) und unterdrücken (REV-ERBs) oder fördern (RORs) die Expression ihrer Zielgene (3, 241). So führen REV-ERBs zur Unterdrückung der Expression von *Bmal1* (116, 278, 321). Albumin d-box binding protein (**DBP**) ist Teil einer dritten Rückkopplungsschleife (241, 362). Die *Dbp*-Transkription wird

ebenfalls durch BMAL1:CLOCK aktiviert und verstärkt über D-Box-Bindungsdomänen die Transkription von *Per1* und weiteren Zielgenen (265, 353). Außerdem moduliert DBP in diversen Organen wie der Leber, dem Herzen oder auch den Nieren die Stoffwechselprozesse und bildet so ebenfalls eines der Bindeglieder von zirkadianer Uhr und der Zellfunktion (67, 85, 191, 351, 352).

Insgesamt wird hier nur ein kleiner Überblick über die wichtigsten Teile des molekularen Aufbaus der zirkadianen Uhr gegeben, denn darüber hinaus handelt es sich um ein komplexes System aus stabilisierenden und modulierenden Faktoren innerhalb und außerhalb der Zelle (vgl. (241, 264)).



**Abbildung 3: Der Molekulare Aufbau der zirkadianen Uhr**

Auf molekularer Ebene besteht die zirkadiane Uhr aus transkriptionell-translatorische-Rückkopplungsschleifen (TTL). Die Hauptkomponenten sind circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK), brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1), Period (PER), cryptochrom (CRY) und reverse-erythroblastosis virus (REV-ERB) (Box oben links). BMAL1:CLOCK aktivieren die Transkription von *Per*, *Cry*, *Rev-erb*, *Ror* und *Dbp* über E-Box Elemente (E-Box). Die Proteine akkumulieren im Zytoplasma und translozieren zurück in den Zellkern. Dort hemmt PER:CRY die Aktivität von BMAL1:CLOCK. ROR aktiviert über ROR/REV-ERB-responsive elements (RRE) die Transkription von *Bmal1*, während REV-ERB die Transkription hemmt.

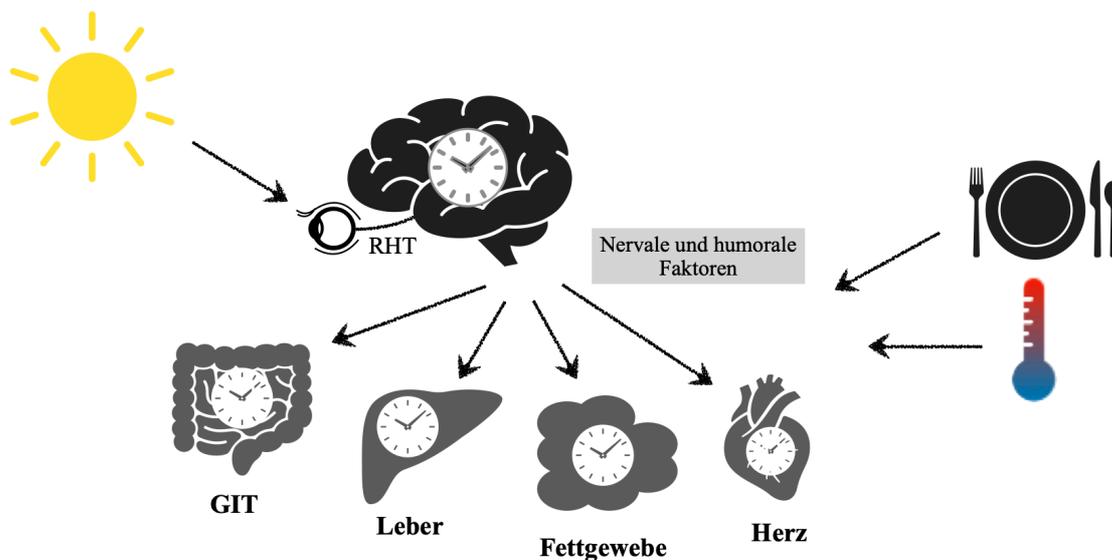
### 1.2.2 Das Zusammenspiel zentraler und peripherer Uhren und ihre Zeitgeber

Um die Körperfunktionen an die Umgebung anpassen zu können, ist es wichtig externe Signale an die Zellen im Körper weiterzugeben (Abbildung 4). Verschiedenste Gewebe und Organe wie die Leber (250, 311), das Herz (78), Muskeln (222), Knochen (304), Fettgewebe (166, 250), die Nieren (150), die

Nebennieren (76) oder das Pankreas (267) folgen einer inneren Uhr. Damit diese verschiedenen Uhren zusammenarbeiten können, ist es wichtig, sie untereinander zu synchronisieren. Am besten funktioniert diese Synchronisation mit einem Taktgeber. Eine spezielle Region im Hypothalamus oberhalb des *Chiasma opticum*, der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), ist hierbei der wichtigste Takt- oder Zeitgeber des Körpers (37, 215, 307). Er empfängt Informationen über licht-sensitive retinale Ganglienzellen (ipRGCs). Diese Ganglienzellen exprimieren einen G-Protein-gekoppelten Photorezeptor für blaues Licht, das Melanopsin (OPN4). ipRGCs projizieren über den retino-hypothalamischen Trakt (RHT) direkt in den SCN, der die Lichtinformation integriert und an weitere Kerne des Hypothalamus, z.B. den *Nucleus paraventricularis* (PVN), weiterleitet (1, 217). Auch ohne Lichtsignale besteht der endogene, zirkadiane Rhythmus des SCN über mehrere Tage weiter (253, 342). So gelingt es, auch ohne direkten Lichtimpuls, als Taktgeber zu fungieren. Vom SCN gelangt die Zeit-Information über neuronale und humorale Signale in den Rest des Körpers (24, 30, 294). Die aus dem SCN kommenden Zeitgebersignale synchronisieren so die einzelnen peripheren Uhren untereinander und koppeln sie an die externe Zeit. Diesen Vorgang nennt man *Entrainment* (engl. - Mitführung). In den einzelnen Organen und Geweben aktivieren lokale Uhren jeweils spezifische ccgs. So wird der organspezifische Stoffwechsel an die externen Bedingungen angepasst. Auch wenn der SCN für ein Zusammenspiel der einzelnen peripheren Uhren wichtig ist, sind periphere Uhren nicht prinzipiell auf den SCN angewiesen ist, sondern können sich auch nach anderen Taktgebern richten (67, 136, 281).

So ist neben dem Licht die Nahrungsaufnahme ein wichtiger Zeitgeber, der insbesondere die peripheren Uhren mittels Hormonen und Metaboliten auf die Nährstoffverarbeitung einstellt (14, 136). Gewährt man Mäusen ausschließlich tagsüber – und damit entgegen ihrer eigentlichen Essensrhythmik – Zugang zu Nahrung kommt es zur Verschiebung der peripheren Uhren, nicht aber zur Verschiebung des SCN-Rhythmus (67, 158). Außerdem zeigte sich in einem Experiment, in dem Licht und Futterzyklus zeitlich versetzt wurden, dass sich die Uhren der Leber und des viszeralen Fettgewebe eher nach dem Nahrungszyklus richten, während sich die Aktivität der Maus sowie die Uhr der Nebennieren eher nach dem Lichtrhythmus richteten (136). Glukokortikoid-Hormone spielen für das *Entrainment* eine wichtige Rolle (20, 146, 192). So wird in der zirkadianen Forschung das synthetische Glukokortikoid Dexamethason zur Zellsynchronisation *in vitro* verwendet. Eine Aktivierung des intrazellulären Glukokortikoidrezeptors (GR) fördert die Expression von *Per1* und *Per2* und stimuliert dadurch den negativen Arm des Kern-TTL (302).

Die Körpertemperatur von Säugetieren schwankt im Laufe des Tages um 1-4 °C und dient hiermit ebenfalls als weiterer Zeitgeber (13, 35, 260, 324, 334). So haben Schwankungen der Temperatur in *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt, dass Zellen durch die Änderung synchronisiert und Rhythmen erhalten werden können (35, 38, 160, 274). Brown *et al.* konnten 2002 in Mäusen zeigen, dass sich die *Per2* und *Dbp* Rhythmen in der Leber, sowie die Körpertemperatur, an veränderte Außentemperaturen anpasst, diese auf die Uhrgene des SCN, wie schon beim Zeitgeber Nahrung, allerdings keinen Einfluss zeigt (35).



**Abbildung 4: Zusammenspiel von zentralen und peripheren Uhren**

Licht als Zeitgeber aktiviert photosensitive retinale Ganglienzellen (ipRGCs). Die Licht-Information wird über den retino-hypothalamischen Trakt (RHT) an den SCN weitergeleitet. Dieser dient als zentraler zirkadianer Schrittmacher des Körpers. Vom SCN wird das Zeitsignal über neurale und humorale Faktoren an die peripheren Uhren weitergegeben, z.B. im Gastrointestinaltrakt (GIT), in der Leber, im Fettgewebe und im Herz. Weitere Zeitgeber sind die Nahrungsaufnahme und die körpereigene Temperatur-Rhythmik.

### 1.3 Zusammenspiel zwischen Metabolismus und zirkadianer Uhr

Eine wichtige Aufgabe der zirkadianen Prozesse im Körper ist es, den Metabolismus an das veränderte Nahrungsangebot bei Tag und Nacht anzupassen. Blutglukosespiegel zum Beispiel haben ihr Maximum in den frühen Morgenstunden, während die Insulinsensitivität morgens am geringsten ist (155, 247). Ebenso unterliegt der Glykogengehalt der Leber einer zirkadianen Schwankung (74, 112, 247). Freie Fettsäurespiegel und TAGs sind im Blut in der subjektiven Nacht am höchsten messbar (291, 324). Auch andere Parameter des Fettstoffwechsels wie die verschiedenen Cholesterine unterliegen einer zirkadianen Kontrolle (66, 80, 195, 238). Das dieser Effekt nicht nur durch den Schlaf-Wach-Rhythmus, sondern auch auf Ebene der molekularen Uhr entsteht, konnte in diversen Experimenten gezeigt werden (80, 166). So führt die Störung von Uhrengenen in Pankreas oder Leber, ebenso wie der Verlust der SCN-Funktion, zum Beispiel zu veränderten Blutglukosespiegeln (155).

Solange der Licht-Dunkel-Zyklus mit dem Tagesablauf übereinstimmt, stimmen die exogenen Faktoren und die endogenen Abläufe der inneren Uhr überein. Verschieben sich jedoch die Aktivität, Nahrungsaufnahme und der Licht-Dunkel-Zyklus durch z.B. Jetlag, elektrisches Licht oder Nachtschichten, kann es, wie bereits am Anfang der Einleitung beschrieben, zu Störungen der inneren Uhr und damit auch des Metabolismus (134, 135, 322, 323, 340, 366, 147, 156, 159, 180, 188, 211, 272, 316). Bei Mäusen führt Essen in der subjektiven Nacht nicht nur zur Desynchronisation des Stoffwechsels mit der

Uhrengenenexpression sondern in weiteren Versuchen mit hochkalorischer Nahrung auch zu Adipositas (8, 33). Sogar kurzfristige Schichtarbeitsszenarien unter Versuchsbedingungen führten zu einer veränderten Glukosetoleranz (166, 218). Eine Abweichung des 24 Stunden Tagesablaufs hinsichtlich einer Veränderung der Licht-Dunkel-Zeiten führte in mehreren Versuchen zu Adipositas der Versuchstiere (86, 87, 157, 230). Mäuse, aus deren Genom das Uhrengen *Bmall* entfernt wurde, zeigen schon in jungem Alter eine gesteigerte Fettmasse, sowie supprimierte oder gleichbleibende Adipokin-Expressionen (*Adipoq/Lep*) bei gleichzeitig insg. erniedrigten Serumspiegeln dergleichen und Dyslipidämien (117, 161, 240). *Clock*-Mutanten zeigen ein erhöhtes Körpergewicht, eine Hypertriglyzeridämie und eine geringere metabolische Rate als Wildtyp-Mäuse (319). *Per2*-negative Mäuse zeigen einen veränderten Lipidstoffwechsel und Hypotriglyceridämie (113). Menschen mit einem veränderten *BMALI*-Haplotyp neigen zu *Diabetes mellitus* Typ 2 und Hypertonus (346). Dass diese Veränderungen durch Essen zur richtigen Zeit und nicht verteilt über den ganzen Tag umgekehrt werden können, haben u.a. Chaix *et al.* 2019 in einer Studie an verschiedenen murinen (Maus) Uhrengen-Mutanten gezeigt (43). Über den Effekt des seit einigen Jahren an Popularität gewinnenden Intervallfastens (8 Stunden essen, 16 Stunden fasten) beim Menschen ist sich die Wissenschaft aktuell aufgrund einer geringen Studienlage noch unschlüssig (261, 345). In Tierversuche gibt es wiederum erste Hinweise für eine Verbesserung der Stoffwechselsituation (345).

Aber nicht nur die Störung der inneren Uhr hat Auswirkungen auf den Stoffwechsel, sondern auch ein veränderter metabolischer Status, wie Adipositas, kann zur Störung der Inneren Uhr führen. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Kalorienzufuhr mit einhergehender Adipositas zu einer veränderten Aktivitäts-Periode, abgeschwächten zirkadianen Zyklen der Nahrungsaufnahme und eine veränderte Expression von Uhrengenen in der Leber und im Fettgewebe führen kann (61, 79, 174, 270, 279, 358). Diese können durch erneute Ernährung mit normaler Nahrung aufgehoben werden (79).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Stoffwechsel und die innere Uhr miteinander interagieren und Chronodisruption langfristig zu ernstesten gesundheitlichen und damit gesellschaftlichen Konsequenzen führen kann.

## 1.4 Die zirkadiane Regulation des Fettgewebes

Wie im vorherigen Absatz angedeutet, beteiligt sich das Fettgewebe an der Tageszeit-abhängigen Energieversorgung des Körpers. Zum Beispiel oszillieren freie Fettsäuren und Glycerol tageszeitabhängig im Blut (12). Dieser Rhythmus wird nicht nur durch den SCN (176, 179), sondern teilweise auch durch zirkadiane Regulation auf Fettzellebene gesteuert (165). *In-vivo*-Studien mit humanen und murinen Fettgewebeproben aus WAT und BAT zeigten, dass sowohl Uhrengene, als auch wichtige metabolische Enzyme rhythmisch exprimiert werden (vgl. (166)). Im Rahmen einer Transkriptom-Analyse entdeckten Zvonic *et al.* 2006 insgesamt 650 rhythmisch exprimierte Transkripte in murinem IWAT, EWAT und BAT *in vivo* (369). Unter diesen rhythmisch exprimierten Transkripten waren neben der wichtigen Uhrengenen

auch Enzymen des Fettstoffwechsels (369). Die Hormon-sensitive Lipase und auch die Adipozyten-Triglycerid-Lipase, als wichtige Hormone in der Lipogenese, zeigten zirkadiane Rhythmen in murinem WAT *in vivo*, als auch in explantierten Fettgewebespöstern (EWAT) *in vitro* (175, 240, 291). Wenn CLOCK seine Funktion verliert, ist dieser Rhythmus aufgehoben (291). Der Stoffwechsel des Fettgewebes wird durch systemische Faktoren beeinflusst. Wenn systemischen Faktoren selbst einer zirkadianen Steuerung unterliegen, wirkt sich diese gleichermaßen auf die tageszeitabhängige Funktion des Fettgewebes aus. Wichtige zirkadian regulierte systemische Faktoren für das Fettgewebe sind das autonome Nervensystem (21, 30), Glukokortikoide und Insulin (155, 233, 234, 252, 308). Die letzteren zeigen zirkadiane Schwankungen im Blut, die ohne den SCN nicht mehr messbar sind (60, 187, 215, 270, 307). Die Tatsache, dass die zirkadiane Expression wichtiger Proteine in Fettzellen weiterhin besteht, auch wenn *in vivo* die molekulare Uhr des SCN oder der physiologische Glukokortikoid-Rhythmus ausgeschaltet sind (179, 308), spricht für eine endogene Steuerung auf Fettzellebene. So konnte gezeigt werden, dass Uhrengene in Adipozyten, auch unabhängig von externen oder internen Zeitgebern – sowohl an Fettgewebsexplantaten, als auch in etablierten Fettzelllinien (z.B. 3T3-L1-Adipozyten) – zirkadian exprimiert werden (28, 97, 107, 235, 350).

Das die Körpertemperatur im Tagesverlauf schwankt ist lange bekannt (vgl. (260)). Ob ein endogener zirkadianer Rhythmus, des braunen Fettgewebes hieran einen maßgeblichen Anteil hat, ist Teil aktueller Forschung. So konnten Gerhart-Hines *et. al.* 2013 zeigen, dass Mäuse mit genetischer Deletion von *Rev-erba* eine anhaltend hohe aber verminderte tageszeitliche Schwankung der Körpertemperatur aufweisen und diese Veränderung durch die aufgehobene Suppression der *Ucp1*-Expression durch REV-ERB $\alpha$  entstand (101). Außerdem zeigten Chappuis *et al.* das *Per2* über PPAR $\alpha$  Einfluss auf die *Ucp1* Expression nehmen kann (44). Auch wenn einige *in vivo* Studien zeigen konnten, dass *Ucp1* mRNA tatsächlich zirkadian exprimiert wird, sind die *in vitro* Daten und damit der Hinweis auf eine endogene zirkadiane Steuerung, bis auf eine Studie, ausstehend (193, 196, 324, 359).

Auch Adipokine, wie Leptin, Adiponectin, Visfatin und Resistin, weisen zirkadian oszillierende Blutspiegel auf (zusammengefasst in (165)). Allerdings ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob diese durch eine endogene Steuerung entstehen. So kommt es zu einem Maximum von Leptin und Adiponectin im Blut während der jeweiligen Aktivitätsphase von Menschen und Nagern (287, 295). Teilweise zeigten diese Studien *in vivo* auch eine rhythmische Expression von *Leptin* und *Adiponectin* mRNA (2, 98, 133, 154, 204, 287, 295, 309, 327, 369). Allerdings fehlen bisher *in vitro* Daten oder, wie in einer Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe, konnten keine endogen zirkadianen Rhythmen festgestellt werden (286).

Des Weiteren beeinflussen Uhrengene die Adipogenese und Lipogenese. Wie im vorherigen Absatz angedeutet konnten diverse Experimente *in vivo* zeigen, dass eine Ablation von *Bmal1* in Fettzellen zu vermehrter Adipositas führt (117, 161, 240). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von *Bmal1* in Fibroblasten aus Mausembryonen eine verstärkte Adipogenese zur Folge hat (117). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass BMAL1, REV-ERB $\alpha$ , CLOCK und PER über die Regulation von PPAR $\gamma$  die

Regulation der Adipozytenfunktion beeinflussen (195). Wie sich die zirkadiane Uhr im Laufe der Adipogenese (Differenzierung) verändert, wurde bisher nur in wenigen Experimenten untersucht (28, 235).

## 1.5 Fragestellung

Adipositas und damit assoziierte Erkrankungen stellen ein immer größer werdendes weltweites Problem in der Gesundheitsversorgung dar. Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, interagieren zirkadiane Uhr und Fettstoffwechsel miteinander. Um diese Interaktion weiter zu erforschen und für therapeutische Strategien zu nutzen, müssen geeignete Modelle zur Verfügung stehen. Für die Erforschung der inneren Uhr der Fettzellen gibt es bereits *in vivo*, *ex vivo* und *in-vitro*-Modelle (10, 18, 75). Da diese Modelle zeitaufwändig, material- und kostenintensiv sind, eignen sie sich nur begrenzt für groß angelegte Versuchsreihen. Hier kommen immortalisierte Zelllinien ins Spiel. Hierfür werden Zellen aus Gewebe isoliert und anschließend auf genetischer Ebene so verändert, dass ihre Teilungsfähigkeit lange erhalten bleibt (205). So können große Versuchsreihen mit relativ geringem Aufwand durchgeführt werden. Dieser Vorteil kann jedoch mit einer Veränderung der Zellphysiologie einher gehen (205), sodass immortalisierte Zellen auf den Erhalt ihrer zirkadianen Funktion hin untersucht werden müssen. Eine der bekanntesten zirkadian rhythmischen Adipozytenlinien ist die aus Mausembryonen isolierte Zelllinie 3T3-L1 (73, 110, 111, 235). Da sie jedoch aus Fibroblasten gezüchtet wurden, zeigen die daraus resultierenden reifen Adipozyten zwar mehr Ähnlichkeit mit weißen als mit braunen Adipozyten, aber keine eindeutige Spezifität bezüglich eines bestimmten Fettdepots (219). Für die Erforschung der zirkadianen Uhr der unterschiedlichen Fettdepots (s. Abschnitt 1.1.6) ist es aber wichtig mit der *In-vivo*-Situation vergleichbare Adipozytenmodelle zu etablieren. Außerdem würde sich solch ein Modell eignen um weitere Aspekte der zirkadianen Uhr, wie zum Beispiel die Entwicklung der Uhrgene im Rahmen der Differenzierung, zu erforschen.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit drei, mit dem Simian-Virus 40 T-Antigen (SV40T) immortalisierte Adipozytenzelllinien aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe männlicher Wildtyp-C57BL/6-Mäuse (171, 244, 336) auf ihre zirkadiane Funktion in Prä- und reifen Adipozyten hin untersucht.

Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf folgende Fragestellungen gelegt:

1. Zeigen SV40 T-immortalisierte Adipozyten aus murinem inguinalen, epididymalem und braunem Fettgewebe zirkadiane Rhythmen?
2. Gibt es Unterschiede der zirkadianen Rhythmik in Prä- und reifen Adipozyten?
3. Wie vergleichbar ist das zirkadiane Verhalten der Uhrgene *in vitro* mit der Situation *in vivo*?
4. Sollte die zirkadiane Uhr erhalten geblieben sein, sind die Adipokine Leptin und Adiponectin sowie der Protonenkanal UCP1 dann zirkadian rhythmisch exprimiert?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Zellkultur SV40 T-Antigen immortalisierter Adipozyten

Zellkulturarbeiten fanden grundsätzlich unter einer biologischen Sicherheitswerkbank statt (SAFE 2020, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*). Materialien und Gegenstände wurden vor dem Transfer unter die Sicherheitswerkbank mit 70 % Ethanol besprüht. Die Zellen wurden in einem Inkubator (HeraTherm, *Thermo Fisher Scientific*) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die verwendeten Zellkulturmedien und Substanzen, mit Ausnahme von Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (*Thermo Fisher Scientific*), wurden vor Anwendung auf 37 °C vorgewärmt. Für die Aufrechterhaltung der Kultur, Zellpassage und Expansion wurden Zellkulturplatten mit 100 mm (10 ml Kulturmedium) oder 150 mm (30 ml Kulturmedium) Durchmesser verwendet (*Corning, Corning, USA*). Die Experimente erfolgten in Zellkulturschälchen (ø 35mm), 6-Loch- oder 12-Loch-Platten (*Corning*).

#### 2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten immortalisierten Adipozyten-Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um mithilfe des SV40 T-Antigens immortalisierte Adipozyten aus inguinalen, epididymalen und braunem Fettgewebe (IWAT, EWAT und BAT) von männlichen Wildtyp-C57BL/6-Mäusen (170, 244, 336). Bis zur Verwendung wurden die immortalisierten Zellen in Kryoröhrchen (*Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland*) in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.1.2 Zellkulturmedium

##### Tabelle 1: Grundmedium (GM)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/L Glukose, GlutaMAX™ Supplement	(gibco, <i>life technologies™</i> )
+ 20 % Fetal Bovine Serum (Hitze inaktiviert) (FBS)	(gibco, <i>life technologies™</i> )

##### Tabelle 2: Differenzierungsmedium (DM)

GM		
+ 1 nM	3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (T <sub>3</sub> )	( <i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i> )
+ 20 nM	Rinderpankreas-Insulin (Insulin)	( <i>Sigma-Aldrich</i> )

**Tabelle 3: Induktionsmedium (IM)**

DM		
+	250 µM	Indometacin ( <i>Sigma-Aldrich</i> )
+	500 µM	3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX) ( <i>Sigma-Aldrich</i> )
+	2 µg/ml	Dexamethason (Dexa) ( <i>Sigma-Aldrich</i> )

### 2.1.3 Auftauen und Einfrieren

Es erfolgte die Entnahme der Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstofftank mit anschließendem Auftauen der Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der Dichtungsring der Kryoröhrchen mithilfe einer Schaumstoffplatte oberhalb der Wasseroberfläche gehalten und die Kryoröhrchen vor dem Platzieren unterhalb der Sicherheitswerkbank mit 70 % Ethanol besprüht. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Zellkulturplatten (Ø 100 mm), mit auf 37 °C vorgewärmtem GM, überführt.

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Kulturmedium von den adherent wachsenden Zellen vorsichtig entfernt, die Zellen zweimalig mit DPBS gespült und anschließend mit 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA (*gibco, life technologies*<sup>TM</sup>) für 3 min bei 37 °C inkubiert (Trypsinierung). Die Serinprotease Trypsin spaltet hierbei die Oberflächenproteine der Zellen, sodass diese sich von der Zellkulturplattenoberfläche lösen können. Zum Abstoppen der Proteasereaktion wurde anschließend GM hinzugefügt und die Zellsuspension in Zentrifugen-Röhrchen (*Corning*) überführt und 3-5 min bei 1300 rpm und 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der entstandene Zellniederschlag in GM mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (*Sigma-Aldrich*) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und kontrolliert mit einer Rate von 1 °C/min in einem Gefrierbehälter (Cryo 1° Cooler, *Tarsons*) eingefroren. Anschließend erfolgte die Überführung und Lagerung in Flüssigstickstoff (-196 °C).

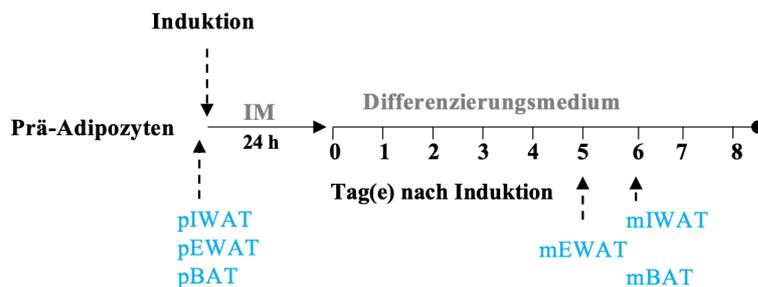
### 2.1.4 Zellpassage und Zellzahlbestimmung

Bei einer Zellkonfluenz von 60-80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimalig mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 3-minütige Trypsinierung mit 2 ml (100 mm Platte) oder 3 ml (150 mm Platte) Trypsin-EDTA. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung von der Platte wurde die Reaktion mit 6-10 ml GM abgestoppt. Die Zellsuspension wurde daraufhin in gewünschter Verdünnung auf neue Platten mit vorgelegtem GM verteilt. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen unterhalb der 30. Passage verwendet.

Vor der Aussaat für ein Experiment erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer, um die ausgesäte Zellzahl innerhalb eines Experimentes gleich zu halten ( $0,5-2 \times 10^5$  Zellen/Loch abhängig von der verwendeten Plattengröße).

### 2.1.5 Adipozytendifferenzierung

Für die Differenzierung von Prä-Adipozyten in Fett akkumulierende, reife Adipozyten erfolgte eine Aussaat in DM anstelle GM. Nach Erreichen einer 100%-igen Konfluenz, wurde für 24 h auf IM (zur Induktion des Differenzierungsvorganges), anschließend wurde zur Aufrechterhaltung der Differenzierung zurück auf DM gewechselt. Daraufhin folgte eine Kultivierung der Adipozyten in DM bis zum Erreichen des gewünschten Differenzierungstages, mit zu Beginn 48- und im Verlauf 24-stündlichem Medienwechsel (Abbildung 5). Tag 0 entspricht dem Zeitpunkt nach 24 Stunden Kultivierung in IM. Bei unterschiedlicher Differenzierungsgeschwindigkeit der Zelllinien ergab sich eine unterschiedliche Anzahl an Tagen bis zum Erreichen der Ausdifferenzierung (reife Adipozyten). Die Festlegung erfolgte nach zellmorphologischen Kriterien wie der Fetttropfen-Akkumulation in ausgereiften Adipozyten. So ergab sich für Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe eine abgeschlossene Differenzierung an Tag 5 (mEWAT) und für die Adipozyten aus inguinalem und braunem Fettgewebe (mIWAT, mBAT) an Tag 6. Für die Experimente in Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2 wurden jeweils Proben von nicht-synchronisierten Prä- und reifenden Adipozyten an Tag 0, Tag 3 und, je nach Zelllinie (s.o.), an Tag 5/6 (reife Adipozyten) und 7/8 genommen (n = 3 pro Tag).



**Abbildung 5: Differenzierungsschema**

Differenzierungsschema der immortalisierten Prä-Adipozyten (p) aus inguinalem (IWAT), epididymalem (EWAT) und braunem (BAT) Fettgewebe zu reifen (m) Adipozyten. Die Induktion der Differenzierung erfolgte bei vollständiger Konfluenz mit Induktionsmedium für 24 Stunden. Versuche mit Prä-Adipozyten (pIWAT, pEWAT, pBAT) erfolgten vor der Induktion bei voller Konfluenz. Versuche mit reifen Adipozyten erfolgte an oder ab Tag 5 (mEWAT) oder Tag 6 (mIWAT/mBAT) nach Induktion.

## 2.2 Oil Red O-Färbung und Triglycerid-Bestimmung

Für einen Qualitativen und Quantitativen Nachweis der Differenzierung der Adipozyten wurden diese mit Oil Red O (1-{{4-(Xylylazo)xylyl}azo}-2-naphthol) gefärbt. Oil Red O ist ein Azofarbstoff, der speziell an Triglyceride binden kann und somit die Lipidtropfen in den differenzierenden Adipozyten anfärbt. Nach Fotodokumentation kann der Farbstoff aus dem Gewebe herausgewaschen werden und mittels Bestimmung der optischen Dichte (OD bei  $\lambda = 500 \text{ nm}$ ) der Waschlösung die akkumulierte Triglyceridmenge bestimmt und somit als quantitatives Maß der Differenzierung genutzt werden.

### 2.2.1 Zell-Fixierung

Vor der Färbung erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd-Lösung (PFA). Dafür wurden die Zellen auf Eis zweimal vorsichtig mit DPBS gewaschen und anschließend mit PFA (4%, s. Tabelle 4) bedeckt, mit Parafilm verschlossen und bis zur Färbung bei 4 °C gelagert. Bei der Herstellung und dem Umgang mit Paraformaldehyd wurde unter einer Abzugshaube und mit geeigneten Körperschutzmaßnahmen gearbeitet.

**Tabelle 4: Paraformaldehyd-Lösung (pH 7,4)**

0,4 g/l	Paraformaldehyd-Granulat	<i>(Electron Microscopy Science)</i>
50 %	Destilliertes Wasser	
50 %	PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)	
Tropfen	50 %-ige Natronlauge	

### 2.2.2 Oil Red O-Färbung

Für die Färbung der Zellen wurde die Oil Red O-Färbung angewandt. Dafür wurde zuerst eine Oil Red O-Stammlösung angesetzt (Tabelle 5), die dann bei Bedarf zu einer fertigen Oil Red O-Arbeitslösung weiterverarbeitet wurde (Tabelle 6). Für die Färbung der Zellen wurde die PFA-Lösung sorgfältig von den Zellen entfernt und vorschriftsgemäß entsorgt. Anschließend wurde die Oil Red O-Arbeitslösung direkt auf die Zellen gegeben (12-Loch-Platte 0,5 ml/Loch, 6-Loch-Platte 1 ml/Loch). Nach einer Stunde Färbung wurde die Arbeitslösung entfernt und die gefärbten Zellen mehrfach vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Färbung ließen sich kleine Farbpartikelrückstände, v.a. bei den Prä-Adipozyten, nicht vollständig entfernen und wurden toleriert. Anschließend erfolgte die Dokumentation der Färbung mittels mikroskopischer Aufnahmen. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C, bedeckt mit destilliertem Wasser.

**Tabelle 5: Oil Red O-Stammlösung**

Isopropanol			
+	<b>5 g/l</b>	Oil Red O-Pulver	<i>(Sigma-Aldrich)</i>

**Tabelle 6: Oil Red O-Arbeitslösung (filtriert)**

60%	Oil Red O-Stammlösung
40%	Destilliertes Wasser

### 2.2.3 Bestimmung des Triglyceridgehaltes mittels optischer Dichte (OD)

Je mehr Triglyceride die Adipozyten enthalten, desto mehr Oil Red O wird während der Färbung in den Zellen gebunden. Im Anschluss kann das gebundene Oil Red O wieder herausgewaschen werden. Je mehr Farbstoff in der Waschlösung ist, das heißt, je optisch dichter die Lösung ist, desto mehr Fett hat sich in den Zellen ursprünglich befunden. Letzendlich dient die optische Dichte hier als Möglichkeit der Quantifizierung der Differenzierung der Adipozyten.

Die Auswaschung des Farbstoffs erfolgte mit derselben Isopropanol-Menge, die ursprünglich an Oil Red O-Arbeitslösung hinzugegeben worden war (s. Abschnitt 2.2.2). Dafür wurde zuerst das Wasser von den Zellen entfernt und das Isopropanol auf die Zellen gegeben, nach 45 min wieder entfernt und in Reaktionsgefäße überführt. Mit dem Spektralphotometer (Epoch, *BioTek*) wurde anschließend die Absorption bei 500 nm gemessen. Die Proben wurden vor der Messung mit Isopropanol verdünnt, um eine Absorption zwischen 0,1 und 1,0 zu gewährleisten. Die Messung fand in technischen Duplikaten statt. Zur Berechnung der normalisierten OD wurde von der Durchschnittsabsorption der technischen Duplikate die Eigenabsorption des Lösungsmittels (Isopropanol) abgezogen und anschließend zu den Werten der Prä-Adipozyten der jeweiligen Zelllinie normalisiert.

## 2.3 Lentivirale Transduktion von Luciferase-Reportern

Für die Aufnahme von Biolumineszenzrhythmen im Luminometer wurde mit Hilfe von lentiviralen Vektoren die Geninformation für das Enzym Luciferase in die gewünschten Zellen eingeschleust. Die cDNA der Luciferase wird dazu an den Promotor des zu analysierenden Gens (hier die Uhrgene *Per2* bzw. *Bmal1*) gekoppelt. Das Luciferaseenzym katalysiert die Bildung von instabilen Luciferinen die beim anschließenden Zerfall Licht emittieren. Diese Biolumineszenz kann über mehrere Tage gemessen und so die Aktivität der verwendeten Uhrgen-Promoter aufzeichnet werden.

Um endogene Biorhythmen in den mit SV40 T-Antigen immortalisierten Adipozyten zu erforschen, wurden zwei Uhrgenreporter (für *Per2* und *Bmal1*) produziert und die entsprechenden Luciferase-Expressionskonstrukte mit Hilfe von Lentiviren (LV) in die Zellen transduziert. Zusätzlich wurde ein viraler eGFP-Expressionsvektor (verstärktes grün fluoreszierendes Protein) hergestellt, bei dem die eGFP-Expression durch den *EF-1 $\alpha$*  Promotor konstant reguliert wird. Er diente dazu, eine erfolgreiche Transduktion durch das Lentivirus nachzuweisen.

Für die Herstellung der Lentiviren werden drei verschiedene Plasmide benötigt. Eines bildet das spätere Hüllprotein (pMD2.G, von Didier Trono, *addgene*, *Plasmid #12259*), eines das die Hilfsproteine, Gag und Pol (psPAX2, von Didier Trono, *addgene*, *Plasmid #1226*) bildet und das Plasmid mit dem Reportergen. Die hier verwendeten Plasmide der Reportergene finden sich in Tabelle 7.

Fertige pWPT-GFP-Plasmide und pABpuro-BLuF-Plasmide wurden mir freundlicherweise von Dr. Anthony Tsang zur Verfügung gestellt. Versuche mit vitalen Lentiviren wurden nach S2-Sicherheitsstandards durchgeführt.

**Tabelle 7: Reportergen-Plasmide**

Plasmid	Reportergen	
pWPT-GFP	EGFP	<i>addgene</i> , <i>Plasmid #12255</i>
pPer2-Luc	<i>Per-2</i> -Luciferase	Achim Kramer, Berlin
pABpuro-BLuF	<i>Bmal-1</i> -Luciferase	<i>addgene</i> <i>Plasmid #46824</i> , Prof. Steven Brown, University of Zurich, Switzerland (34),

### 2.3.1 Plasmid-Produktion

#### 2.3.1.1 *Escherichia coli*-Kultivierung (pPer2-Luc-, pMD2.G- und psPAX2-Produktion)

Plasmide (s. Abschnitt 2.3) wurden in *Escherichia coli* (*E.coli*)-Bakterien amplifiziert. Diese wurden zu Beginn auf vorbereiteten Ampicillinhaltigen ( $c_{\text{End}} = 100 \text{ g/l}$ ) Lysogeny broth (LB) - Agar-Platten aufgetragen und über Nacht im Inkubator kultiviert. Durch eine in den Plasmiden beinhaltete Penicillin-Resistenz konnten am nächsten Morgen einzelne Plasmid-positive Kolonien in mit 5 ml LB-Medium

(Tabelle 8) befüllte Rundboden-Röhrchen überführt werden. Die beimpften Rundboden-Röhrchen wurden anschließend bei 34 °C über Nacht auf einer Rüttlerplatte inkubiert. Zur Expansion der Bakterien erfolgte die Überführung von je 500 µl Bakteriensuspension in 250 ml LB-Medium. Es folgte eine erneute Kultivierung über Nacht bei 34 °C auf der Rüttlerplatte. Für die weitere Verarbeitung wurde die Bakteriensuspension bei 4 °C und 6000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand entsorgt. Der Zellniederschlag wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 8: LB-Medium (autoklaviert)**

Deionisiertes Wasser (H<sub>2</sub>O)

+	10 g/l	Tryptone
+	5 g/l	Hefeextrakt
+	10 g/l	Natriumchlorid (NaCl)
+	100 g/l	Ampicillin

*2.3.1.2 Plasmid-Isolation*

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurden das QIAprep Spin Miniprep Kit von *QIAGEN*, sowie das NucleoBond Xtra Midi Kit von *Macherey und Nagel* verwendet. Aus der Starterkultur konnte mit Hilfe des Miniprep eine erste Probe der Plasmid-DNA gewonnen werden, an der die Qualität des Plasmids überprüft werden konnte. Mit Hilfe des Midipreps konnte daraufhin eine ausreichende Menge an Plasmid aus 250 ml Bakteriensuspension gewonnen werden. Bei beiden Kits wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Zur Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Epoch, BioTek) die Absorptionen der Proben bei 260 und 280 nm gemessen (Programm: Gen5 2.00, Nucleic Acid Quantification, Probenotyp: ssDNA, Leerwert: Reinstwasser, Menge: 2 µl) und anschließend die Konzentration [ng/µl] berechnet.

*2.3.1.3 Agarosegelherstellung und Gelelektrophorese*

Zur Überprüfung der Plasmidgröße und -identität wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Als Referanzmaß wurde eine 1kb-DNA-Leiter von *New England BioLabs* verwendet (10 µl). Die Herstellung des Agarose-Gels erfolgte mit 1 % Agarose-Pulver in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE; 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8,2-8,4). Der Elektrophoreseansatz pro Gelkammer bestand aus 1 µg Plasmid-DNA [µl], 2 µl DNA Loading Dye (6X) (*Thermo Scientific*, visuelle Fortschrittskontrolle) und destilliertem Wasser [µl] ( $V_{\text{Gesamt}} = 12 \mu\text{l}$ ). Die Laufspannung betrug 70 Volt. Nach ca. 20 min Laufzeit wurde das Gel zur Markierung der DNA mit Ethidiumbromid (200 ml TAE-Puffer + 15 µl Ethidiumbromid) gefärbt, unter ultraviolettem Licht (UV) sichtbar gemacht und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

### 2.3.2 Lentivirus-Produktion

Die HEK293T-Zelllinie (HEK) aus humanen embryonalen Nierenzellen ist eine seit langem in der Lentivirus-Herstellung genutzte und in der Handhabung unkomplizierte Zelllinie (210, 227). Nach Co-Transfektion von Reporter-, Hüllprotein und Hilfsprotein-Plasmid werden die Proteine in der Zelllinie exprimiert und zu funktionsfähigen Lentiviren verpackt (227).

#### 2.3.2.1 HEK293T-Zellkultur

Die Kultivierung und Vermehrung der HEK-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Für die Vorbereitung der Transfektion wurden die HEK-Zellen auf mit Poly-D-Lysin (PDL) bedeckte Zellkulturschalen (ø 10 cm) ausgesät. Vor der Aussaat wurde das Zellkultur-Medium (Tabelle 9) vorsichtig abgesaugt, die Zellen einmal mit DPBS gewaschen, anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA (5 min Inkubation) von der Platte gelöst und vorsichtig auf mehrere PDL-beschichtete Zellkulturschalen überführt, in denen bereits vorgewärmtes Kulturmedium (10 ml) vorgelegt worden war.

**Tabelle 9: HEK-Zellkulturmedium**

DMEM (4,5 g/L Glukose, GlutaMAX)			
+	10 %	FBS	
+	100 U/ml / 100 µg/ml	Penicillin/ Streptomycin	(PenStrep (100X), PAA Cell, Culture Company)

#### 2.3.2.2 HEK293T-Transfektion

Bei einer Zelldichte von 50-80 % fand eine Transfektion der HEK-Zellen mit dem Xfect Transfection Reagent von *Clontech* statt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die eingesetzte Plasmid-Zusammensetzung ist Tabelle 10 zu entnehmen. Die Reaktionsvorsätze (Tabelle 11 und Tabelle 12) wurden vereint, der fertige Reaktionsansatz dann bei Raumtemperatur 10 min inkubiert und vorsichtig zu den HEK-Zellen in das Kulturmedium gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und vorsichtig neues Kulturmedium zugegeben.

**Tabelle 10: Eingesetzte Plasmid-DNA**

	15 µg	Reporter-Plasmid-DNA (Reportergene s. Tabelle 7)
+	10 µg	psPAX2-Plasmid-DNA
+	5 µg	pMD2.G-Plasmid-DNA

**Tabelle 11: Reaktionsvoransatz 1 (VGesamt = 600 µl)**

30 µg Plasmid-DNA  
 + Xfect Reaktions-Puffer

**Tabelle 12: Reaktionsvoransatz 2**

9 µl Xfect Polymer  
 + 591 µl Xfect Reaktions-Puffer

**2.3.2.3 Virusernte und Konzentration**

48 Stunden nach Transfektion erfolgte die erste Ernte des Virus-reichen Mediumüberstands in Reaktionsgefäße. Die Proben wurden bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Nach Entfernen des virusreichen Mediums, Waschen der HEK-Zellen mit DPBS und erneuter Gabe frischen, angewärmten Mediums für weitere 24 Stunden erfolgte eine zweite Ernte des Virus mit anschließendem Verwerfen der Virus-produzierenden HEK-Zellen. Die das Virus enthaltende Flüssigkeit wurde im nächsten Schritt zum Teil direkt weiterverwendet und zum Teil mit dem LentiX Konzentrator von *TaKaRa* nach den Herstellerangaben aufbereitet und anschließend bei -80 °C gelagert.

**2.3.3 Lentivirale Transduktion**

Zusätzlich zu den immortalisierten Prä-Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe wurden auch NIH-3T3-Zellen als Positiv-Kontrolle transduziert. Die NIH-3T3-Zelllinie ist eine gut etablierte murine Fibroblasten-Zelllinie, bei der die lentivirale Transduktion von Uhrenreportern gute Ergebnisse zeigt (49, 221, 291). Die Kulturbedingungen glichen denen der anderen Zelllinien, und das Zellkulturmedium entsprach dem HEK-Zellkulturmedium (Tabelle 9). Vor der Transduktion wurde ein Medienwechsel bei Prä-Adipozyten und NIH-3T3-Zellen durchgeführt und einmal mit DPBS gewaschen. Der Transduktionsansatz bestand aus Zellkulturmedium und 0,1 % Polybrene (Hexamdimethrinbromid, *Sigma-Aldrich*) und, je nach Versuch, 50 % virushaltigem Medium (unkonzentriert) bzw. 10-50 µl konzentriertem Virus. Nach 24 Stunden wurde das Transduktionsmedium entfernt und auf normales Zellkulturmedium gewechselt.

**2.3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Überprüfung der erfolgreichen lentiviralen Transduktion der Adipozyten wurden drei Tage nach erfolgter eGFP-Transduktion Fluoreszenzaufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus CKX41) angefertigt (Aufnahmezeit 500 ms, Anregungslicht-Wellenlänge  $\lambda = 488$  nm (blau)). eGFP leuchtet nach Anregung grün ( $\lambda = 509$ ). Die Transduktion für diese Aufnahmen fand mit unkonzentriertem Virus statt.

### 2.3.3.2 Selektion

Das *Per2-Luc*-Plasmid trägt eine Blasticidin-Resistenz, sodass in den immortalisierten Prä-Adipozyten der Selektionsversuch einer stabil-transduzierten *Per2-Luc*-positiver Adipozytenlinie unternommen wurde. Für die Selektion wurden drei Blasticidin-Konzentrationen getestet, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml. Zellen, die mit 10 µg/ml Blasticidin behandelt wurden, waren eine Passage später alle tot. 5 µg/ml Blasticidin wurden gut toleriert und für die weitere Selektion über 18 Tage eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung eingefroren (s. Abschnitt 2.1.3). Die Transduktion für die Selektion fand mit unkonzentriertem Virus statt.

Das *Bmall-Luc*-Plasmid trägt eine Puromycin-Resistenz, welche zur Etablierung einer stabil transduzierten Zelllinie nicht genutzt werden konnte, da die immortalisierten Adipozyten diese Resistenz ebenfalls trugen.

## 2.4 Lumineszenz-Aufzeichnungen endogener Rhythmen

Die Aufnahme der Zellrhythmen erfolgte in einem LumiCycle Luminometer der Firma *Actimetrics* oder einem TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader der Firma *Berthold Technologies*. Die mit *Per2-Luc* und *Bmall-Luc* transduzierten Zellen wurden dafür in einzelne 35mm-Petrischalen (LumiCycle) oder 24-Loch-Zellkulturplatten (TriStar) ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für zwei Stunden mit 500 nM Dexamethason synchronisiert. Anschließend wurde auf ein Luciferin-haltiges Medium (LC-Medium, Tabelle 13) gewechselt und die Petrischalen mit Silikongel und einem Deckgläschen, bzw. einer Klebefolie (24-Loch-Platte), verschlossen. Im Anschluss begann die Messung im Luminometer. Während der Vorbereitungen wurden die Zellen auf einer Wärmeplatte warmgehalten und die Lichtexposition aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Luciferins auf ein Minimum reduziert.

**Tabelle 13: LC-Medium**

	Farbloses DMEM (4,5 g/L Glukose, ohne Glutamin, ohne Pyruvat)	(gibco, life technologies™)
+	10 % / 20 % FBS (NIH-3T3 / Adipozyten)	
+	10 mM HEPES (1M)	(gibco, life technologies™)
+	2 mM GlutaMax	(gibco, life technologies™)
+	3 mM Natriumcarbonat	
+	1 µM D-Luciferin	(AppliChem)
+	100 U/ml, PenStrep (NIH-3T3)	(PAA Cell, Culture Company)
	100 µg/ml	

## 2.5 Zeitprofil endogener Expressionsrhythmen

Um die Expression der Uhrgene im Zeitverlauf zu bestimmen, wurden Zeitprofile angefertigt. Dafür wurden Prä-Adipozyten und reife Adipozyten von IWAT, EWAT und BAT mit Dexamethason synchronisiert und im Anschluss alle fünf Stunden Zellproben für eine relative Expressionsanalyse von Uhrgenen (*Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock*) sowie *Ucp1* und den Adipokine-Genen *Lep* (Leptin) und *Adipoq* (Adiponectin) genommen. Der Versuchsbeginn für Zeitprofile bei reifen Adipozyten lag an Tag 5 (mEWAT) bzw. Tag 6 (mIWAT, mBAT) nach Differenzierungsinduktion.

Die Aussaat der Prä-Adipozyten erfolgte in 12-Loch-Platten, die der reifen Adipozyten in 6-Loch-Platten (3 Proben je Zeitpunkt (ZP)). Bei 100 % Konfluenz bzw. nach Ausdifferenzierung wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Dexamethason (*Dr. Peter Conrad e.K.*) für 30 min synchronisiert und anschließend das dexamethasonhaltige Medium durch frisches Medium ersetzt (ZP 0). Um einzelne Platten gleichzeitig aus dem Versuch nehmen zu können, wurden die verschiedenen Zeitpunkte (*i.e.* Platten) im Abstand von 5 Stunden synchronisiert. Um einen erneuten Synchronisationsstimulus aufgrund einer Temperaturveränderung bei den bereits synchronisierten Proben zu vermeiden, wurden die Dexamethason-Applikation und der Mediumwechsel auf Warmhalteplatten durchgeführt. Der Kontroll-Versuch mit EWAT-Prä-Adipozyten erfolgte entsprechend des allgemeinen Versuchsaufbaus mit DPBS (20  $\mu$ l) anstelle von Dexamethason.

Zur Probengewinnung, wurde je 1 ml Trizol pro 6-Loch-Plattenloch und 0,5 ml Trizol pro 12-Loch-Plattenloch auf Eis appliziert und die Probe durch Auf- und Abpipettieren vom Boden gelöst, homogenisiert, in RNase-freie 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und anschließend bei - 80 °C gelagert.

## 2.6 Molekulargenetische Methoden

### 2.6.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mit TRIZOL-Reagenz (*Invitrogen*). Vor der Isolation wurden alle Oberflächen und Geräte mit einer RNAase-Dekontaminationslösung (RNaseZap™, *Ambion*) behandelt und ausschließlich RNase-freie Plastikprodukte verwendet. Die Isolation erfolgte auf Eis und die Zentrifugationsschritte bei 4 °C. Die Arbeit mit TRIZOL und Chloroform wurde unter einer Abzugshaube getätigt und der Abfall vorschriftsgemäß entsorgt. Um eine zügige Verarbeitung zu gewährleisten, wurde die Zahl der gleichzeitig verarbeiteten Proben auf 12-15 begrenzt. Die zuvor bei -80 °C gelagerten Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 200  $\mu$ l Chloroform / ml TRIZOL versetzt, für 10-15 s geschüttelt und 5 min auf Eis gelagert. Die Proben reifer Adipozyten wurden vor der Chloroformzugabe 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Hierbei trennten sich die Triglyceride (TG) von der wässrigen Phase und die nun TG-freie wässrige Phase konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Nach der Inkubation auf Eis wurde für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Bei der dadurch entstandenen Dreischichtung enthält die obere wässrige Phase die RNA, die darunter folgende weiße Schicht die DNA;

die unterste organische Schicht enthält die Proteine und Zellreste. Im nächsten Schritt wurde die RNA-enthaltende Schicht in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Alte verworfen. Um eine DNA-Kontamination hierbei zu vermeiden, wurde auf einen ausreichenden Pipettierabstand zur DNA-haltigen Interphase geachtet. Anschließend wurde den Proben 500 µl vorgekühltes Isopropanol / ml TRIzol und 1 µl Glycoblue (Ambion, *life technologies*) hinzugefügt und gut vermischt. Daraufhin wurden die Proben mindestens 30 min auf Eis gelagert, anschließend bei 14.000 rpm für ebenfalls mindestens 30 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Der entstandene RNA-Niederschlag wurde mit 1 ml vorgekühltem 70 %-igen Ethanol versehen und für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand erneut entfernt. Anschließend folgte ein Trocknungsschritt bei Raumtemperatur für 10-15 min, je nach Größe des Niederschlags. Abschließende wurde der RNA-Niederschlag in Reinstwasser (Typ-1, Milli-Q-System, *Merck*) gelöst und die Konzentration mit dem Spektralphotometer (Epoch, *BioTek*) gemessen. Programm: Gen 5 2.00, Nucleic Acid Quantification, Probenotyp: RNA, Leerwert: Reinstwasser, Menge: 2 µl. Das 260 nm/280 nm-Absorptionsverhältnis lag stets zwischen 2.0 und 2.2. Konzentrationen über 1.500 ng/µl wurden auf < 1.000 ng/µl verdünnt.

## 2.6.2 cDNA-Gewinnung durch reverse Transkription (RT)

Für die Transkription von RNA zu cDNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*) verwendet. Für die Reaktion wurden 3 µg RNA in geeignete Reaktionsgefäße eingebracht, das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und anschließend 10 µl RT-Master Mix (s. Tabelle 14) hinzugegeben. Die RT-Reaktion erfolgte im Anschluss in einem FlexCycler von *analytik jena* (RT-Programm s. Tabelle 15). Nach der Reaktion wurden die Proben mit Nuklease-freiem Wasser 1:10 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 14: RT-Master-Mix / Probe**

2 µl	10x RT Puffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100 mM)
2 µl	10x RT random hexamer primers
1 µl	MultiScribe RT (50 U/µl)
4,2 µl	Nuclease-freies Wasser

**Tabelle 15: RT-Programm**

25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

### 2.6.3 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Für die Analyse der Genexpressionen wurde eine quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (pPCR) durchgeführt. Hierbei wird die cDNA des Zielgens mithilfe einer thermophilen DNA-Polymerase vervielfältigt, wobei sich in jedem Zyklus DNA-Doppelstränge bilden. An diese Doppelstränge lagert sich ein Fluoreszenzfarbstoff an, dessen Signal detektiert wird. Für die Reaktion wurde der GoTaq® qPCR Master Mix (*Promega*) mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green verwendet. Um die alleinige Vervielfältigung (Amplifikation) des Zielgenes zu gewährleisten, werden sogenannte Primer genutzt. Primer sind kurze DNA-Einzelstränge, die sich spezifisch an die cDNA des Zielgens anlagern. Im anschließenden Elongationsschritt wird der Doppelstrang vervollständigt und anschließend das entstandene Fluoreszenzsignal gemessen sowie die Doppelstränge durch Erhitzung auf 96 °C wieder voneinander getrennt. Danach beginnt der Prozess von vorne. So kommt es in jedem Zyklus optimalerweise zu einer Verdopplung des vorliegenden Zielgenes und damit des Signals. Um das zu gewährleisten und die Ergebnisse verschiedener Zielgene miteinander vergleichen zu können, lag die Duplikationseffizienz der verwendeten Primer bei 90-110 %. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 16 aufgelistet. Während der Vorbereitungen des Reaktionsansatzes standen alle Substanzen und die 96-Loch-Mikrotiterplatte auf Eis. Pro Loch wurden zuerst 5 µl cDNA vorgelegt und anschließend 15 µl Reaktions-Mix (Tabelle 17 und Tabelle 18) hinzugefügt, die Platte luftdicht verschlossen, gut gemischt und für eine Minute bei 2000 rpm zentrifugiert. Die anschließende qPCR fand in einem C1000 Thermal Cycler von *BioRad* statt (CFX96 Real-Time System; Amplifikationsablauf s. Tabelle 19). Mit Hilfe der *BioRad* CFX-Software konnten die Ct-Werte (Detektionsschwellwerte) ausgelesen werden. Die Ct-Werte spiegeln die Anzahl an Zyklen wider, die benötigt werden, bis das Fluoreszenzsignal über einen bestimmten Schwellenwert ansteigt. Je mehr cDNA des Gens ursprünglich vorhanden war, desto schneller wird diese Schwelle erreicht und desto niedriger ist der Ct-Wert. Daraus können mit Hilfe eines Referenzgenes relative Expressionsstärken berechnet werden. Das Referenzgen sollte dauerhaft und gleichmäßig von der Zelle exprimiert werden. Das hier verwendete Referenzgen war *Eef1a1* (eukaryotic translation elongation factor1- $\alpha$ 1), Teil eines Elongationsfaktors, welcher für die Überführung der tRNA zum Ribosom mitverantwortlich ist (164, 331) und schon zuvor als Referenzgen in Studien der molekularen Uhr und Adipozytendifferenzierung Verwendung fand (23, 100, 143, 144, 286). Die relative Expression wurde mittels der Pfaffl-Methode (245) berechnet. Bei Ct-Werten über 38 wurde das Zielgen als „nicht-exprimiert“ angesehen.

**Tabelle 16: Primer Paare**

Zielgen	Vorwärts-Primer Sequenz	Rückwärts-Primer Sequenz
<i>Eef1a</i>	5'-CACATCCCAGGCTGACTGT-3'	5'-TCGGTGGAAATCCATTTTGTT-3'
<i>Bmal1</i>	5'-TGACCCTCATGGAAGGTTAGAA-3'	5'-CAGCCATCCTTAGCACGGT-3'
<i>Per2</i>	5'-GCCAAGTTTGTGGAGTTCCTG-3'	5'-CTTGCACCTTGACCAGGTAGG-3'
<i>Dbp</i>	5'-AATGACCTTTGAACCTGATCCCGCT-3'	5'-GCTCCAGTACTTCTCATCCTTCTGT-3'
<i>Rev-Erba</i>	5'-AGCTCAACTCCCTGGCACTTAC-3'	5'-CTTCTCGGAATGCATGTTGTTC-3'
<i>Npas2</i>	5'-CAGCAGCCACCACCCTATT-3'	5'-TGCGGAGGTGTAGACTGTGT-3'
<i>Clock</i>	5'-ATGGTGTTTACCGTAAGCTGTAG-3'	5'-CTCGCGTTACCAGGAAGCAT-3'
<i>Pref-1</i>	5'-TCTGCGAGGCTGACAATGTC-3'	5'-CAGATGCACTGCCATGGTTC-3'
<i>aP2</i>	5'-CACCGCAGACGACAGGAAG-3'	5'-GCACCTGCACCAGGGC-3'
<i>Lep</i>	5'-GAGACCCCTGTGTCTGGTTC-3'	5'-CTGCGTGTGTGAAATGTCATTG-3'
<i>Ucp1</i>	5'-GTGAACCCGACAACCTCCGAA-3'	5'-TGAAACTCCGGCTGAGAAGAT-3'
<i>Adipoq</i>	5'-GCAGGCATCCCAGGACATC-3'	5'-GCGATACATATAAGCGGCTTCT-3'

**Tabelle 17: Primer-Mix (1,4 µM)**

14 µl	Vorwärts-Primer (100 µM)
+ 14 µl	Rückwärts-Primer (100 µM)
+ 972 µl	Nuklease-freies Wasser

**Tabelle 18: Reaktions-Mix / Probe**

5 µl	Primer-Mix (1,4 µM)
+ 10 µl	GoTaq® qPCR Master Mix

**Tabelle 19: Amplifikationsprogramm Thermal-Cycler**

94 °C	5 min	
94 °C	15 s	x40
60 °C	15 s	x40
72 °C	20 s	x40
72 °C	5 min	

## 2.7 Datenauswertung und statistische Analyse

Die Luminometerdaten wurden mit dem LumiCycle Analysis-Programm, Version 2.56, von *Actimetrics* und dem MikroWin-Programm, Version 4.41, von *Mikrotek Laborsysteme GmbH* exportiert. Die weitere Verarbeitung und Analyse erfolgte mit *Microsoft Office Excel*, Prism 5 von *GraphPad* und JTK\_Cycle (141).

Die relative Expression der gemessenen Gene wurden anhand der qPCR-Daten mit der Pfaffl-Methode (245) berechnet und wie in den einzelnen Ergebnisteilen beschrieben normalisiert. Die Datenaufbereitung erfolgte mit *Microsoft Office Excel*.

Zur Verbesserung der Abbildungsqualität wurden Kontrast und Helligkeit der Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 9 A um 40 % verstärkt (*Microsoft Office PowerPoint*).

Die graphische Darstellung der Netzdiagramme in Abbildung 17 A und Abbildung 18 A erfolgte mit *Microsoft Office Excel* und *PowerPoint*. Die anteiligen gemeinsamen Phasenlagen (Abbildung 17 E und Abbildung 18 C) wurden mittels Gewichtsbestimmung (M-pact AX224, *Sartorius*) der einzelnen ausgedruckten und dann ausgeschnittenen Teilflächen jedes Netzdiagrammes (Abbildung 17 A und Abbildung 18 A, ohne Kreis) berechnet. Anschließend erfolgte die Darstellung mit dem „Venn Diagramm Maker“ auf <https://www.meta-chart.com> (330) und die farbliche Modifikation mit *Microsoft Office PowerPoint*.

Die Analyse der relativen Expressionen von den Uhrengenen, *Adipoq*, *Lep* und *Ucp1* (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.3) auf zirkadiane Rhythmik, Periode und Phase wurde mit dem JTK\_Cycle Algorithmus durchgeführt (141). JTK\_Cycle ist ein nicht-parametrischer Algorithmus für die Ermittlung einer signifikanten Rhythmik ( $p < 0,05$ ) innerhalb eines Expressionsprofils über die Zeit und ermittelt gleichzeitig Periodenlänge ( $\tau$ ) und Phase ( $\phi$ , 1. Maximum). Als „zirkadian“ wurden Rhythmen mit einer Periodenlänge von  $24 \pm 4$  h gewertet. Jede volle Stunde zwischen 20 und 28 h wurde auf signifikante Rhythmik getestet. Für die weitergehende Analyse wurde jedem Gen diejenige Periode zugewiesen, die den kleinsten p-Wert aufwies. Wiesen mehrere Periodenlängen denselben kleinsten p-Wert auf, wurde jene Periodenlänge als Periode definiert, welche den 24 Stunden am Nächsten war. Um Anpassungsreaktionen in den ersten Stunden nach der Synchronisation auszuschließen, wurden die Zeitpunkte 0-10 h nach Synchronisation von der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse wurde nach der Normalisierung auf den ZP 0 nach Synchronisation der jeweiligen Prä-Adipozyten einer Zelllinie durchgeführt. Zur Berechnung der Amplitude (A) wurde von der relativen Expression der gleitende Mittelwert über 20 h abgezogen, anschließend das Maximum und Minimum bestimmt und die Differenz halbiert.

Für die statistische Analyse der Abschnitte 3.1.1, 3.2.1, 3.2.4, 3.3 und 3.5 wurden aufgrund der niedrigen Stichprobenzahlen geeignete, im folgenden Absatz genauer definierte, nicht-parametrische Testverfahren verwendet. Die Analyse der optischen Dichte in Abbildung 6 B erfolgte mittels Jonckheere-Terpstra-Test in *IBM SPSS* (Build 1.0.0.1072). Zuvor wurde die Optische Dichte des Lösungsmittels Isopropanol von der jeweiligen gemessenen Optischen Dichte abgezogen.

Für die statistische Analyse der Amplituden in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.4 war es nötig, von allen Werten (Min. und Max., s. Berechnung Amplitude oben) zusätzlich zum 20h-Mittelwert die Durchschnittsminimalwerte abzuziehen. Durch Abzug des halbierten Maximaldurchschnitts von den ermittelten Maximalwerten (Amplitude) konnte der Effekt der Differenzierung mit einer ungewichteten, nicht parametrischen Varianztestung auf ANOVA- Basis (rankFD – Paket in R (36, 314)) untersucht werden. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ . Für die Analyse der Uhrengenenexpressionsänderung im Laufe der Differenzierung (Abschnitt 3.3, Abbildung 24) wurde eine Varianztestung nach dem F1 LD F1 Model des nparLD-Paket in R durchgeführt (226, 314). Hierbei handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test auf modifizierter ANOVA-Basis, der für Messwiederholungen innerhalb einer Stichprobe geeignet ist, da unterschiedliche Gene in einer Stichprobe gemessen wurden. Das Signifikanzniveau entsprach  $p < 0,05$ . Für die statistische Auswertung wurde am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik Lübeck eine biometrische Beratung im Umfang von ca. 2,5 Stunden in Anspruch genommen. Der Mann-Whitney-Test in Abschnitt 3.5 wurde mit GraphPad Prism durchgeführt. Im Text wurden Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die Kastengraphiken in den Abschnitten 3.2.1, 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.6 sind wie folgt aufgebaut: Die obere Begrenzung der Box entspricht dem 75 % Quartil, die untere dem 25 % Quartil, der Strich in der Mitte dem Median und die Antennen stellen jeweils die 5. und 95. Perzentile der Daten dar.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Differenzierung immortalisierter Prä-Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Zur Untersuchung der zirkadianen Uhr in Prä-Adipozyten und reifen Adipozyten mussten die fibroblastenähnlichen Prä-Adipozyten zu Triglycerid (TG)-anreichernden reifen Adipozyten differenziert werden.

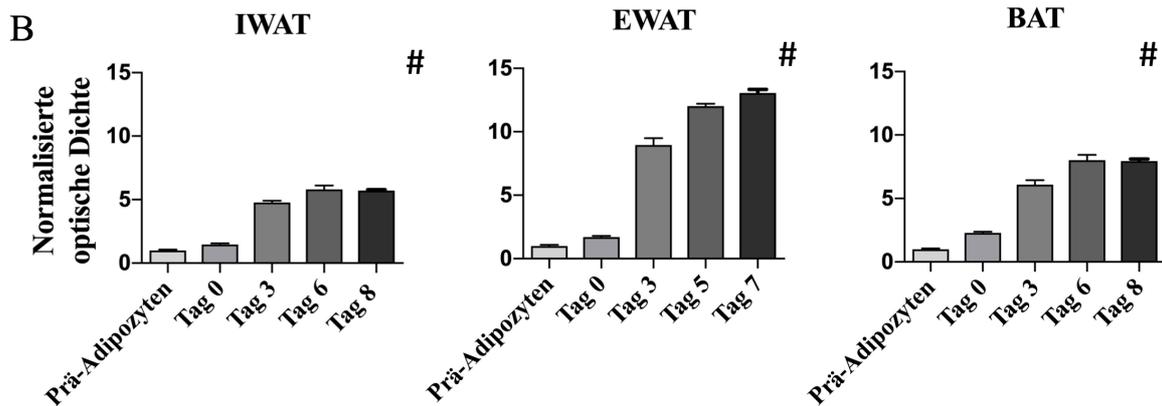
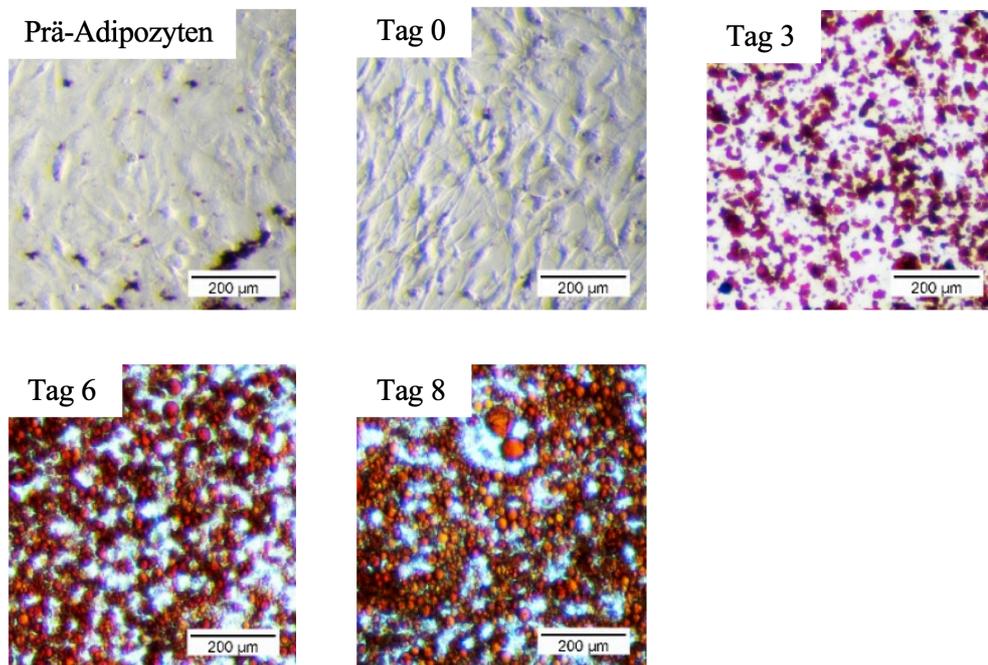
#### 3.1.1 Triglycerid-Akkumulation

Im Rahmen der Differenzierung wurden zunehmend größere und zahlreicher werdende intrazelluläre Lipidvakuolen sichtbar. Die Entwicklung ist am Beispiel von Adipozyten inguinalen Ursprungs (IWAT) in Abbildung 6 A abgebildet. Die sich in den Lipidvakuolen befindlichen TG wurden mit Oil Red O gefärbt. Prä-Adipozyten und Adipozyten am Tag nach der Induktion (Tag 0) zeigten noch keine Lipidvakuolen und damit auch noch keine Oil Red O-Anreicherung. Bei der Quantifizierung zeigte sich insgesamt eine signifikante Steigerung des TG-Gehaltes während der Differenzierung in allen drei Zelllinien (Abbildung 6 B). Im Speziellen zeigte sich eine 5,8-fache (IWAT), eine 12,0-fache (BAT) und eine 8,0-fache (EWAT) Zunahme des TG-Gehaltes vom Prä-Adipozytenzustand bis nach erfolgter Differenzierung (Tag 5/6).

#### 3.1.2 mRNA Expression unterschiedlicher Differenzierungsmarker

Für den weiteren Nachweis der erfolgten Differenzierung wurde die relative Expression der Prä-Adipozytenmarker *Pref-1*, der Differenzierungsmarker *aP2*, ebenso wie das Adipokin *Leptin (Lep)* und den Protonenkanal *Ucp1* bestimmt. Die Normalisierung erfolgte jeweils zu den Prä-Adipozyten. Alle drei Adipozytenlinien zeigten eine relative Expressionszunahme des Differenzierungsmarkers *aP2* (Abbildung 7). Bei Adipozyten aus IWAT kam es zu einer Zunahme um das 159-fache, bei Adipozyten aus EWAT um das 26-fache und bei Adipozyten aus BAT um das 73-fache. Die relative Expression von *Pref-1* nahm im Laufe der Differenzierung bei allen drei Zelllinien ab. Bei Adipozyten aus IWAT sank die Expression um 88,6 %, bei Adipozyten aus EWAT um 75,2 % und bei Adipozyten aus BAT um 88,1 %. Des Weiteren zeigte sich bei allen drei Zelllinien eine Zunahme in der relativen *Lep*-Expression. *Lep* im IWAT zeigte einen Anstieg um das 1250-fache, in EWAT um das 32-fache. In den ausdifferenzierten Zellen braunen Fettgewebsursprungs zeigte sich ebenfalls ein relativer *Lep*-Anstieg um das 424-fache. Als Marker für braunes Fettgewebe wurde die relative *Ucp1*-Expression gemessen. Auch diese stieg bei allen drei Zelllinien an. Bei Adipozyten aus BAT um das 135-fache, bei Adipozyten aus IWAT um das 22-fache und bei Adipozyten aus EWAT um das 1880-fache. Die Original-Ct-Werte finden sich im Anhang in Tabelle 20.

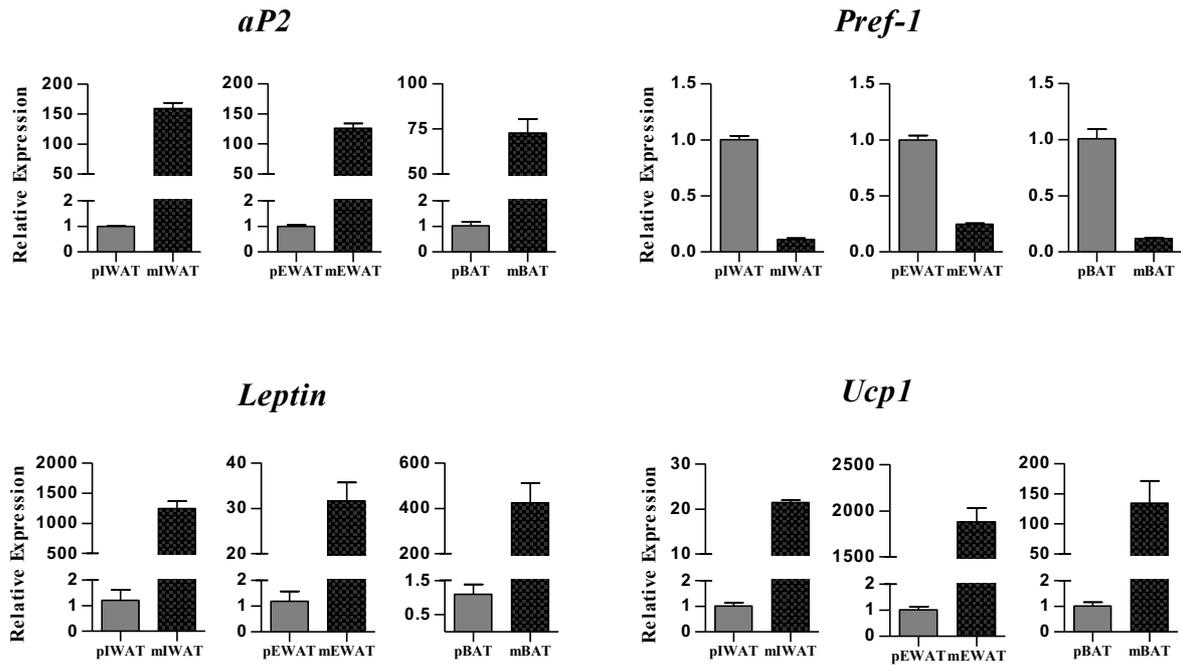
A



**Abbildung 6: Differenzierung von Prä-Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe**

**A** Oil Red O-Färbung bei Prä-Adipozyten und Adipozyten an Tag 0, 3, 6 und 8 der Differenzierung aus IWAT. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 200 µm.

**B** Triglycerid-Akkumulation in differenzierenden Adipozyten aus inguinalem (IWAT) epididymalem (EWAT) und braunem Fettgewebe (BAT). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; n=3. # - signifikanter Anstieg über den Verlauf der Differenzierung ( $p < 0,05$ , Jonckheere-Terpstra-Test).



**Abbildung 7: Relative Expression von aP2, Pref-1, Lep und Ucp1**

Relative mRNA-Expression von *aP2*, *Pref-1*, *Leptin* und *Ucp1* in Prä- und reifen Adipozyten. Die Daten der reifen Adipozyten (IWAT/BAT Tag 6, EWAT Tag 5) wurden auf die Prä-Adipozyten normalisiert. Referenzgen: *eEF1a*, n=3, Mittelwert ± SEM.

## 3.2 Endogene zirkadiane Rhythmen immortalisierter Adipozyten aus murinem inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

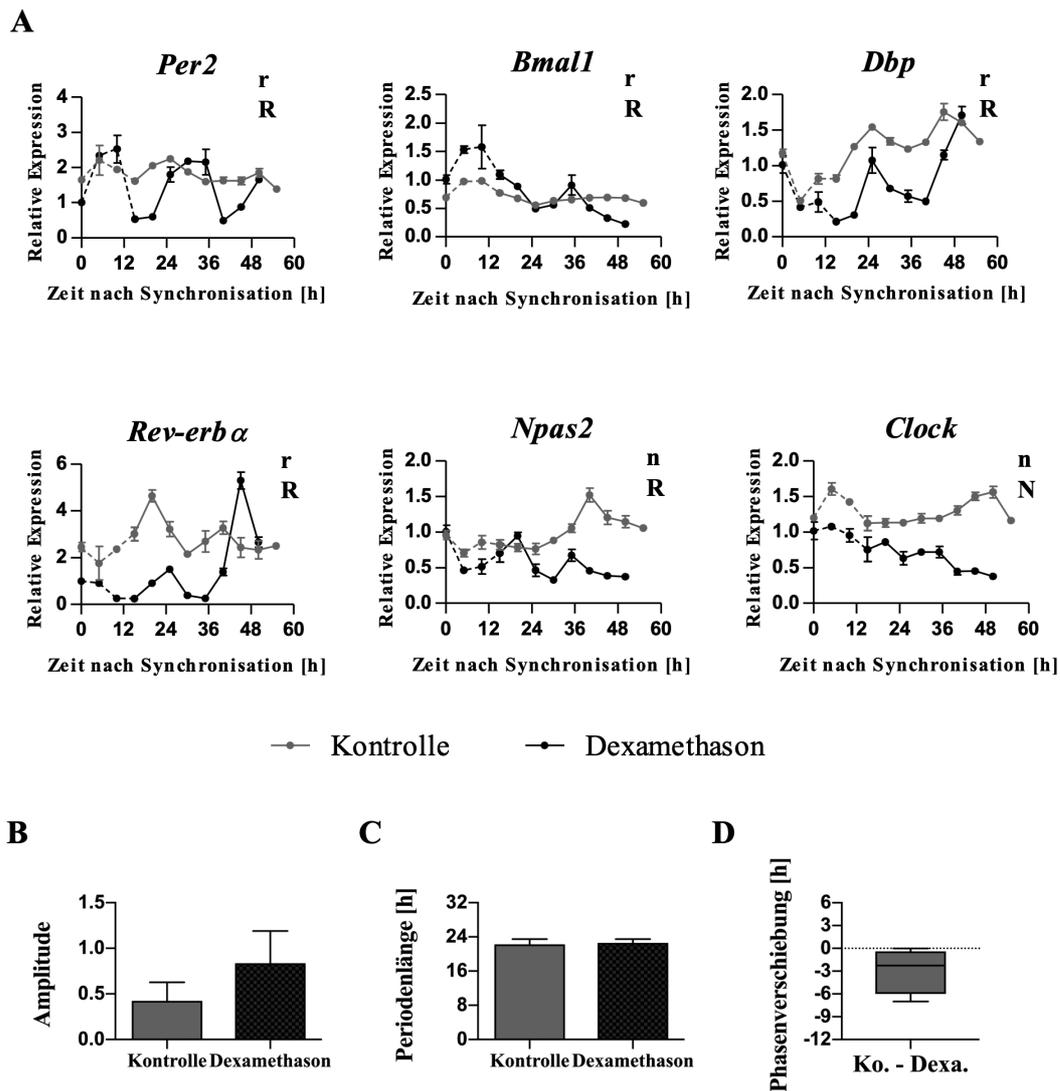
Aus diversen Studien ist bereits bekannt, dass Prä- und reife Adipozyten eine selbsterhaltende, endogene zirkadiane Uhrengenenexpression besitzen (28, 235, 291, 350). In den folgenden Versuchen sollte die endogene Rhythmik in murinen, mit SV40 T-Antigen immortalisierten Adipozyten inguinalen, epididymalen und braunen Fettgewebsursprungs untersucht werden. Dafür wurden Synchronisationsversuche im Luminometer und mittels mRNA-Expressionsmessung im Zeitprofil durchgeführt.

### 3.2.1 Einfluss von Dexamethason auf die endogene Rhythmik von immortalisierten Prä-Adipozyten epididymalen Ursprungs

Zur Untersuchung endogener Rhythmen *in vitro* werde Zellen im Allgemeinen synchronisiert. Dafür gibt es unterschiedliche Methoden (28, 235, 291, 350). Dexamethason wurde bereits als probates Synchronisationsmittel eingesetzt (28, 350). Um den Effekt von Dexamethason auf die immortalisierten Adipozyten zu untersuchen, wurde ein Zeitprofil von Prä-Adipozyten epididymalen Ursprungs mit Dexamethason behandelt (Dexamethason-Kondition, Dexa) und die mRNA-Expression von *Per2*, *Bmall*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* mit einem Profil ohne Dexamethasonzugabe (Kontrolle) verglichen.

*Per2*, *Bmall*, *Dbp* und *Rev-erba* waren in beiden Konditionen rhythmisch exprimiert (Abbildung 8 A, s. Anhang Tabelle 21). Das *Clock*-Paralog *Npas2* zeigte keine signifikante zirkadiane Expression in der Kontrolle ( $p = 0,337$ ), während es in der Dexamethason-Kondition signifikant rhythmisch wurde ( $p < 0,001$ ). *Clock* dagegen zeigte in beiden Konditionen keine signifikante zirkadiane Expression ( $p > 0,05$ ).

Es zeigten sich zudem Unterschiede in den Amplituden der Rhythmen nach der Dexamethason-Behandlung. Für *Per2* zeigte sich eine Amplitudenzunahme in den Dexamethason behandelten Zellen um das 2,9-fache, für *Bmall* um das 3,8-fache, für *Dbp* um das 1,6-fache und für *Rev-erba* um das 2,2-fache. Wobei sich die große Amplitudenzunahme bei *Rev-erba* vor allem aus der Höhe des 2. Maximums ergab. Die vereinfachte Darstellung der durchschnittlichen Amplitudensteigerung ist in Abbildung 8 B gezeigt. Für die statistische Auswertung dieses Anstiegs wurden die Amplituden wie in Abschnitt 2.7 beschrieben analysiert. Es zeigte sich ein signifikanter Amplitudenanstieg nach Synchronisation ( $p = 0,004$ , rankFD-Paket, R, s. Anhang Abbildung 22). Die Amplituden von *Npas2* und *Clock* wurden aufgrund ihres nicht eindeutig zirkadian rhythmischen Verhaltens hierbei nicht berücksichtigt. Die mittlere Periodenlänge der rhythmischen Gene war zwischen den Konditionen vergleichbar (Kontrolle 22,3 h, Dexamethason 22,6 h) (Abbildung 8 C). Die Phasenverschiebung betrug im Durchschnitt  $-2,87 \text{ h} \pm 1,51 \text{ h}$  nach (Abbildung 8 D).



**Abbildung 8: Effekt von Dexamethason auf die endogene Rhythmik von Prä-Adipozyten epididymalen Ursprungs (EWAT)**

**A** Relative mRNA-Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* im Zeitprofil nach Mediumwechsel (Kontrolle) und nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen: eEF1 $\alpha$ . Normalisierung der Daten auf ZP0 der Dexamethason-Kondition. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3 pro ZP (n = 2 für ZP10). JTK\_Cycle – Analyse ab 15 h nach Synchronisation (durchgezogene Linie); R/r – zirkadian rhythmisch Dexamethason-Kondition/Kontrolle ( $p < 0,05$ ), N/n – nicht rhythmisch Dexamethason-Kondition/Kontrolle ( $p > 0,05$ ).

**B** Mittlere Amplitude aller in A rhythmischen Gene (s.o) vereinfacht dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM (Kontrolle n = 4, Dexamethason n = 5).

**C** Mittlere Periodenlänge. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, Dexamethason-Kondition n = 5, Kontrolle n = 4.

**D** Phasenverschiebung der ersten Maxima von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-erba* beider Konditionen (JTK\_Cycle, Kontrolle - Dexamethason), dargestellt als Kastengraphik (MW, SD, 95- Perzentile), n = 4.

### 3.2.2 Lentivirale Transduktion und Messung endogener Rhythmen im Luminometer

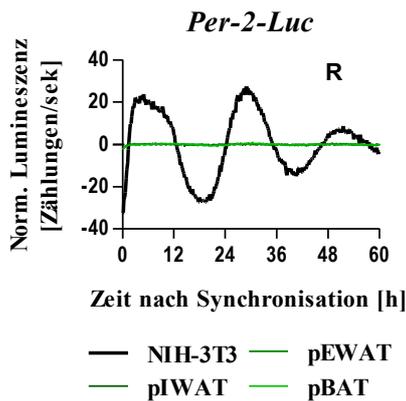
Für eine kontinuierliche Messung von zirkadianen Rhythmen mit hoher zeitlicher Auflösung eignet sich die Messung von Uhrengenerator-gekoppelten Luciferase-Aktivitäten in einem Luminometer. Hierfür genutzte Promotoren waren *Bmal1* und *Per2* (*Bmal1-Luc*, *Per2-Luc*).

Um die Transduktionsfähigkeit der Adipozyten durch die Lentiviren zu überprüfen, wurde der Lumineszenzfarbstoff eGFP transduziert. Bei allen drei Zelllinien konnte eGFP in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 9 A). Daraufhin erfolgte die lentivirale Transduktion mit unkonzentriertem Virus von *Per2-Luc* auf Prä-Adipozyten inguinalen (pIWAT), epididymalen (pEWAT) und braunen (pBAT) Fettgewebsursprungs. Zusätzlich wurden NIH-3T3-Zellen zur Überprüfung der Plasmidfunktion und der Methode ebenfalls mit *Per2-Luc* transduziert (Positiv-Kontrolle). Da Dexamethason im Vorversuch die Zellen effektiv synchronisierte (s. Abschnitt 3.2.1), kam hier die Synchronisation der Zellen mit Dexamethason über zwei Stunden zum Einsatz. In der anschließenden Luminometer-Messung zeigte sich eine gute Aktivität der Luciferase in den NIH-3T3-Zellen, jedoch nicht in den IWAT-, EWAT- und BAT-Prä-Adipozyten (Abbildung 9 B und Abbildung 9 D). In den Rohdaten zeigten sich Messwerte nahe des Grundrauschens (Daten nicht gezeigt). Eine Transduktion mit konzentriertem *Per2-Luc*-LV ohne erneute Zellpassage nach Transduktion brachte keine Verbesserung des Signalniveaus (Daten nicht gezeigt). Die *Bmal1-Luc* Transduktion mit unterschiedlichen Virusmengen in Prä-Adipozyten epididymalen Ursprungs ergab ebenfalls eine nicht verwertbare Signalstärke (Daten nicht gezeigt). Für eine Auswertung mit dem LumiCycle-Analysis-Programm eigneten sich die erhaltenen Datensätze aus Abbildung 9 B der transduzierten Prä-Adipozyten nicht, weshalb hier eine Analyse mit JTK\_Cycle (48 Stunden nach Synchronisation) angeschlossen wurde. Für die Analyse wurden zum gleitenden Mittelwert über 24 h normalisiert und stündliche Lumineszenzdaten eingesetzt (Abbildung 9 C). Diese Analyse ergab eine signifikante zirkadiane Rhythmik für pIWAT, pEWAT und pBAT ( $p < 0,05$ ). pIWAT zeigte eine Periode von 20 h, eine Phase (1. Maximum) von 9,5 h und eine Amplitude von 0,16 Zählungen/s. pEWAT zeigte eine Periode von 20 h, eine Phase von 9,5 h und eine Amplitude von 0,29 Zählungen/s. pBAT zeigte eine Periode von 21 h, eine Phase von 10,5 h und eine Amplitude von 0,39 Zählungen/s. Die Positiv-Kontrolle (NIH-3T3) zeigte eine Periode von 23 h, eine Phase von 6,5 h und eine Amplitude von 29,16 Zählungen/s. Die Amplitude der NIH-3T3-Zellen entsprach ungefähr dem 100-fachen der Prä-Adipozyten-Amplitude.

**A**



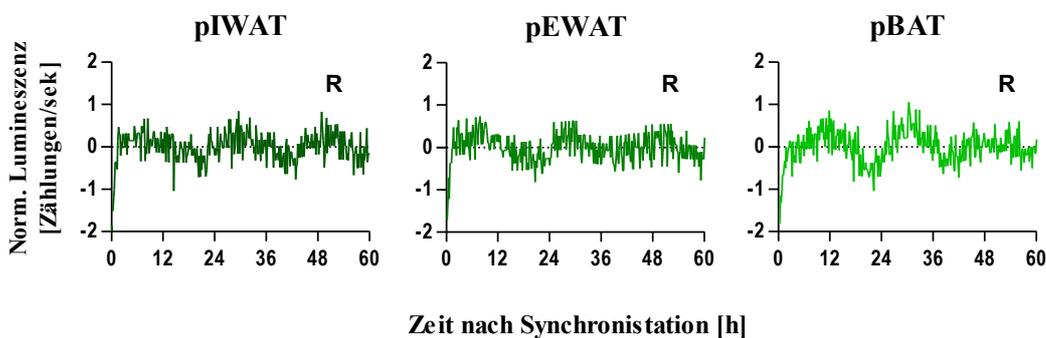
**B**



**C**

	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude [h]
NIH-3T3	4,53E-18	23	6,5	29,16
pIWAT	1,88E-02	20	9,5	0,16
pEWAT	2,91E-07	20	9,5	0,29
pBAT	1,53E-12	21	10,5	0,39

**D**



**Abbildung 9: Per-2-Luciferase-Rhythmen**

**A** Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen (Excitation bei  $\lambda = 488\text{nm}$ ) von eGFP-positiven Prä-Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT. Balken = 200  $\mu\text{m}$ .

**B** *Per2*-Luciferase-Aktivität von mit *Per-2-Luc* transduzierten NIH-3T3-Zellen und Prä-Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT im LumiCycle über 60 Stunden nach Synchronisation. Normalisierung der Daten auf den gleitenden Mittelwert über 24 h. Dargestellt sind 10-minütige Lumineszenzdaten als Mittelwert ohne Fehlerbalken, NIH-3T3 n = 1, pIWAT/pEWAT/pBAT n = 6. R – signifikante zirkadiane Rhythmik der NIH-3T3 Daten (Analyse von stündlichen Werten mit JTK\_Cycle).

**C** JTK\_Cycle-Analyse der stündlichen Daten aus **B/D** über 48 Stunden.

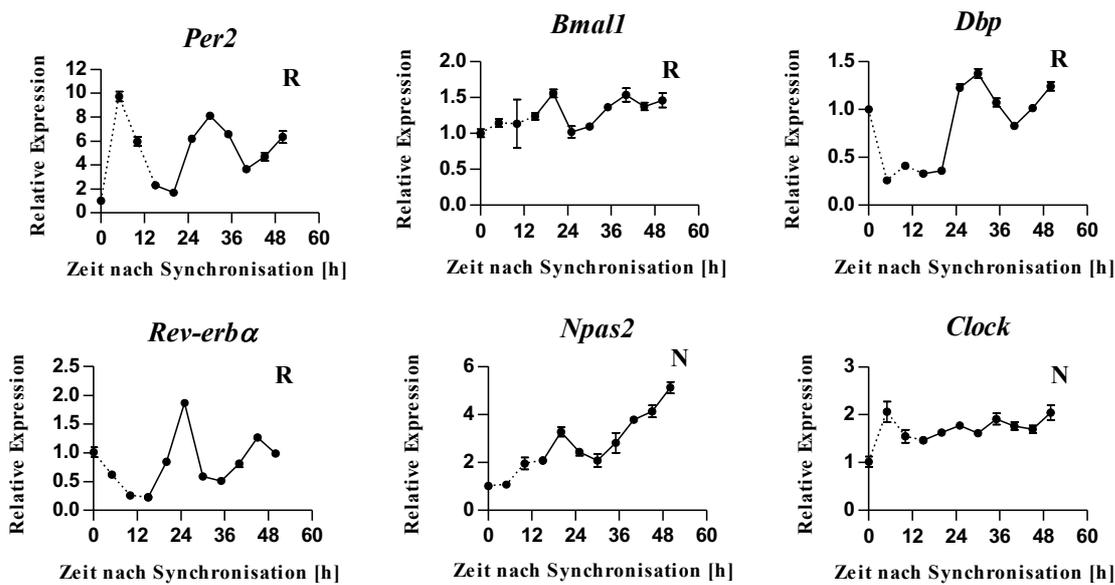
**D** Messdaten aus **A** zur besseren Darstellung mit angepasster x-Achse. Normalisierung der Daten auf den gleitenden Mittelwert über 24 h. Dargestellt sind 10-minütige Lumineszenzdaten als Mittelwert ohne Fehlerbalken, n = 6 pro Messpunkt und Zelllinie. R – signifikante zirkadiane Rhythmik (Analyse von Stündlichen Werten mit JTK\_Cycle).

### 3.2.3 Zeitprofile der Uhrengenenexpression von Prä- und reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalen und braunem Fettgewebe

Der vorangegangene Versuch ergab Hinweise auf eine zirkadiane Expression des Uhrengens *Per2* in allen drei Zelllinien. Zur weiteren Untersuchung der Uhrengene in den immortalisierten Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe erfolgte nun die Erstellung von Zellprofilen der jeweiligen Prä- und reifen Adipozyten über 50-55 Stunden nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen war *eEF1 $\alpha$* . Die Normalisierung erfolgte auf ZP0 der Prä-Adipozyten der jeweiligen Zelllinie. Die Analyse auf signifikante zirkadiane Rhythmik, Periodenlänge ( $\tau$ ) und Phase ( $\Phi$ ) erfolgte anschließend mit JTK\_Cycle ab ZP15. Perioden von 20-28 Stunden wurden als zirkadian rhythmisch definiert. Die Amplitude (A) berechnete sich wie in Abschnitt 2.7 erklärt.

#### 3.2.3.1 Uhrengenenexpression in immortalisierten Prä-Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe (pIWAT)

Im Zeitprofil der immortalisierten Prä-Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe zeigte sich die relative Expression von *Per2* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 15,5$  h,  $A = 2,87$ ), *Bmal1* ( $\tau = 22$  h,  $\Phi = 3,5$  h,  $A = 0,28$ ), *Dbp* ( $\tau = 25$  h,  $\Phi = 15$  h,  $A = 0,43$ ) und *Rev-erba* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 9$  h,  $A = 0,91$ ) als signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ , Abbildung 10). *Clock* und sein Paralog *Npas2* wiesen keine signifikante zirkadiane Rhythmik auf (*Clock*  $p = 0,167$ ; *Npas2*  $p = 0,065$ ). Aufgrund der ermittelten Phase lässt sich sagen, dass *Bmal1* als Erstes sein Expressionsmaximum erreicht und *Per2* und *Dbp* als Zielgene von CLOCK:BMAL1 antiphasisch dazu exprimiert wurden. *Rev-erba* zeigte sein 1. Maximum als weiteres Zielgen von CLOCK:BMAL1 ebenfalls später als *Bmal1*, aber früher als *Per2* und *Dbp*. Die höchste Amplitude zeigte sich in der mRNA-Expression von *Per2*. Genaue p-Werte und eine übersichtliche Auflistung der Werte finden sich im Anhang in Tabelle 22.

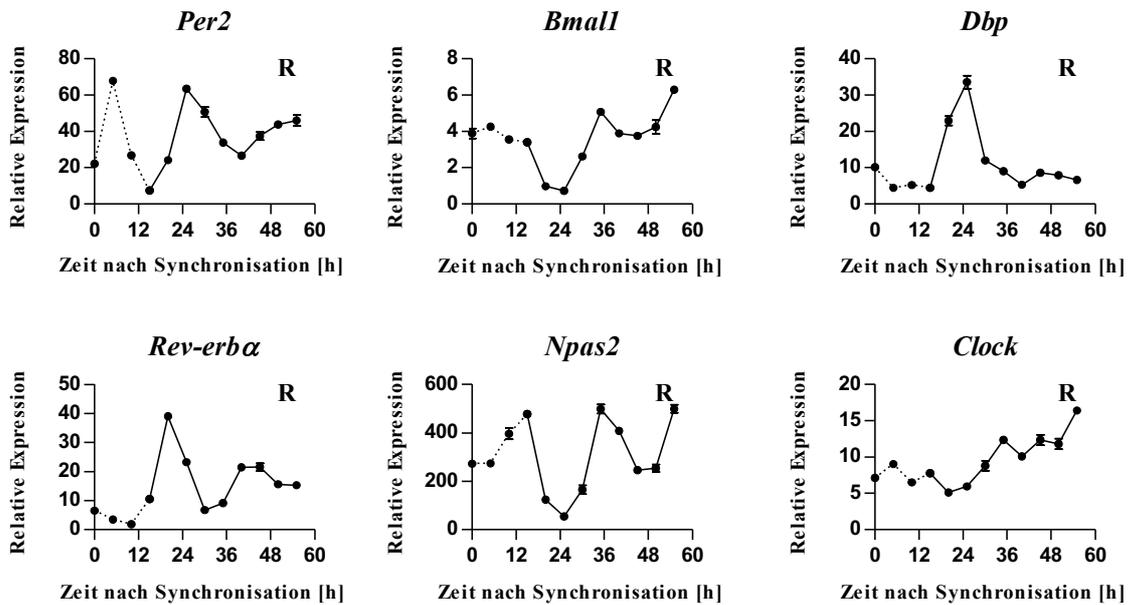


**Abbildung 10: Uhrengenenexpression in Prä-Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe**

Relative mRNA-Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* über 50 h nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen ist *eEF1a*; normalisiert wurde auf ZP0. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3 pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) erfolgte mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ ); N – nicht zirkadian rhythmisch ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3.2 Uhrengenenexpression in immortalisierten reifen Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe (mIWAT)

Nach erfolgter Differenzierung zeigte sich weiterhin eine signifikante zirkadian rhythmische Expression ( $p < 0,05$ , Abbildung 11) von *Per2* ( $\tau = 24$  h,  $\Phi = 12$  h,  $A = 25,92$ ), *Bmal1* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 20,5$  h,  $A = 1,85$ ), *Dbp* ( $\tau = 24$  h,  $\Phi = 9,5$  h,  $A = 16,51$ ) und *Rev-erba* ( $\tau = 22$  h,  $\Phi = 6$  h,  $A = 16,46$ ) in Adipozyten inguinalen Fettgewebes. Neu dazugekommen war eine signifikant zirkadiane mRNA-Expression von *Clock* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 18$  h,  $A = 2,5$ ) und *Npas2* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 20,5$  h,  $A = 235$ ). Es zeigte sich erneut eine antiphasische Expression der verschiedenen Gene des positiven und negativen Arms des TTL mit dem ersten Maximum von *Per2*, *Dbp* und *Rev-erba* in der einen Hälfte des 24h-Messintervalls und *Bmal1*, *Clock* und *Npas2* in der anderen. *Npas2* und *Bmal1* zeigten eine ähnliche Periode und Phase. Die größte Amplitude zeigte *Npas2*, gefolgt von *Per2*. Insgesamt wurde eine größere Amplitude als in den Prä-Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe beobachtet, ebenso wie ein insgesamt höheres Expressionsniveau. Die genauen p-Werte und eine Übersichtlich der übrigen Werte sind im Anhang in Tabelle 23 aufgelistet.



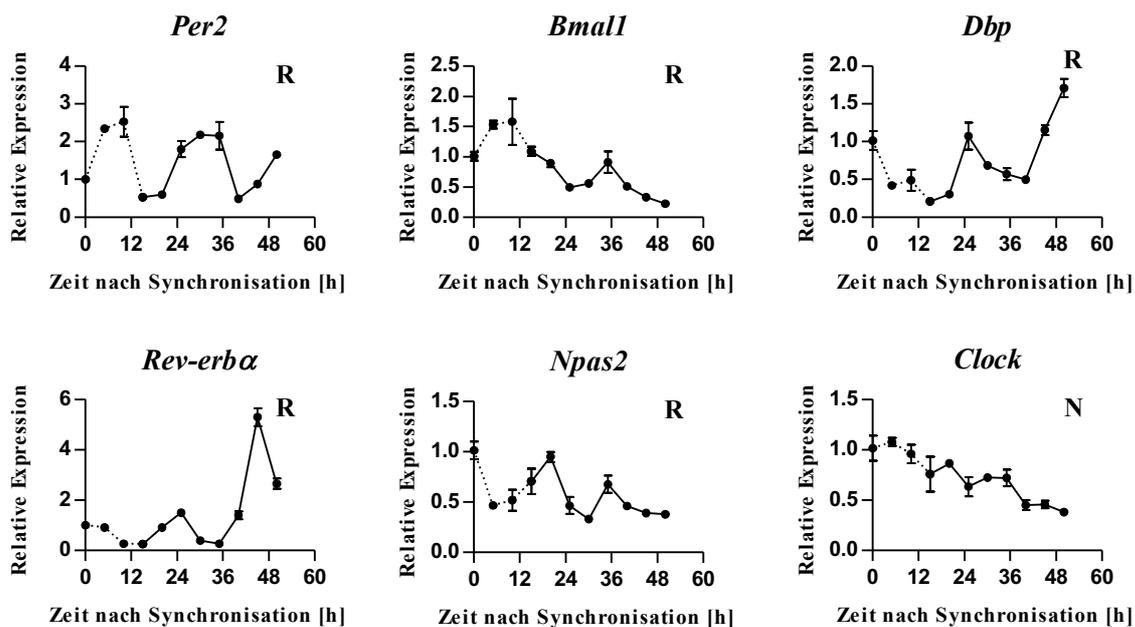
**Abbildung 11 : Uhrengenenexpression in reifen Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe**

Relative mRNA-Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* über 55 h nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen ist *eEF1a*; normalisiert wurde auf ZP0 von pIWAT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3 pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ ); N – nicht zirkadian rhythmisch ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3.3 Uhrengenenexpression in immortalisierten Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe (pEWAT)

Die Daten des hier besprochenen Experimentes wurden bereits für den Vergleich von synchronisierten (Dexa) und unsynchronisierten Prä-Adipozyten (Kontrolle) in Abschnitt 3.2.1 gezeigt. Zur Vereinfachung und genaueren Betrachtung sind die Daten in Abbildung 12 ohne die Expressionsdaten der Kontrolle erneut dargestellt.

Es ergab sich eine signifikante zirkadiane Rhythmik ( $p < 0,05$ ) für *Per2* ( $\tau = 25$  h,  $\Phi = 15$  h,  $A = 0,86$ ), *Bmal1* ( $\tau = 22$  h,  $\Phi = 0$  h,  $A = 0,32$ ), *Dbp* ( $\tau = 24$  h,  $\Phi = 12$  h,  $A = 0,51$ ), *Rev-erba* ( $\tau = 22$  h,  $\Phi = 8,5$  h,  $A = 2,2$ ) und *Npas2* ( $\tau = 20$  h,  $\Phi = 5$  h,  $A = 0,29$ ). *Clock* war nicht signifikant rhythmisch exprimiert ( $p > 0,05$ ). Die hohe Amplitude von *Rev-erba* ergab sich vor allem durch das 2. Maximum. Erneut zeigte sich eine antiphasische Expression von *Per2* und *Dbp* zu *Bmal1* und *Npas2*. *Rev-erba* zeigte wieder ein späteres Expressionsmaximum als *Bmal1* und *Npas2* und ein früheres als *Per2* und *Dbp*. Die p-Werte und eine Übersicht der übrigen Werte sind im Anhang in Tabelle 24 aufgelistet.

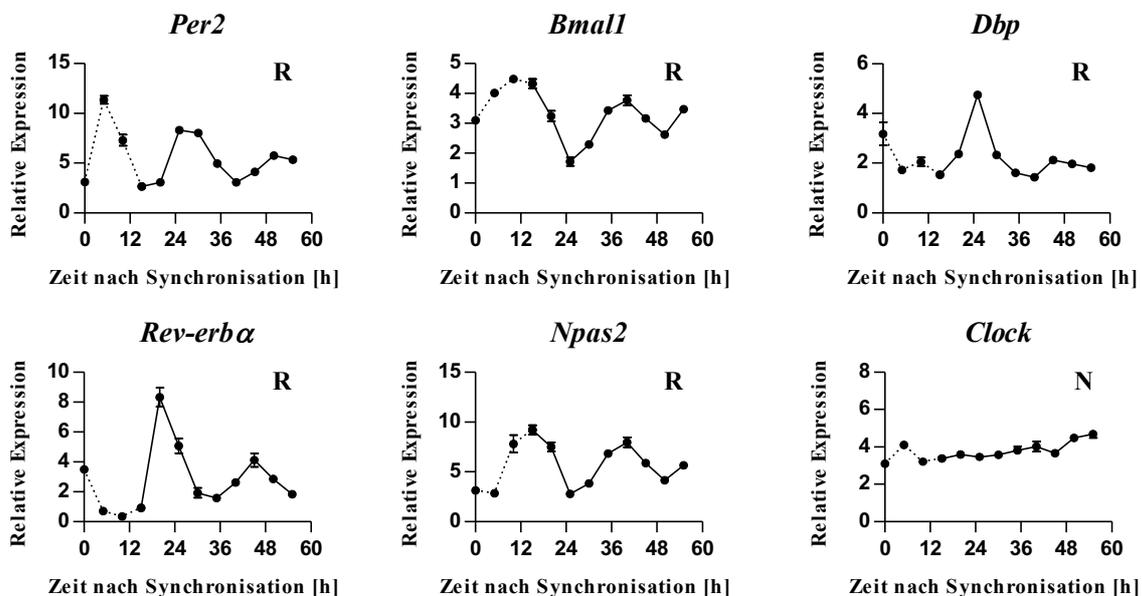


**Abbildung 12: Uhrengenenexpression in Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe**

Relative mRNA-Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* über 50 h nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen ist *eEF1 $\alpha$* ; normalisiert wurde auf ZP0. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ ); N – nicht zirkadian rhythmisch ( $p > 0,05$ ). Die Daten wurden bereits in Abbildung 8 A unter „Dexamethason“ dargestellt.

### 3.2.3.4 Uhrengenenexpression in immortalisierten reifen Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe (mEWAT)

Die relative mRNA-Expression der Uhrengene in EWAT zeigte eine signifikante zirkadiane Rhythmik (Abbildung 13, Tabelle 25 im Anhang) für *Per2* ( $\tau = 25$  h,  $\Phi = 15$  h,  $A = 2,68$ ), *Bmal1* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 0$  h,  $A = 1,26$ ), *Dbp* ( $\tau = 26$  h,  $\Phi = 10,5$  h,  $A = 1,79$ ), *Rev-erba* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 9$  h,  $A = 4,05$ ) und *Npas2* ( $\tau = 24$  h,  $\Phi = 0$  h,  $A = 2,97$ ). Auch hier ließ sich eine antiphasische Beziehung zwischen Genen des positiven (*Bmal1*, *Npas2*) und negativen (*Per2*, *Dbp*, *Rev-erba*) TTL-Armes feststellen. *Rev-erba* erreichte sein 1. Maximum dabei früher als *Per2* oder *Dbp*. Die höchste Amplitude zeigte sich bei *Rev-erba*. Im Gesamten zeigte sich eine höhere Amplitude als bei den immortalisierten Prä-Adipozyten aus epididymalen Fettgewebe (s. Abschnitt 3.2.3.3) und ein höheres Expressionsniveau. Die bei den inguinalen Adipozyten beobachtete „Rhythmisierung“ von *Clock* im Laufe der Differenzierung konnte hier nicht beobachtet werden vgl. Abschnitt 3.2.3.1 und 3.2.3.2).

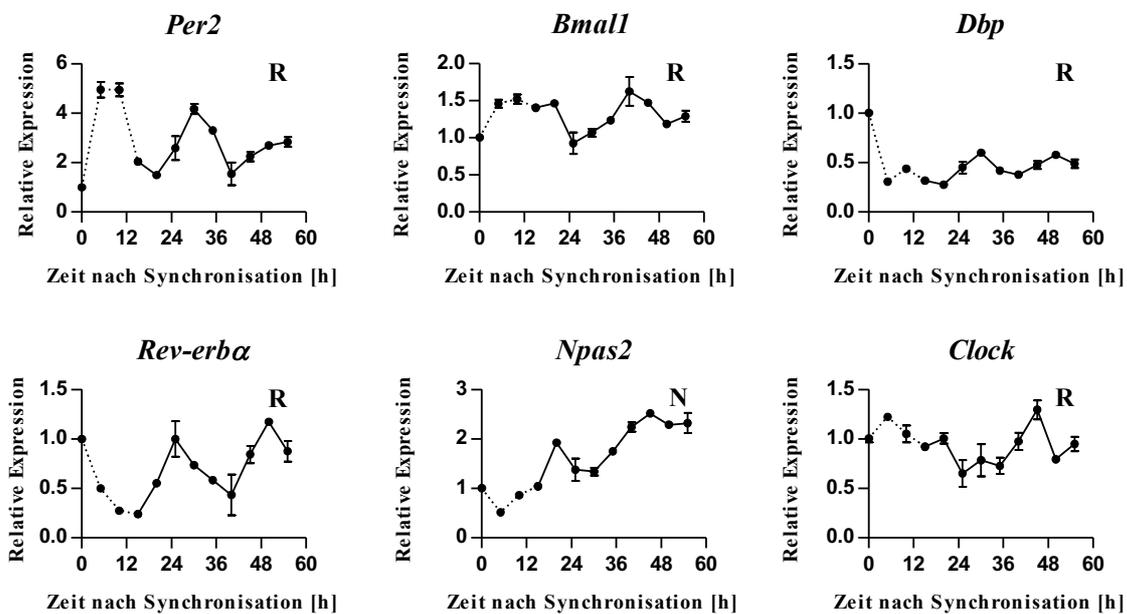


**Abbildung 13 : Uhrengenenexpression in reifen Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe**

Relative mRNA-Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* über 55 h nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen ist *eEF1a*; normalisiert wurde auf ZP0 von pEWAT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ ); N – nicht zirkadian rhythmisch ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3.5 Uhrengenenexpression in immortalisierten Prä-Adipozyten aus braunem Fettgewebe (pBAT)

Die relative mRNA-Expression in pBAT zeigte eine signifikant zirkadiane Expression ( $p < 0,05$ ) für *Per2* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 15,5$  h,  $A = 1,40$ ), *Bmal1* ( $\tau = 22$  h,  $\Phi = 3,5$  h,  $A = 0,30$ ), *Dbp* ( $\tau = 22$  h,  $\Phi = 14,5$  h,  $A = 0,16$ ), *Rev-erba* ( $\tau = 24$  h,  $\Phi = 12$  h,  $A = 0,37$ ) und *Clock* ( $\tau = 26$  h,  $\Phi = 3$  h,  $A = 0,28$ ). *Npas2* zeigte keine signifikante zirkadiane Rhythmik ( $p > 0,05$ , Abbildung 14, Tabelle 26 im Anhang). Es zeigte sich eine antiphasische Beziehung von *Per2*, *Dbp* und *Rev-erba* zu *Bmal1* und *Clock*. Die höchste Amplitude zeigte *Per2*.

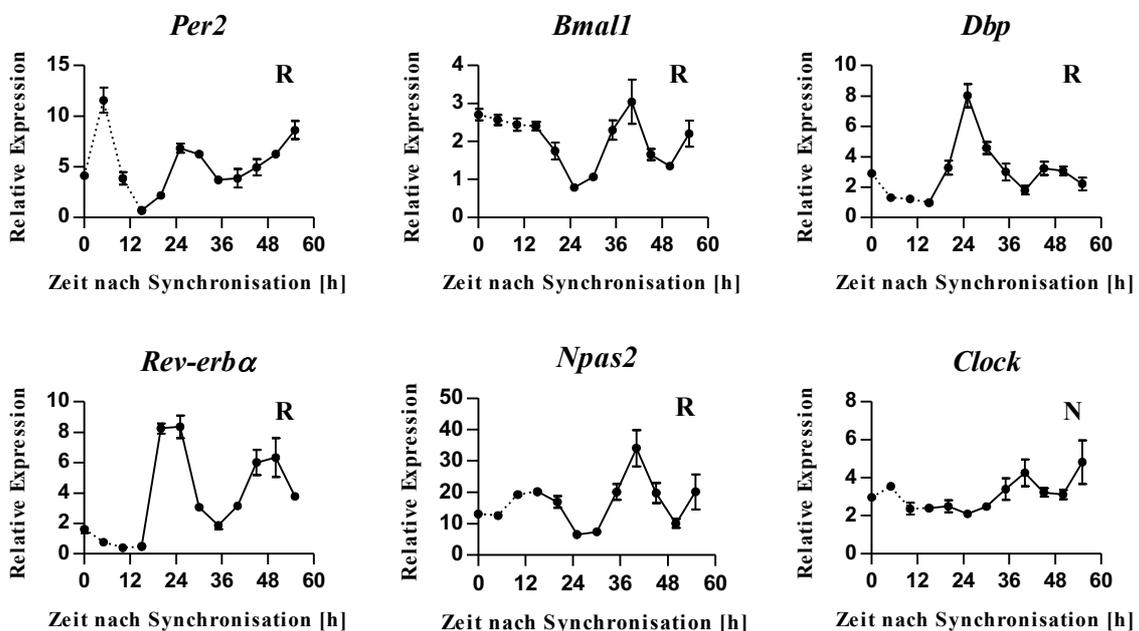


**Abbildung 14 : Uhrengenenexpression in Prä-Adipozyten aus braunem Fettgewebe**

Relative mRNA-Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* über 55 h nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen war *Eef1a*; normalisiert wurde auf ZP0. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ ); N – nicht zirkadian rhythmisch ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3.6 Uhrengenenexpression in immortalisierten reifen Adipozyten aus braunem Fettgewebe (mBAT)

Die relative mRNA-Expression in mBAT zeigte eine signifikante zirkadiane Rhythmik ( $p < 0,05$ , Abbildung 15, Tabelle 27 im Anhang) für *Per2* ( $\tau = 26$  h,  $\Phi = 13$  h,  $A = 2,72$ ), *Bmal1* ( $\tau = 23$  h,  $\Phi = 0$  h,  $A = 1,02$ ), *Dbp* ( $\tau = 22$  h,  $\Phi = 11$  h,  $A = 3,59$ ), *Rev-erba* ( $\tau = 26$  h,  $\Phi = 13$  h,  $A = 4,58$ ) und *Npas2* ( $\tau = 26$  h,  $\Phi = 23,5$  h,  $A = 13,37$ ). Im Gegensatz zu *Npas2* zeigte *Clock* in differenzierten Zellen keine signifikante zirkadiane Rhythmik. Die höchste Amplitude zeigte *Npas2*, wobei ähnlich wie bei mIWAT und mEWAT die Amplituden der rhythmisch exprimierten Gene nach der Differenzierung größer wurden und das Expressionsniveau insgesamt stieg (vgl. Abschnitt 3.2.3.2 und 3.2.3.4).



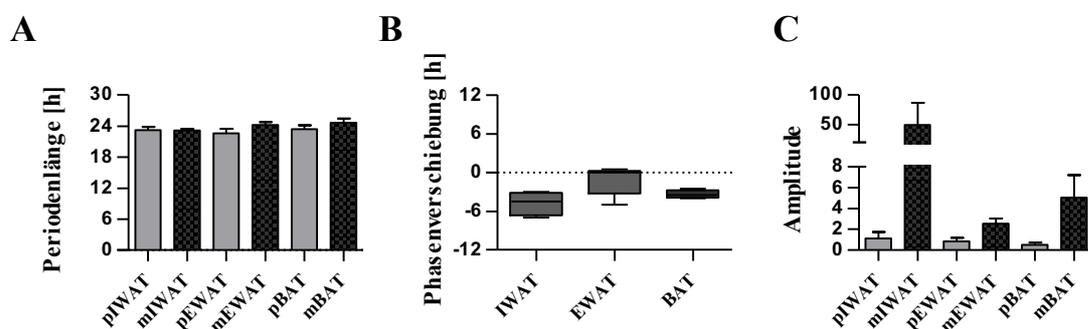
**Abbildung 15 : Uhrengenenexpression in reifen Adipozyten aus braunem Fettgewebe**

Relative mRNA-Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* über 55 h nach Synchronisation mit Dexamethason. Referenzgen ist *Eef1a*; normalisiert wurde auf ZP0 von pBAT. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ ); N – nicht zirkadian rhythmisch ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.4 Vergleich von Perioden, Phasen und Amplituden vor und nach der Adipozyten-Differenzierung

Nach der Analyse der Uhrengene auf zirkadiane Rhythmik und Festlegung von Periode, Phase und Amplitude wurden die Prä-Adipozyten mit den jeweiligen reifen Adipozyten desselben Gewebsursprungs verglichen, um eine Einsicht in die Entwicklung der molekularen Uhr während des Differenzierungsprozesses zu erhalten (Abbildung 16). Im direkten Vergleich zeigten IWAT-, EWAT- und BAT-Prä-Adipozyten und reife Adipozyten eine ähnliche durchschnittliche Periodenlängen der

rhythmischen Gene (Periodenlängen s. Abschnitt 3.2.3). Bei pIWAT zeigte sich eine durchschnittliche Periode von  $23,25 \text{ h} \pm 0,63 \text{ h}$ , bei mIWAT von  $23,17 \text{ h} \pm 0,31 \text{ h}$ , bei pEWAT von  $22,6 \text{ h} \pm 0,87 \text{ h}$ , bei mEWAT von  $24,20 \text{ h} \pm 0,58 \text{ h}$ , bei pBAT von  $23,40 \text{ h} \pm 0,75 \text{ h}$  und bei mBAT von  $24,6 \text{ h} \pm 0,87$  (Abbildung 16 A). Beim Betrachten der durchschnittlichen Phase der zirkadian rhythmisch exprimierten Gene ergab sich nach der Differenzierung eine Phasenverschiebung nach vorne (=  $\text{Phase}_{\text{Reife Adipozyten}} - \text{Phase}_{\text{Prä-Adipozyten}}$ ). Das bedeutet, dass die einzelnen Uhrengene in den reifen Adipozyten das erste Maximum früher erreichen als die Prä-Adipozyten (Phasen s. Abschnitt 3.2.3). Im Schnitt betrug diese Phasenverschiebung bei IWAT  $-4,75 \text{ h} \pm 0,92 \text{ h}$ , bei EWAT  $-1,2 \text{ h} \pm 1,01 \text{ h}$  und bei BAT  $-3,38 \text{ h} \pm 0,32 \text{ h}$  (Abbildung 16 B). Bei näherer Betrachtung der Amplituden der Uhrengene vor und nach der Differenzierung ergab sich eine Steigerung der durchschnittlichen Amplitude der rhythmisch exprimierten Gene in allen drei Zelllinien (Abbildung 16 C, Amplituden s. 3.2.3). Bei IWAT kam es zu einer durchschnittlichen Amplitudensteigerung um das 44-fache, für EWAT um das 3-fache und für BAT um das 10-fache. Für die statistische Auswertung dieses Anstiegs wurden die Amplituden wie in Abschnitt 2.7 beschrieben berechnet und analysiert. Aufgrund ihrer nicht eindeutig zirkadianen Rhythmik wurden *Npas2* und *Clock* hierbei nicht berücksichtigt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg in allen drei Zelllinien nach der Differenzierung ( $p < 0,001$ , nicht parametrische Varianzanalyse vom ANOVA-Typ, rankFD, R, s. Anhang Abbildung 23).



**Abbildung 16: Periode, Phase und Amplitude von Prä- und reifen Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT**

**A** Durchschnittliche Periode rhythmischer Gene (n = 4-6). Dargestellt als Mittelwert ± SEM.

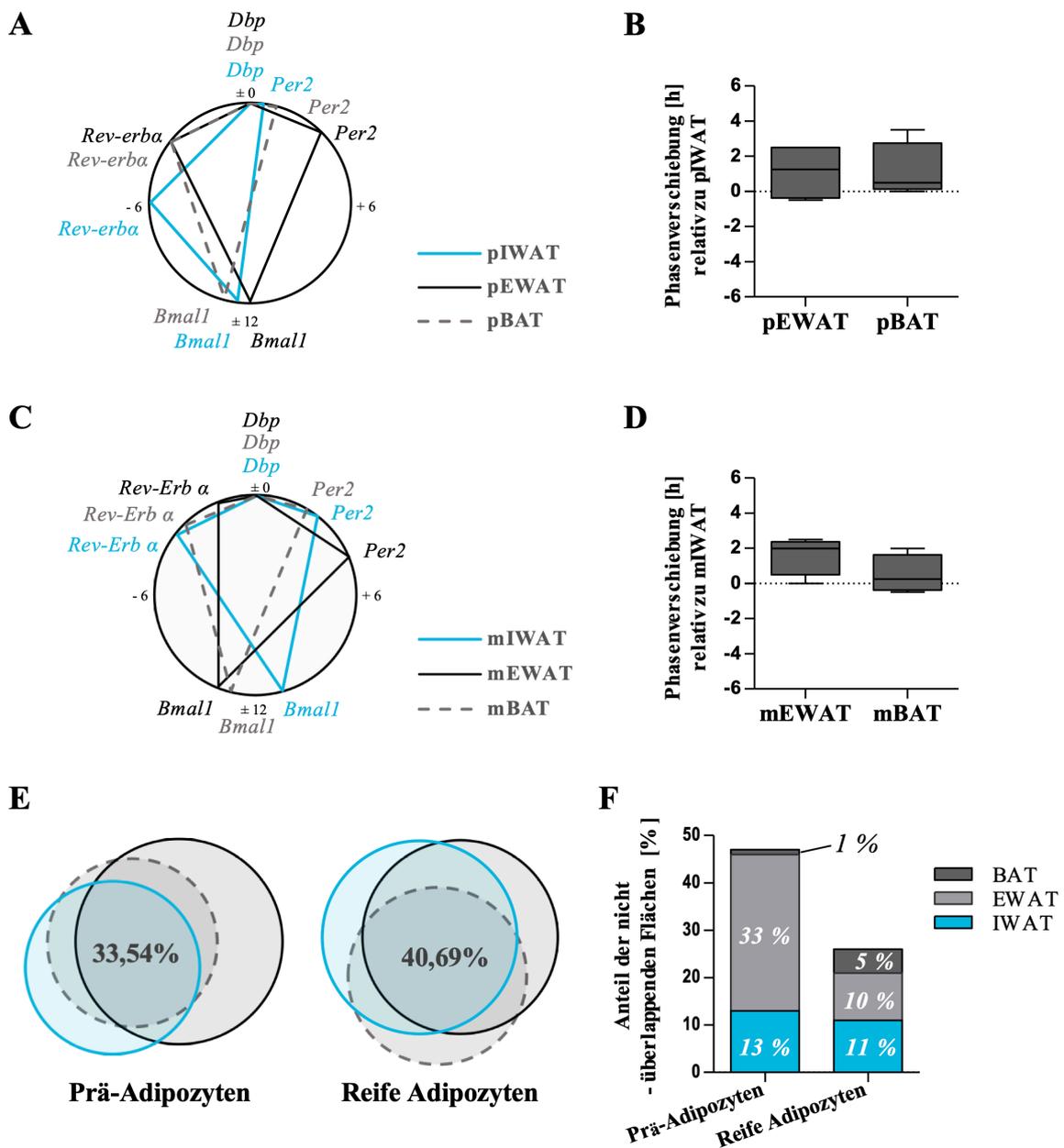
**B** Phasenverschiebung (=  $\text{Phase}_m - \text{Phase}_p$ ) rhythmischer Gene zwischen Prä-Adipozyten und reifen Adipozyten eines Ursprungs (n = 4-5). Dargestellt als Kastengraphik ± 5.-95. Perzentile.

**C** Durchschnittliche Amplitude aller zirkadian rhythmischen Gene (s.o.; n = 4-6) dargestellt als Mittelwert ± SEM.

### 3.2.5 Vergleich der endogenen Uhrenregulation vor und nach der Differenzierung

Im vorherigen Abschnitt (3.2.4) konnte gezeigt werden, dass es zu keinem bedeutenden Unterschied der Phasen vor und nach der Differenzierung kommt. Um die interne Uhrenregulation und das Verhalten der Uhrengene untereinander nach der Differenzierung zu analysieren, wurde die interne Phasenlage der einzelnen Uhrenrhythmen zueinander überprüft. Um diese beurteilen zu können, wurden die Phasen von *Per2*, *Bmal1* und *Rev-erba* zur Phase von *Dbp* ( $\text{Phase}_{\text{Dbp}} = \pm 0 \text{ h}$ ) als Referenzpunkt normalisiert (Abbildung 17 A und C). Da *Npas2* und *Clock* nicht durchgängig rhythmisch exprimiert waren, wurden sie bei dieser Analyse nicht berücksichtigt. In der Analyse der internen Phasenlage zeigte sich, dass *Per2* und *Dbp* im Vergleich zu *Bmal1* antiphasisch exprimiert wurden. Außerdem erreichte *Rev-Erba* ein paar Stunden nach *Bmal1*, aber vor *Dbp* und *Per2* sein Expressionsmaximum. Diese Beziehungen waren in IWAT, EWAT und BAT vor und nach der Differenzierung vergleichbar. Die Phasenlagen in den Prä-Adipozyten (Abbildung 17 A) als auch in den reifen Adipozyten (Abbildung 17 C) verhielten sich ebenfalls ähnlich.

Um die Phasenlagenverschiebung der verschiedenen Zelllinien untereinander zu vergleichen, wurden die Phasen von pEWAT und pBAT zu pIWAT (Abbildung 17 B) und die von mEWAT und mBAT zu mIWAT (Abbildung 17 D) normalisiert (Differenz zwischen den zu *Dbp* normalisierte Phasen<sub>EWAT/BAT</sub> und der zu *Dbp* normalisierte Phasen<sub>IWAT</sub>). Die Phasenverschiebung der Prä-Adipozyten relativ zu pIWAT betrug im Durchschnitt  $1,1 \text{ h} \pm 0,8 \text{ h}$  (pEWAT und pBAT). Die Phasenverschiebung der reifen Adipozyten relativ zu mIWAT betrug im Durchschnitt  $1,6 \text{ h} \pm 0,6 \text{ h}$  (mEWAT) und  $0,5 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$  (mBAT). Das bedeutet, dass die Gene in EWAT und BAT tendenziell etwas später als in IWAT ihr erstes Expressionsmaximum erreichten. Um zu ermitteln, wie ähnlich sich die Phasenlage und damit der molekulare Ablauf der Uhr in den Prä-Adipozyten und den reifen Adipozyten verhält, wurde der Anteil der gemeinsamen Fläche an der Gesamtfläche der Phasenlagen aus Abbildung 17 A und C ermittelt (Abbildung 17 E). Es zeigte sich eine Überlappung von 33,5 % für die Prä-Adipozyten und von 41,0 % für die reifen Adipozyten. Der Anteil der Veränderung (i.e. die „nicht überlappende Fläche“) sank von 47 % vor der Differenzierung auf 26 % nach der Differenzierung (Abbildung 17 F), wobei vor allem ein großer nicht-gemeinsamer Anteil durch pEWAT (33 %) zur Divergenz der gesamten Phasenlage der Prä-Adipozyten beitrug. Im Gesamten zeigt sich eine vergleichbare interne Phasenlage zwischen den einzelnen Geweben, sowohl vor, als auch nach der Differenzierung, wobei sich eine geringere Divergenz der einzelnen Phasenlagen in den reifen Adipozyten zeigte.



**Abbildung 17: Interne Phasenlage in Prä- und reifen Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT**

**A/C** Interne Phasenlage in Prä- (A) und reifen Adipozyten (C). Die Phasen von *Per2*, *Bmal1*, und *Rev-Erba* wurden zu *Dbp* normalisiert, dargestellt als Netzdiagramm in einem Bereich  $\pm 12$  Stunden (*Dbp* = 0 h).

**B/D** Verschiebung der internen Phasenlage von *Per2*, *Bmal1*, *Rev-Erba* und *Dbp* relativ zu pIWAT (B) und mIWAT (D) dargestellt als Kastengraphik  $\pm 5$ .- 95. Perzentile.

**E** Prozentualer Anteil der gemeinsamen Phasenlage an der Gesamtfläche aller drei Phasenlagen aus jeweils A (Prä-Adipozyten) und C (reife Adipozyten) dargestellt als Venn-Diagramm. Die Farbkodierung entspricht der in A.

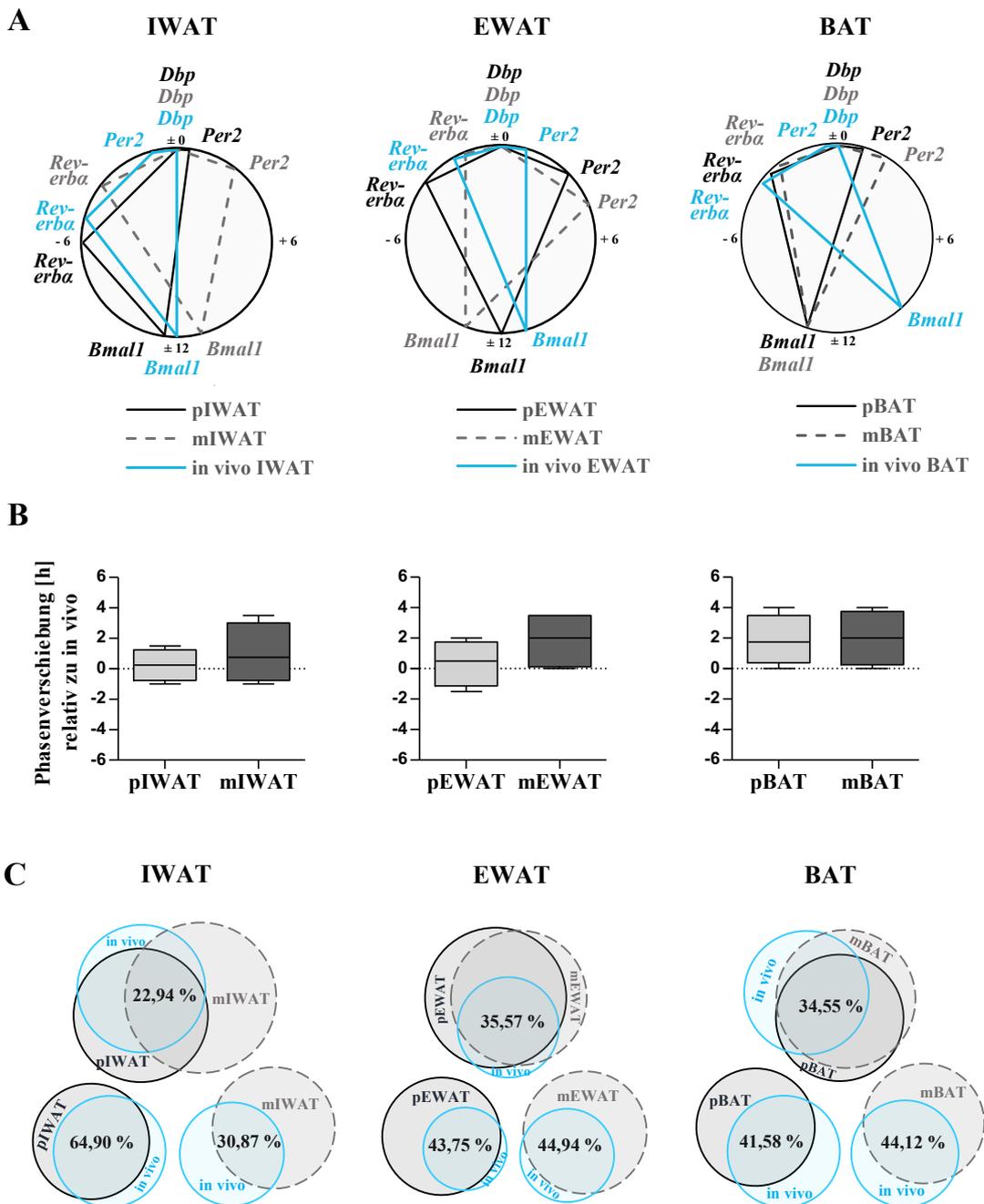
**F** Prozentualer Anteil der in A und C nicht überlappenden Phasenlagenanteile von IWAT, EWAT und BAT dargestellt als Balkendiagramm [%].

### 3.2.6 Vergleich der endogenen Uhrenregulation von IWAT, EWAT und BAT *in vivo* und *in vitro*

Nachdem die interne Phasenlage in den immortalisierten Adipozyten verglichen wurde, wurde nun untersucht, wie sich die Phasenlage zu der *In-vivo*-Situation verhält. Dazu wurden die *In-vivo*-Daten von Zvonic *et al.* als Vergleich herangezogen (369). Zvonic *et al.* isolierten Fettgewebeproben von murinem inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe im Zeitprofil und untersuchten die Uhrenexpression. Für den Vergleich wurden die *In-vivo*-Phasen von *Per2*, *Bmall* und *Rev-erba* zu der Phase von *Dbp* normalisiert ( $\text{Phase}_{\text{Dbp}} = \pm 0 \text{ h}$ ) und in ein Netzdiagramm eingefügt (Abbildung 18 A). Hier zeigte sich, dass sich die Phasenlagen von *Per2*, *Bmall* und *Rev-Erba* in den immortalisierten Adipozyten nur um wenige Stunden (0,5 - 4 h) von der *In-vivo*-Situation unterschieden. Bei den inguinalen Prä-Adipozyten zeigte *Rev-erba* ein früheres Maximum *in vitro* als *in vivo*, während die restliche Gene ihr Expressionsmaximum später erreichten. In mIWAT zeigte *Bmall* eine frühere Phase als *in vivo*, während *Per2* und *Rev-erba* eine spätere Phase aufwiesen. Bei den epididymalen Prä-Adipozyten kam es bei *Per2* und *Bmall* zu einem früheren Expressionsmaximum *in vivo*. *Rev-erba in vivo* zeigte sein Maximum 1,5 h später als in pEWAT. Die in den reifen epididymalen Adipozyten (mEWAT) gemessenen Uhrengene zeigten allgemein eine spätere Phase als *in vivo*. Auch beim braunen Fettgewebe *in vitro* zeigte sich, dass das Expressionsmaximum von *Per2*, *Bmall* und *Rev-erba* später als *in vivo* auftrat.

Um eine quantitative Einschätzung zu erhalten, wie sich die gesamte Phasenlage der Adipozyten-Uhr in Relation zur *In-vivo*-Situation verändert, wurden die für Abbildung 18 A berechneten Phasen von *Per2*, *Dbp*, *Bmall* und *Rev-erba* zur Phase der Gene *in vivo* normalisiert (Differenz zwischen  $\text{Phase}_{\text{in vivo}}$  und  $\text{Phase}_{\text{in vitro}}$ ) (Abbildung 18 B). Für pIWAT zeigte sich eine Gesamtphasenverschiebung von  $+ 1 \text{ h} \pm 0,98 \text{ h}$  (Abbildung 18 B IWAT). Bei mIWAT betrug die Gesamtphasenverschiebung  $+ 0,25 \text{ h} \pm 0,52 \text{ h}$ , bei pEWAT  $+ 0,38 \text{ h} \pm 0,8 \text{ h}$  und bei mEWAT  $+ 1,88 \text{ h} \pm 0,9 \text{ h}$  (Abbildung 18 C EWAT). Bei pBAT betrug die Gesamtphasenverschiebung  $+ 1,88 \text{ h} \pm 0,83 \text{ h}$  und bei mBAT  $+ 2 \text{ h} \pm 0,91 \text{ h}$  (Abbildung 18 B BAT).

Als Maß für die Konvergenz der Uhrenregulation *in vitro* und *in vivo* wurde wie in Abschnitt 3.2.5 der gemeinsame Flächenanteil anteilig an der Gesamtfläche aller drei Phasenlagen bestimmt. Der Anteil an gemeinsamer Phasenlage betrug bei IWAT 22,94 %, bei EWAT 35,57 % und bei BAT 34,55 % (Abbildung 18 C). Für eine genauere Analyse bzgl. der jeweiligen Konvergenz von Prä- Adipozyten und reifen Adipozyten zur *In-vivo*-Situation wurde außerdem die gemeinsame Phasenlage zwischen Prä- und reifen Adipozyten einzeln verglichen. Die Berechnung des prozentualen Anteils erfolgte hier als gemeinsamer Anteil an der Gesamtfläche. Die größte gemeinsame Phasenlage mit der *In-vivo*-Situation hatte hierbei pIWAT (64,90 %), gefolgt von mEWAT (44,94 %) und mBAT (44,12 %). mIWAT überschneidet sich mit 30,87 %, pEWAT mit 43,75 % und pBAT mit 41,58 % im Vergleich zur *In-vivo*-Expression (Abbildung 18 C). Insgesamt zeigte sich, dass die Uhrenphase der immortalisierten Adipozyten derer *in vivo* ähnlich war und tendenziell ein späteres Expressionsmaximum zeigten, wobei eine Phasenlagen-Konvergenz von bis zu 64 % erreicht wurde.



**Abbildung 18: Uhrenregulation in vitro und in vivo**

**A** Phasenlage von *Per2*, *Bmal1* und *Rev-erba* normalisiert zu *Dbp* in IWAT, EWAT und BAT in vivo (Daten von Zvonic et al., 2006 (369)) und in vitro (immortalisierte Prä- und reifen Adipozyten).

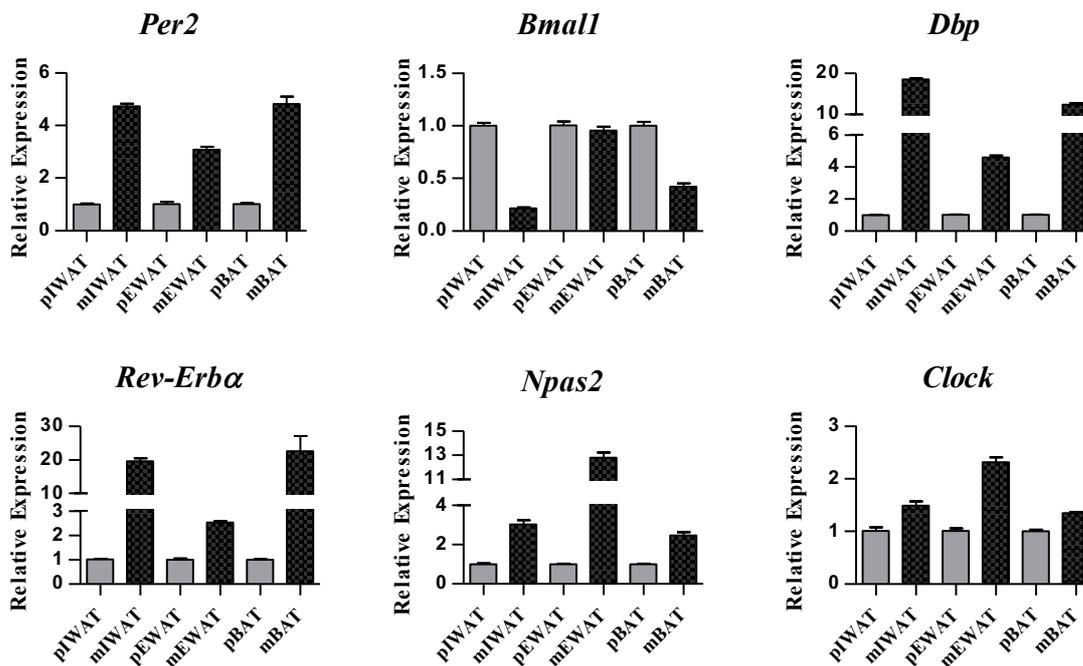
**B** Verschiebung der IWAT-, EWAT- und BAT-Uhr-Phasenlage von *Per2*, *Bmal1*, *Rev-erba* und *Dbp* in Relation zu ihrer In-vivo-Expression dargestellt als Kastengraphik (Definition s. Abschnitt 2.7).

**C** Venn-Diagramme der prozentualen Anteile der gemeinsamen Phasenlage in vivo, in Prä- und reifen Adipozyten an der jeweiligen Gesamtflächenphasenlage aus A. Die Prozentzahl bezieht sich jeweils auf die dargestellten Teilflächen.

### 3.3 Expressionshöhe der Uhrengene in immortalisierten Prä- und reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Während der Adipozyten-Differenzierung kommt es zu einer Expressionssteigerung in für den Zellstoffwechsel relevanten Genen (zusammengefasst in (216)). Um zu untersuchen, ob dies – unabhängig von ihrer Rhythmik - auch für die Uhrengene zutrifft, wurde die relative Expression von *Per2*, *Bmall*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* in nicht synchronisierten Prä-Adipozyten und Adipozyten gemessen und analysiert.

Es zeigte sich eine Expressionssteigerung aller gemessenen Gene mit Ausnahme von *Bmall* (Abbildung 19). Bei *Per2* stieg die Expression in differenziertem IWAT durchschnittlich um das 4,7-fache, in EWAT um das 3,1-fache und in BAT um das 4,8-fache. *Dbp* stieg in IWAT durchschnittlich um das 18,5-fache, in EWAT um das 4,6-fache und in BAT um das 12,4-fache. *Rev-erba* steigerte seine durchschnittliche Expression in IWAT um das 19,6-fache, in EWAT um das 2,5-fache und in BAT um das 22,6-fache. *Npas2* steigerte die durchschnittliche Expression in IWAT um das 3,0-fache, in EWAT um das 12,8-fache und in BAT um das 2,5-fache. *Clock* zeigte eine Expressionssteigerung in IWAT um das 1,5-fache, in EWAT um das 2,3-fache und in BAT um das 1,3-fache. *Bmall* zeigte eine Expressionsminderung um 78,4 % des Ausgangsniveaus in IWAT, um 4,7 % in EWAT und um 57,9 % in BAT (Abbildung 19). Zur Bestimmung der Gesamtänderung der gemessenen Uhrengene eines Gewebeursprungs nach der Differenzierung wurden die Expressionsdaten aus Abbildung 19 zusammengefasst und eine nicht-parametrische Varianzanalyse nach dem ANOVA-Typ mittels dem nparLD Paket in R durchgeführt. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Uhrengenexpression vor und nach der Differenzierung in allen drei Zelllinien (IWAT  $p = 0,008$ , EWAT  $p = 0,003$ , BAT  $p = 0,029$ , s. Abbildung 24 im Anhang).



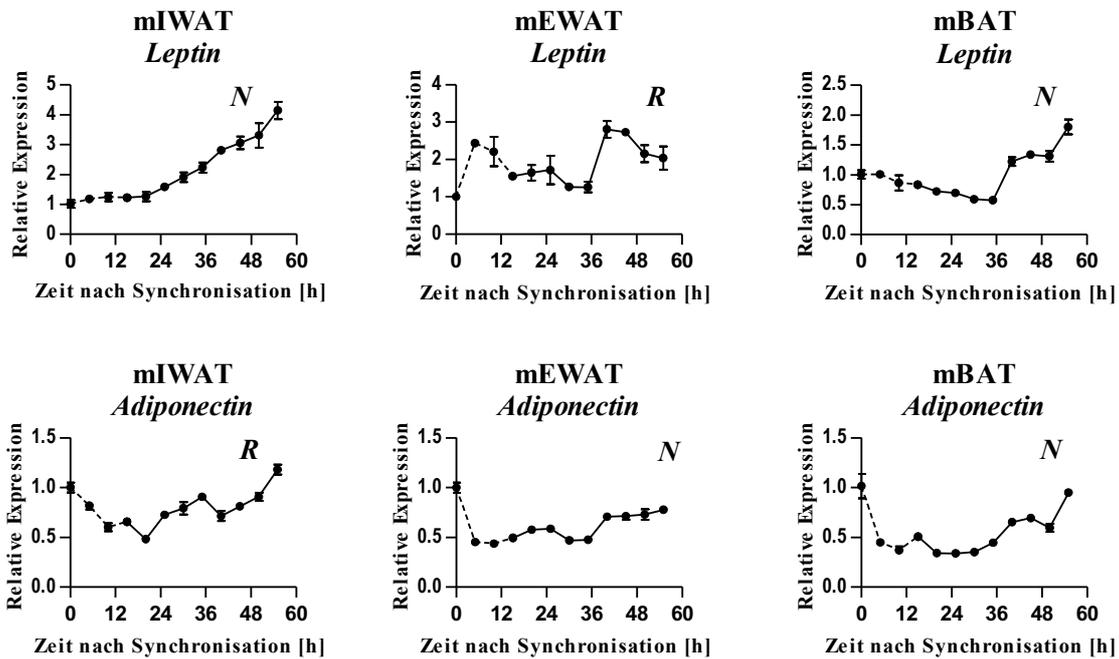
**Abbildung 19: Relative mRNA-Expression der Uhrengene in unsynchronisierten Prä- und reifen Adipozyten**

Relative mRNA Expression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* in nicht synchronisiertem IWAT-, EWAT- und BAT-Zellen vor (Prä-Adipozyten) und nach der Differenzierung (EWAT Tag 5, IWAT und BAT Tag 6) normalisiert zu den Prä-Adipozyten. Referenzgen ist Eef1 $\alpha$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3.

### 3.4 Zeitprofil der mRNA-Expression der Adipokine Leptin und Adiponectin in immortalisierten, reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Von den Adipokinen Leptin und Adiponectin ist bekannt, dass ihre Konzentration im Blut eine tagesabhängige Varianz aufzeigt (82, 98, 309, 327). Über die zirkadiane Expression gibt es unterschiedliche Ergebnisse (7, 235, 309, 327).

Deshalb wurde die relative Expression von *Lep*- und *Adipoq*-mRNA in den immortalisierten reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe über 55 Stunden gemessen und anschließend auf zirkadiane Rhythmik, Periode und Phase untersucht (Abbildung 20, s. Anhang Tabelle 28). Es zeigte sich eine signifikante zirkadiane Expression von *Lep* in mEWAT ( $\tau = 26$  h,  $\phi = 3$  h), nicht jedoch in mIWAT und mBAT (IWAT p = 0,20, BAT p = 0,31). Für *Adipoq* zeigte sich eine signifikant zirkadiane Expression in IWAT ( $\tau = 24$  h,  $\phi = 16,5$  h), nicht jedoch in mEWAT (p = 0,083) oder mBAT (p = 0,68). Eine Tabelle mit den vollständigen Analyseergebnissen befindet sich im Anhang (Tabelle 28).



**Abbildung 20: Relative mRNA-Expression von Leptin (*Lep*) und Adiponectin (*Adipoq*) im Zeitprofil über 55 Stunden**

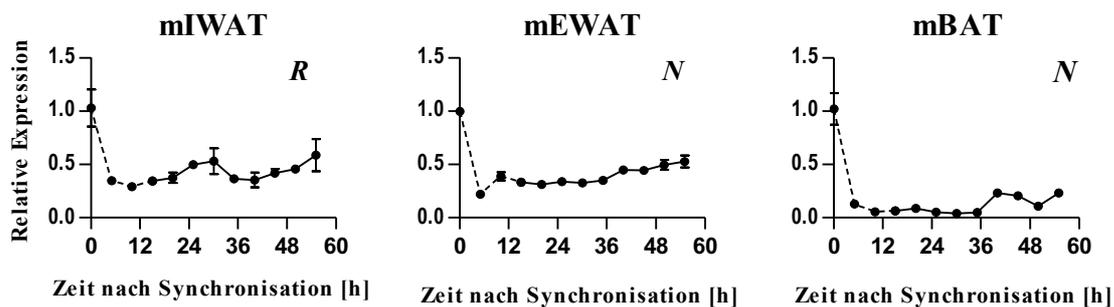
Relative mRNA-Expression von *Lep* und *Adipoq* über 55 h nach Synchronisation mit Dexamethason in immortalisierten reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe. Referenzgen ist *Eef1a*; normalisiert wurde auf ZP0. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3 pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch (p < 0,05); N – nicht zirkadian rhythmisch (p > 0,05).

### 3.5 Zeitprofil von *Ucp1* in immortalisierten, reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Es gibt nicht nur Hinweise, dass die Körpertemperatur Tageszeit abhängige Schwankungen zeigt, sondern auch das Protein UCP1 *in vivo* zirkadian exprimiert ist (101, 193).

Um das Verhalten der *Ucp1*-mRNA-Expression in den immortalisierten Adipozyten zu untersuchen, wurde die relative *Ucp1*-Expression im Zeitprofil für 55 Stunden in reifen Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT gemessen und wie in den Abschnitten zuvor analysiert (Abbildung 21). Dabei ergab sich eine signifikante zirkadiane Expression für *Ucp1* in mIWAT ( $\tau = 24$  h,  $\phi = 11$  h, nicht aber in mBAT (p = 0,15) und mEWAT (p = 1). Eine vollständige Auflistung der Analyse findet sich im Anhang in Tabelle 28.

Alle drei Zeitprofile zeigten einen Abfall der relativen *Ucp1*-Expression innerhalb der ersten 5 Stunden nach Behandlung mit Dexamethason mit anhaltend niedrigen *Ucp1*-Expressionsleveln über 55 Stunden. Bei mIWAT zeigte sich ein signifikanter durchschnittlicher Abfall der relativen Expression von  $1,0 \pm 0,17$  (ZP 0) auf  $0,42 \pm 0,02$  ( $\bar{\text{O}}$  ZP 5-55) ( $p = 0,007$ , Mann-Whitney Test). Bei EWAT zeigte sich dieser Abfall von  $0,99 \pm 0,29$  (TP0) auf  $0,38 \pm 0,02$  ( $\bar{\text{O}}$  ZP 5-55) als ebenfalls signifikant ( $p = 0,005$ , Mann-Whitney Test). Bei BAT fiel die relative Expression signifikant von  $1,02 \pm 0,15$  (ZP 0) auf  $0,11 \pm 0,01$  ( $\bar{\text{O}}$  ZP 5-55) ab ( $p = 0,005$ , Mann-Whitney Test).



**Abbildung 21: Relative *Ucp1*-Expression im Zeitprofil über 55 Stunden**

Relative mRNA-Expression von *Ucp1* über 55 h nach Synchronisation mit Dexamethason in immortalisierten, reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe. Referenzgen *eEF1 $\alpha$* , normalisiert zu ZP 0. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  pro ZP. Analyse auf zirkadiane Rhythmik ab 15 Stunden nach Synchronisation (durchgezogene Linie) mit JTK\_Cycle; R – signifikant zirkadian rhythmisch ( $p < 0,05$ ); N – nicht zirkadian rhythmisch ( $p > 0,05$ ).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Ergebnisse im Überblick

Ziel dieser Dissertation war es, mithilfe des SV40 T-Antigens immortalisierte Adipozyten aus verschiedenen Fettgewebsdepots der Maus auf zirkadiane Rhythmen hin zu untersuchen und deren Eignung als Zellmodell im Bereich der Chronophysiologie zu überprüfen. Die ersten Versuche mit *Per-2*-Luciferase-Lumineszenzmessungen an immortalisierten Prä-Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe gaben Hinweise auf endogene zirkadiane Uhrenrhythmen (Abschnitt 3.2.2). qPCR-Analysen im Zeitprofil für die Uhrengene *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* vor und nach erfolgreicher Differenzierung konnten diese bestätigen, auch wenn nicht alle getesteten Gene signifikant rhythmisch oszillierten (Abschnitt 3.2.3). Im Vergleich zur *In-vivo*-Situation zeigten sich einige Abweichungen, wobei im Großen und Ganzen dennoch eine vergleichbare Regulation der inneren Uhr von murinen Fettzellen *in vitro* festzustellen war. Nach der Analyse der Uhrengene wurde die mRNA-Expression von *Leptin*, *Adipoq* und *Ucp1* in reifen Adipozyten aller drei Zelllinien analysiert. Dabei zeigten sich zirkadiane Rhythmen bei *Leptin* in mEWAT und *Adipoq* in mIWAT.

### 4.2 Differenzierung der immortalisierten Prä-Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

SV40 T-Antigen interagiert unter anderem mit Tumorsuppressor p53 und der Retinoblastom-Protein-Familie (pRB, p130, p107) und führt so während der Zellteilung zu einem Übertritt der Zelle aus der G1- in die S-Phase (zusammengefasst in (4)). Eine Überexpression von SV40 T führt zu einer Immortalisierung von Zellen, wobei p53 und Retinoblastom-Protein (pRB) auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Adipozyten spielen ((56, 213), vgl. (118)). So ist seit längerem bekannt, dass die Immortalisierung mit SV40 T-Antigen zu einer Beeinträchtigung der Adipozytendifferenzierung in WAT-Adipozyten *in vitro* führen kann (47, 48, 137). Trotzdem wurden mit SV40 T immortalisierte Adipozyten schon mehrfach erfolgreich für Versuche an Prä- und reifen Adipozyten genutzt (83, 171–173, 184, 244, 336). Auch in den Versuchen für diese Arbeit konnte eine deutliche TG-Akkumulation, ein Zeichen der Adipozytenreife, festgestellt werden (Abschnitt 3.1.1). Reife Adipozyten aller drei Depotarten zeigten hauptsächlich eine – für weiße Adipozyten untypische (216, 229, 333) multivakuoläre Morphologie (Abbildung 6). Für braune Fettzellen ist diese Morphologie wiederum charakteristisch (41, 183, 273, 275). Sowohl von diesen mit SV40 T-Antigen immortalisierten Adipozyten als auch aus Versuchen mit der bekannten Fettzelllinie 3T3-L1 ist jedoch bereits bekannt, dass „weiße“ Fettzellen *in vitro* ebenfalls mehrere Fetttropfen pro Zelle ausbilden können (16, 110, 167, 235, 239, 244, 298, 336). Green und Kehinde konnten zeigen, dass 3T3-L1-Adipozyten erst nach längerem Differenzieren univakuolär werden (111). Die Differenzierungsdauer in den hier durchgeführten Versuchen betrug – wie bereits in Vorversuchen der Arbeitsgruppe von Prof. Klein

(83, 171–173, 244, 336) – nicht länger als acht Tage, sodass dies ein Grund dafür sein könnte, warum eine Fusion der Vakuolen hier nicht erfolgte. Auf molekularer Ebene wurde der Differenzierungserfolg anhand der Expression von *aP2* und *Pref-1* analysiert. Als Marker reifer Adipozyten kam es im Verlauf der Differenzierung zu einem Anstieg der *aP2*-Expression in allen drei Zelllinien (Abbildung 7). Verschiedene Forschungsgruppen entdeckten bereits in den 1980er Jahren, dass die *aP2*-Expression auch *in vitro* während der Adipozytendifferenzierung von 3T3-L1- (59, 73, 142, 306), humanen Stammzellen (6, 276) sowie in immortalisierten braunen Adipozyten (207) hochreguliert wird.

1993 und später ermittelten Smas *et al.* in 3T3-L1-Adipozyten PREF-1 als anti-adipogenen Faktor, welcher die Differenzierung hemmt und dessen Expression im Laufe der Differenzierung abnimmt (299, 300). 2012 konnte die Bedeutung und Abnahme von PREF-1 während der Differenzierung ebenfalls in murinen braunen Primäradipozyten nachgewiesen werden (11). Auch in den hier verwendeten immortalisierten Adipozyten sank die *Pref-1*-mRNA-Expression während des Differenzierungsprozesses in allen drei Linien (Abbildung 7).

Leptin ist ein bekanntes Adipokinin, dessen Plasma-Spiegel *in vivo* proportional zum Körperfettanteil steigt (90, 228). Es dient deshalb als Marker für die Menge weißen Fettgewebes (55). Ein Anstieg der *Leptin*-Expression zeigte sich auch in den differenzierenden Adipozyten aus IWAT und EWAT (Abbildung 7). Überraschend zeigte sich aber auch in den immortalisierten braunen Adipozyten ein Anstieg der *Leptin*-Expression (Abbildung 7). In der Literatur finden sich kontroverse Ergebnisse zur Expression und Sekretion von Leptin in braunem Fettgewebe (88, 121, 202, 208, 212, 318). Aus diesem Grund haben Cinti *et al.* immunhistochemische Färbungen von LEPTIN-Peptid in braunem Fettgewebe von Mäusen durchgeführt (55). Dabei haben die Autoren festgestellt, dass in klassischen braunen Adipozyten (multivakuolär, UCP1-positiv) kein LEPTIN nachgewiesen werden konnte. Allerdings fanden sie am Rande des braunen Fettstücks Leptin-positive, UCP1-negative, univakuoläre Adipozyten. Sie schlussfolgerten, dass einer der Gründe für nachgewiesenes Leptin in braunem Fettgewebe *in vivo* evtl. auf diese morphologisch eher weißen Adipozyten an den Dissektionsrändern zurückzuführen sein könnte. Demzufolge wäre eine *Leptin*-Expression in den immortalisierten braunen Adipozyten entgegen der Erwartungen. Andere *In-vitro*-Studien mit braunen Adipozyten konnten jedoch ebenfalls eine *Leptin*-Expression in reifen Adipozyten zeigen (40, 114). Bei Buyse *et al.* wurde diese besonders durch Insulin und T<sub>3</sub> im Zellkulturmedium gefördert (40). Da das Differenzierungsmedium der hier verwendeten immortalisierten Adipozyten ebenfalls Insulin und T<sub>3</sub> enthielt, könnte dies – zusammen mit einem unspezifischen Effekt der Immortalisierungsmethode – eine mögliche Erklärung für die *Leptin*-Expression der Fettzellen aus braunem Fettgewebe sein. Unter ähnlichen Kulturbedingungen zeigten SV40 T-immortalisierte Adipozyten aus braunem Fettgewebe einer anderen Mauslinie eine zunehmende *Leptin*-Sekretion, die wiederum auf eine ebenfalls vorhandene *Leptin*-Expression hinweist (184), sodass dies trotz der BAT-Abstammung für SV40 T-immortalisierte Adipozyten nicht ungewöhnlich erscheint.

Aufgrund der Unterschiede der einzelnen Fettdépoten ist es interessant, experimentell zwischen braunen und weißen Adipozyten unterscheiden zu können. Einer der typischen Marker für diese Unterscheidung ist der

Protonenkanal UCP1 (Abschnitt 1.1.5). Interessanterweise kam es während der Differenzierung zu einem *Ucp1*-mRNA-Anstieg, wie erwartet, in den braunen aber auch den weißen Adipozytenlinien (Abbildung 7, Tabelle 20). Das *Ucp1* auch in mIWAT und mEWAT nachgewiesen werden konnte, wirft Fragen bezüglich der Depot-Spezifität auf. Auch wenn UCP1 exprimierende (*brite*) Adipozyten in weißem Fettgewebe bekannt sind und sich aus weißen Adipozyten entwickeln können (22, 52, 149, 220, 248, 268, 293, 349), findet sich in der Literatur ebenfalls ein Zusammenhang zur SV40 T-Immortalisierung. Ross *et al.* konnten 1992 feststellen, dass es bei Mäusen, an deren *aP2*-Promotor das SV40 T-Antigen gekoppelt wurde, zu einer gesteigerten Expression von *Ucp1*-mRNA und vermehrter brauner Morphologie der Fettzellen in inguinalem Fettgewebe kommt (269). Hansen *et al.* konnten 2004 zeigen, dass SV40 T-Antigen in 3T3-L1- und 3T3-F442A-Zellen (eine WAT-Zelllinie) zu einer gesteigerten *Ucp1*-Expression führt (122). Der Mechanismus dahinter scheint sowohl p53- als auch pRb-abhängig zu sein. Dali-Youcef *et al.* konnten zeigen, dass in pRB-defizienten Mäusen (*pRb* *-/-*) sowohl *Ucp1*, als auch dessen Transkriptions-Coaktivator *Pgc1 $\alpha$*  in WAT und BAT *in vivo* im Vergleich vermehrt exprimiert werden und die Tiere gleichzeitig durch einen erhöhten Energieverbrauch vor der Körpergewichtszunahme durch hochkalorische Nahrung geschützt sind (65). Ähnlich wie bei pRb-defizienten Mäusen verhält es sich auch bei p53-negativen Mäusen (*p53* *-/-*) (119). Hallenborg *et al.* zeigten, dass das Fehlen von p53 in primären IWAT- und BAT-Adipozyten zu einer gesteigerten *Ucp1*-Expression führt (119). Dieser Effekt wird über *PGC1 $\alpha$*  vermittelt. Im Normalfall unterdrückt p53 die *PGC1 $\alpha$* -vermittelte Transkription von *Ucp1*. Fehlt nun p53, fördert *PGC1 $\alpha$*  die Expression von *Ucp1* nicht nur in BAT, sondern eben auch in WAT. In derselben Veröffentlichung konnten Hallenborg *et al.* ebenfalls eine gesteigerte *Ucp1*-Expression durch SV40 T-Antigen in reifen Adipozyten aus mesenchymalen Stammzellen zeigen (119). So führte das SV40 T-Antigen vermutlich auch in den für diese Arbeit verwendeten Adipozyten zu einer erhöhten *Ucp1*-Expression. Wichtig zu betonen ist hierbei, dass die *Ucp1*-Expressionen in SV40 T-positiven WAT-Adipozyten, anders als bei klassischen beigen Adipozyten, auch ohne spezielle Stimulation, wie zum Beispiel Kälte, auftritt (65, 119, 122, 194, 269). Ebenso interessant ist, dass die nicht durch SV40 T-Antigen immortalisierten 3T3-L1-Adipozyten unter normalen Bedingungen nicht oder nur sehr wenig *Ucp1* exprimieren (219, 292).

Alles in allem, zeigten alle drei Zelllinien eine gute Triglycerid-Anreicherung, einen adäquaten *aP2*-Anstieg und *Pref-1*-Abfall und damit trotz Immortalisierung eine gute Differenzierung. Wichtig dabei ist, dass das SV40 T-Antigen an unterschiedlichen Stellen in die Differenzierung und die Funktion der Adipozyten eingreift und damit eine eindeutige Depot-Zuordnung schwierig macht (vgl. Abschnitt 4.6).

### 4.3 Zirkadiane Rhythmen immortalisierter Prä- und reifer Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

#### 4.3.1 Synchronisation endogener Rhythmen durch Dexamethason

Während *in vivo* die Synchronisation der Körperuhren durch übergeordnete Taktgeber geschieht (24, 67, 253, 355), wird diese Funktion *in vitro* durch Dexamethason oder auch einem Serum-Schock übernommen (20, 221). Dies ist notwendig, da die Zelluhren *in vitro* nicht synchron ticken, bzw. aufgrund individuell unterschiedlicher Periodenlängen rasch desynchronisieren. Diese Desynchronisation konnten Nagoshi *et al.* 2004 an NIH-3T3-Fibroblasten zeigen (221). Gleichzeitig testeten sie Dexamethason zur Synchronisation *in vitro* und fanden heraus, dass das künstliche Glukokortikoid einen starken Synchronisationsstimulus darstellt und fähig ist, Zellen unterschiedlicher Phasen zu einen. Bereits im Jahr 2000 untersuchten Balsalobre *et al.* die Wirkung von Dexamethason auf Ratten-Fibroblasten und konnten nach der Behandlung für einige Tage eine robuste zirkadiane Expression verschiedener Uhrengene feststellen (19). Durch *In-vivo*-Versuche mit systemisch appliziertem Dexamethason konnten sie zeigen, dass periphere Uhren auch *in vivo* durch Dexamethason beeinflusst werden. Wie bereits in Versuchen mit nicht differenzierten 3T3-L1-Adipozyten (28) führte die Synchronisation mit Dexamethason also nicht überraschend, als Zeichen einer besseren Synchronisation, zu einer Amplitudensteigerung der Uhrengenenexpression in immortalisierten Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe (Abschnitt 3.2.1). Die bereits vor der Synchronisation vorhandene rhythmische Oszillation von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-Erba* entsteht dabei wahrscheinlich durch den durchgeführten Mediumwechsel zu Beginn des Zeitprofils (28). Außerdem befanden sich im Medium 20 % Serum (FBS), welches in Form eines Serum-Schocks (30-50 %) zur Synchronisation eingesetzt wird (20, 235, 291, 350). Auch wenn *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-Erba* bereits vor der Synchronisation mit Dexamethason rhythmisch oszillierten, traf dies nicht auf *Npas2* zu (Abschnitt 3.2.1). Über die zirkadiane Expression des CLOCK-Homologs NPAS2 in Adipozyten gibt es unterschiedliche Ergebnisse (209, 309, 350, 369). In den Versuchen von So *et al.* 2009 führte eine Synchronisation mit Dexamethason ebenfalls zu einer zirkadian rhythmischen Expression von *Npas2* in murinen mesenchymalen Stammzellen (302). Gleichzeitig kam es auch zu einer Expressionssteigerung, die in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden konnte. Neben einer Steigerung der Amplitude kam es in den Versuchen von Barnea *et al.* durch die Synchronisation mit Dexamethason zusätzlich zu einer Phasenverschiebung nach hinten. Dieser Effekt konnte hier ebenfalls beobachtet werden (Abschnitt 3.2.1). Inzwischen ist bekannt, dass Dexamethason direkt über den Glukokortikoidrezeptor (GR) die Expression von *Per1/2* fördert (46, 302). Dieser Effekt ist phasenabhängig (104), und BMAL1 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, da der GR nicht ohne gleichzeitige Bindung von BMAL1 an den Promotor binden kann (46). Barnea *et al.* stellen die Theorie auf, dass die höhere Amplitude von Uhrengenen des negativen Arms (z.B. *Per2*) zu einer verlängerten Hemmung von BMAL1:CLOCK veranlasst, die Rückkopplungsschleife dadurch verzögert wird und es so zur Phasenverschiebung kommt. Der Effekt der Phasenverzögerung von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden (19, 104). Da zumindest in den

aktuellen Daten die Periodenlänge nicht signifikant verändert wurde (Abschnitt 3.2.1), scheint die Phasenverschiebung keinen nachhaltigen Effekt auf den Ablauf der molekularen Uhr zu haben. Um Akuteffekte durch die Synchronisation bei der Analyse der Daten auszuschließen, wurden die ersten 15 Stunden aller Zeitprofile von der genaueren zirkadianen Analyse ausgeschlossen.

#### 4.3.2 Kontinuierliche Aufzeichnung zirkadianer Rhythmen in Prä-Adipozyten

Für eine kontinuierliche Aufzeichnung von endogenen Rhythmen in Zellen und Gewebekulturen eignen sich Lumineszenzmessungen (128, 182, 197, 201, 291, 341, 361). Luciferasen oxidieren Luciferine, und als Beiprodukt dieser Reaktion kommt es zur Lichtemission (Lumineszenz) (227, 310). Wird die Luciferase unter der Kontrolle eines Uhrengenpromotors exprimiert, spiegelt die gemessene Lumineszenz die Menge an abgelesenem Uhrengen dar. Dabei ist zu beachten, dass es unter anderem zu Unterschieden in der posttranskriptionellen und posttranslationalen Verarbeitung der Luciferase im Gegensatz zum Original-Uhrengen oder -protein kommen kann und daher keine Eins-zu-Eins-Übertragung der Luciferase-Aktivität auf den Proteingehalt möglich ist. Zusätzlich ist bei der Transduktion mit Lentiviren zu bedenken, dass es zu einem zufälligen Einbau des Promotor-Luciferase-cDNA-Konstrukts in das Zell-Genom kommt. So kann es sein, dass sich aufgrund der Sekundär- oder Tertiärstrukturen am Ort der Insertionsstelle die Transkriptionsdynamik anders verhält als bei dem zu messenden Uhrengen (341). Alles in allem bietet sich durch die Methode die Möglichkeit, zelluläre Uhrenmechanismen mit hoher zeitlicher Auflösung zu analysieren und die Beeinflussung durch Substanzen, Medikamente und andere Einflüsse zu untersuchen. 2005 schlugen Yamazaki und Takahashi deshalb bereits vor, mit dieser Technik und immortalisierten Zellen Wirkstoffstudien und Studien molekularer Mechanismen der inneren Uhr durchzuführen (356). Das Ziel dieser Arbeit war es zu schauen, ob sich SV40 T-immortalisierte Adipozyten für zirkadiane Studien eignen, weswegen versucht wurde, stabil transduzierte *Per2-Luc*-positive Prä-Adipozyten zu generieren, welche dann zu *Per2-Luc* positiven reifen Adipozyten ausdifferenziert werden können. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, eine stabile *Per2-Luc*-Transduktion zu erreichen, obwohl eine lentivirale Transduktion der Prä-Adipozyten aller drei Zelllinien generell möglich ist, wie die positiven eGFP-Ergebnisse zeigen (Abschnitt 3.2.2). In der kontinuierlichen Messung der *Per2-Luc*-Rhythmen mit dem Luminometer konnte aber wiederholt keine ausreichende Signalstärke erreicht werden (Abbildung 9 B, und weitere nicht gezeigte Versuche). Zum Nachweis, dass die durch mich durchgeführte Methode prinzipiell funktioniert, wurden NIH-3T3-Fibroblasten transduziert, welche eine gute Signalstärke und die erwartete Rhythmik zeigten (Abbildung 9 B). Die frische Transduktion ohne weitere Zellpassage konnte ebenfalls keine bessere Signalstärke in den Prä-Adipozyten erreichen (Daten nicht gezeigt). Auch der Wechsel zu einem anderen Vektor (*Bmal1-Luc*) brachte kein besseres Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Das es grundsätzlich möglich ist, bei Prä-Adipozyten *ex vivo* eine lentivirale Transduktion zu erreichen, konnten Dr. Julia Seemann im Rahmen ihrer Dissertation sowie weitere Gruppen an humanen Adipozyten, 3T3-L1-Adipozyten und mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe zeigen (42, 178, 286, 303). Eine lentivirale Transduktion bei den verwendeten immortalisierten Adipozyten wurde bis jetzt noch nicht versucht,

Transfektionen durch Elektroporation und Transduktionen durch Retroviren wurden allerdings durch die Gruppe um Prof. Klein bereits erfolgreich durchgeführt (83, 244). Sollte zukünftig Interesse an einer erneuten Transduktion von Uhrenreportern bestehen, könnten diese Methoden angewandt werden. Aufgrund der bereits bei den Prä-Adipozyten eher schlechten Signalstärke wurde auf eine Transduktion reifer Adipozyten verzichtet.

Um trotz schlechter Signalstärke eine Aussage über den Oszillationscharakter von PER2 zu bekommen, wurden die Daten versuchsweise mit JTK\_Cycle auf Rhythmisität hin untersucht und es ergab sich eine zirkadiane Rhythmik der *Per2-Luc*-Aktivität in allen drei Zelllinien (Abschnitt 3.2.2). Somit zeigte sich ein erster Hinweis auf eine funktionierende molekulare Uhr in SV40 T-immortalisierten Adipozyten. Shostak *et al.* konnten 2013 schon Lumineszenz-Rhythmen in epididymalem, peritonealem und subkutanem WAT von *PER2:LUCIFERASE* Reporter-mäusen nachweisen (291). Später folgte die genauere Untersuchung von Periode, Dämpfungsrate und Phase in IWAT, EWAT und BAT von *PER2:LUCIFERASE*-Reporter-mäusen (92). In Fettgewebestücken betrug die Periode ungefähr 26 Stunden und in Prä- und reifen Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe ca. 24 Stunden. Seemann konnte zusätzlich 2017 in ihrer Arbeit *Bmal1-Luc*-Rhythmen in Prä- und reifen Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe nachweisen (92, 286). Da die Validität und Aussagekraft aufgrund der geringen Signalstärke und Anzahl an verfügbaren Vektoren zur Erforschung der inneren Uhr *in vitro* mit diesem Ansatz eingeschränkt war, wurde die Expression verschiedener Uhrgene in immortalisierten Prä- und reifen Adipozyten aus allen drei Fettgeweben im Zeitprofil untersucht.

### 4.3.3 Uhrengenenexpression in immortalisierten Prä- und reifen Adipozyten

Da die Transduktion von Luciferasereportern nicht wie gewünscht funktionierte, war es wichtig, für die Beurteilung der zirkadianen Eigenschaften der SV40 T-immortalisierten Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe Uhrengenenrhythmen mit einer anderen Methode zu bestimmen. Dafür wurden mRNA-Profile über 50 bis 55 Stunden in allen drei Fettzelllinien im Stadium vor und nach der Differenzierung erstellt, wobei die ersten drei Zeitpunkte (ZP 0, 5, 10) zum Ausklammern von Akuteffekten durch die Synchronisation nicht in die Analyse miteinbezogen wurden. Gemessen wurde jeweils der mRNA-Gehalt von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock*.

#### 4.3.3.1 Inguinales WAT

Prä- (pIWAT) und reife (mIWAT) Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe zeigten signifikante zirkadiane Rhythmen für *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-erba* (Abbildung 10, Abbildung 11). mIWAT zeigte zusätzlich noch zirkadiane Rhythmen für *Npas2* und *Clock* (Abbildung 11). Auch wenn *Clock* und *Npas2* als Teil des positiven Arms des TTL in den Prä-Adipozyten nicht rhythmisch exprimiert waren, zeigten dennoch *Bmal1* und die Gene des negativen Arms, *Per2* und *Rev-erba*, eine typische antiphasische Expression (Abbildung 10, Abbildung 11) (129, 231, 236, 282, 327). Diese antiphasische Expression gilt nicht nur für Fettgewebe. Oishi *et al.* konnten diese Beziehung bereits 1998 für den SCN, das Auge, das Herz, die Lunge und die

Nieren zeigen (231). Ebenso antiphasisch zu *Bmall* verlief auch die Expression von *Dbp* (Abbildung 10, Abbildung 11). Zvonic *et al.* konnten in ihren murinen *In-vivo*-IWAT-Daten ebenfalls diese antiphase Beziehung der Uhrengene darstellen (369). Zuerst in 3T3-L1-Adipozyten und anschließend im Menschen gelang dies ebenfalls Otway *et al.* 2009 und 2011 (235, 236). Während Otway *et al.* *Clock* und dessen Homolog *Npas2* nicht analysierten, zeigte *Clock* im Versuch von Zvonic *et al.* und den Versuchen von Seemann 2017 keine zirkadiane Expression (286, 369). Gomez-Abellan *et al.* und Loboda *et al.* wiederum konnten eine zirkadiane Expressionen von *Clock* in humanen subkutanen Fettproben *ex vivo* und *in vivo* zeigen (106, 199). Auch wenn das Fehlen von CLOCK oder seiner Funktion zu veränderten Rhythmen führt, scheint seine Oszillation für eine intakte innere Uhr nicht notwendig zu sein (70, 71, 262, 291). Für *Npas2* gibt es ebenfalls verschiedene Erkenntnisse. Zvonic *et al.* konnten eine zirkadiane Expression von *Npas2* in inguinalen Fettstücken *in vivo* feststellen, während *In-vitro*-Versuche mit humanen Stammzellen aus subkutanem Fettgewebe (ASCs) ohne Differenzierung keine signifikante *Npas2*-Rhythmik ergaben (350). Leider gibt es hierzu keine Daten aus differenzierten ASCs und auch insgesamt ist die Datenlage bezüglich der *Npas2*-Expression im inguinalen Fettgewebe unzureichend. Zusätzlich muss man sagen, dass bei der *Npas2*-Expression die Tendenz zur Signifikanz in den im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten aus pIWAT durchaus gegeben war ( $p = 0,06$ ). Dass es bei den Versuchen zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen ist, kann daran liegen, dass unterschiedliche Spezies und unterschiedliche Versuchsverfahren genutzt worden sind. Wichtig hierbei ist jedoch, dass das molekulare Uhrwerk im Gesamten seinen Ablauf behalten hat. Hierzu gehört die kanonische Abfolge in den Maxima der Uhrengene. Die Abfolge der Maxima von *Dbp*, *Per2*, *Bmall* und *Rev-erba*, die sich in dieser Reihenfolge bei Zvonic *et al.* zeigte, zeigte sich ebenfalls in den immortalisierten IWAT-Adipozyten (Abbildung 10, Abbildung 11) sowie in Versuchen anderer Arbeitsgruppen (92, 235, 327, 369). Dass die Abfolge der internen Uhrengenenexpression beibehalten wurde, ist ein starkes Zeichen dafür, dass das molekulare Uhrwerk der IWAT-Adipozyten durch die Immortalisierung nicht maßgeblich verändert wurde.

#### 4.3.3.2 Epididymales WAT

Die Analyse der mRNA-Rhythmen der immortalisierten Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe ergab ähnliche Ergebnisse (Abschnitt 3.2.3.3, Abschnitt 3.2.3.4). Erneut zeigte sich eine zirkadiane Expression von *Per2*, *Bmall*, *Dbp* und *Rev-erba* vor (pEWAT) und nach (mEWAT) der Differenzierung der Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe. Eine rhythmische Expression verschiedener Uhrengene in viszeralem Fettgewebe zeigte sich ebenfalls in den Versuchen von Zvonic *et al.* (369), Ando *et al.* (7), Sukumaran *et al.* (309), van der Spek *et al.* (327), Shostak *et al.* (291) sowie in Versuchen an humanem viszeralem Fettgewebe aus der Arbeitsgruppe Garaulet (97, 104, 107). Anders als in IWAT war *Npas2* in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen sowohl in pEWAT als auch mEWAT rhythmisch exprimiert. Als Teil des positiven Arms zeigte es die erwartete antiphase Expression gegenüber *Per2* und ein Expressionsmaximum kurz nach dem von *Bmall* (Abbildung 17) (250, 309). *Clock* wiederum war weder in den Prä- noch den reifen Adipozyten rhythmisch exprimiert (Abschnitt 3.2.3.3, Abschnitt 3.2.3.4). Ähnlich wie bei inguinalem Fettgewebe finden sich in der Literatur unterschiedliche

Angaben zur rhythmischen Expression von *Clock* in EWAT. In murinem EWAT konnte in zwei verschiedenen Studien keine rhythmische Expression *in vivo* festgestellt werden (286, 369), während Yang *et al.* 2006 eine rhythmische Expression von *Clock* in murinem EWAT *in vivo* zeigten (359). Ebenso fanden Gomez-Abellan *et al.* 2012 eine rhythmische, zu *Per2* antiphasische Oszillation in humanem EWAT (104). Unabhängig von *Clock* und *Npas2* zeigten *Per2*, *Bmall*, *Dbp* und *Rev-erba* erneut die gleiche zeitliche Abfolge in ihren Expressionsmaxima, die bereits in IWAT und der Literatur zu zirkadianen Rhythmen in viszeralem Fettgewebe zu finden sind (92, 309, 327, 369). Dies spricht dafür, dass auch in den immortalisierten Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe das zirkadiane Uhrwerk erhalten ist.

#### 4.3.3.3 BAT

Während die Datenlage zu zirkadianen Rhythmen in weißem Fettgewebe sowohl *in vivo*, *ex vivo* als auch *in vitro* schon sehr robust ist, sieht es bei braunem Fettgewebe etwas anders aus. *In vivo* haben verschiedene Arbeitsgruppen die Uhrengenenexpression in braunem Fettgewebe in Mäusen untersucht (196, 312, 313, 324, 359, 367, 369). Die ersten dabei waren Zvonic *et al.* (369) und Yang *et al.* (359) 2006. Zvonic *et al.* beschäftigten sich mit den Rhythmen von diversen Uhrengenen und deren Veränderung durch eine ausschließliche Nahrungsbereitstellung zur subjektiven Nacht in Mäusen, während Yang *et al.* sich für nukleäre Rezeptoren in verschiedenen Geweben (u.a. Rev-erbs, Glukokortikoidrezeptor, Schilddrüsenhormonrezeptor  $\alpha$ ) und deren Bedeutung als Bindeglied zwischen Stoffwechsel und zirkadianer Uhr interessierten. Beide konnten rhythmische Expressionen von *Per2*, *Bmall* und *Rev-erba* in braunem Fettgewebe zeigen. Während Zvonic *et al.* eine solche Rhythmik auch für *Npas2* und *Dbp* bestätigten (bei Yang *et al.* nicht bestimmt), zeigte *Clock* bei beiden keine signifikante Rhythmik. 2011 und 2012 konnten Takeda *et al.* diese Ergebnisse reproduzieren und zeigen, dass ROR $\gamma$  *in vivo* nicht nur *Npas2* reguliert, sondern auch zu einer Expressionssteigerung von *Per2*, *Rev-erba*, *Cry1* und *Bmall* in murinem BAT führt (312, 313). Li *et al.* untersuchten die Auswirkungen einer *Bmall*-Ablation in Mäusen und konnten so zeigen, dass eine funktionierende molekulare Uhr wichtig für die BAT-Funktion ist, aber keine Auswirkungen auf z.B. die Triglyzerid-Anreicherung zeigt (196). Unsere Arbeitsgruppe konnte später rhythmische Expressionen von *Rev-erba*, *Bmall*, *Dbp*, *Per2* und *Npas2*, ebenso wie PER2-Rhythmen mittels eines Luciferasereporters in BAT auch *ex vivo* zeigen (92). Lee *et al.* zeigten außerdem, dass auch in humanen braunen Fettpolstern *ex vivo* und braunen Primärzellkulturen zumindest *Rev-erba* zirkadian exprimiert wird (193). So ist es im Rahmen dieser Arbeit, nach aktuellem Wissensstand, zum ersten Mal gelungen, endogene zirkadiane Expressionsrhythmen mehrerer Uhrengene in braunem Fettgewebe *in vitro* darzustellen. Denn sowohl in den immortalisierten Prä- als auch reifen Adipozyten aus braunem Fettgewebe zeigten sich rhythmische Expressionen von *Per2*, *Bmall*, *Dbp* und *Rev-erba* (Abschnitt 3.2.3.5, Abschnitt 3.2.3.6). Während *Npas2* in den Prä-Adipozyten nicht rhythmisch exprimiert wurde, konnte nach der Differenzierung eine zirkadiane Expression gemessen werden. Die Tatsache, dass *Npas2* in BAT *in* und *ex vivo* in mehreren Studien rhythmisch exprimiert wurde (92, 312, 313, 369), in den immortalisierten Prä-Adipozyten jedoch nicht, könnte mit der Zusammensetzung des Fettgewebes zusammenhängen.

Fettgewebe setzt sich zu einem Großteil aus reifen Adipozyten und nur zu einem kleineren Teil aus Prä-Adipozyten zusammen, sodass die zirkadiane Expression von *Npas2* in den reifen Adipozyten *in vivo* die nicht rhythmische Expression in Prä-Adipozyten überdecken könnte. Hier könnten weitere *In-vitro*-Versuche dazu dienen, diese Theorie weiter zu untersuchen. Bei *Clock* verlief es in BAT genau andersherum. Während sich in den Prä-Adipozyten ein zirkadianer Rhythmus ermitteln ließ, war dies nach Differenzierung nicht mehr der Fall. Publierte Studien sind sich in dem Fall nicht einig: In AKR/J-Mäusen zeigt sich *Clock* im BAT nicht rhythmisch (369), während es in C57BL/6-Mäusen rhythmisch (196, 312) bzw. schwach rhythmisch (359) exprimiert wird. Dass *Clock* in mBAT nicht rhythmisch exprimiert wurde, könnte damit zusammenhängen, dass systemische Einflüsse fehlen und dadurch die rhythmische Expression verloren geht bzw. andere Einflüsse nach erfolgter Differenzierung Überhand nehmen und die zirkadiane Rhythmik unterdrücken.

#### 4.3.3.4 Vergleichbarkeit der zirkadianen Rhythmen zur *In-vivo*-Situation

Wichtig für die Beurteilung, ob sich das Zellmodell für weitere Studien, sowie für die Erforschung endogener Rhythmen *in vitro* eignet, ist neben der erhaltenen zirkadianen Oszillation die Betrachtung der Phasenlage der einzelnen Uhrengene zueinander. Hier zeigte sich, dass die Expressionsmaxima von *Per2* und *Bmal1* sowohl in Prä- als auch den reifen SV40 T-immortalisierten Adipozyten versetzt zueinander und *Dbp* und *Rev-erba* in Phase zu *Per2* waren, während *Clock* in den reifen Adipozyten und *Npas2* in den Prä-Adipozyten jeweils in Phase mit *Bmal1* verliefen (Abschnitt 3.2.6). Die gleiche Relation ist auch bei allen drei Fettgeweben *in vivo* zu sehen (196, 312, 324, 359, 369). Nach erweiterter Analyse zeigte sich, dass die immortalisierten Adipozyten aus allen drei Geweben ähnliche interne Phasenlagen aufwiesen (Abbildung 17) und es mit der aktuellen Datenlage keinen Hinweis auf einen signifikanten Unterschied der Adipozytenuhren der einzelnen Gewebe gibt. Für eine genauere Aussage wären weitere Experimente nötig. Auch wenn eine vergleichbare Analyse in der Literatur nicht zu finden ist, sieht man im Vergleich mehrerer Studien, dass die zeitliche Abfolge der Uhrengeneexpressionsmaxima nicht nur für die hier untersuchten immortalisierten Adipozyten gilt, sondern im Gesamten ein wiederkehrendes Muster in der endogenen Uhrenregulation darstellt. So findet sich diese Abfolge an Maximalexpressionen von *Rev-Erba*, *Dbp*, *Per2* und *Bmal1* ebenfalls in muriner Leber *in vivo* (369) sowie auch in Ratten-Fibroblasten (20). Im Vergleich zu den Daten von Zvonic *et al.* (369), welche die murine Leberuhr *in vivo* analysierten, zeigte die interne Phasenlage der jeweiligen immortalisierten Adipozyten aller drei Fettgewebe die gleiche Abfolge der Gene: *Rev-Erba*, *Dbp*, *Per2* und *Bmal1*. Dass sich eine Differenz zwischen den exakten internen Phasenverhältnissen *in vivo* und den hier verwendeten immortalisierten Adipozyten zeigte (Abbildung 18), kann unterschiedliche Ursachen haben. Einer davon ist der Wegfall von systemischen Einflüssen wie dem Licht-Dunkelrhythmus oder der Nahrung. Kornmann *et al.* zeigten zum Beispiel, dass die rhythmische Expression von *Per2* *in vivo* auch dann fortgeführt wird, wenn die Leberuhr selbst nicht funktioniert, während *in vitro* die *Per2*-Oszillation ohne funktionierende Leberuhr nicht erhalten bleibt (182). Weitere Gründe für die Verschiebung der internen Phasenlage könnten in der Versuchsmethode selbst zu finden sein. Sowohl Glukokortikoide als auch die Immortalisierung greifen, wie bereits weiter oben erläutert, tief

in den intrazellulären Ablauf der Uhr ein. Eine Beeinflussung der Uhrendynamik kann daher nicht ausgeschlossen werden. So werden die Mäuse bei Zvonic *et al.* *in vivo* durch Licht und nicht durch eine einzelne Substanz synchronisiert und der zelluläre Ablauf nicht durch SV40 T-Antigen gestört (369).

#### **4.4 Einfluss der Differenzierung auf Uhrengenenexpression und zirkadiane Rhythmik in immortalisierten Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe**

Die Adipogenese verändert nicht nur die Adipozyten in Morphologie und Funktion, sondern könnte auch die innere Uhr beeinflussen - inwiefern ist aktuell noch Gegenstand der Forschung. Direkte Vergleiche von Amplitude, Phasenlage und Expressionshöhe vor und nach der Differenzierung gibt es bisher kaum. Während Otway *et al.* an mit einem Serumpuls synchronisierten 3T3-L1-Adipozyten eine Abnahme der Amplitude von *Per2* und *Dbp* nach der Differenzierung zeigten (235), konnten Barnea *et al.* an mit Dexamethason synchronisierten Adipozyten einen Anstieg der Amplitude nachweisen (28). Phasenlage und Expressionshöhe der Uhrengene im Laufe der Differenzierung waren hier jeweils nicht Bestandteil der Analyse. In den hier verwendeten SV40 T-immortalisierten Adipozyten zeigte sich nach der Differenzierung wie bei Barnea *et al.* ein Anstieg der Amplitude von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-Erb $\alpha$*  in allen drei Zellreihen (Abbildung 16 C). Außerdem zeigte sich eine verminderte Divergenz der einzelnen Phasenlagen der Uhrengene nach Differenzierung (Abbildung 17). Park *et al.* konnten 2017 zeigen, dass nach der Differenzierung vermehrt Glukokortikoidrezeptoren auf 3T3-L1- und immortalisierten BAT-Adipozyten exprimiert werden (239). Sollte dies bei den hier verwendeten Linien ebenfalls der Fall sein, könnte das zur Synchronisation genutzte Glukokortikoid durch eine verstärkte *Per2*-Induktion (46) zu einer effizienteren Synchronisation und damit einer verstärkten Amplitude nach der Differenzierung beitragen. Die verminderte Divergenz der Phasenlagen nach der Differenzierung könnte Zeichen dieser insgesamt verbesserten Synchronisation sein (Abbildung 13). Weiterhin konnten Nagoshi *et al.* an Fibroblasten, die in die G0-Phase übergetreten waren, zeigen, dass diese besser auf Dexamethason-Synchronisation ansprechen (221). Da auch die hier verwendeten ausdifferenzierten Adipozyten in die G0-Phase eingetreten waren, könnte dies eine weitere Erklärung für die höhere Amplitude darstellen. Unabhängig von diesen indirekten Effekten durch Dexamethason zeigte sich in der Analyse der Uhrengene vor und nach Differenzierung, ohne vorherige Synchronisation mit Dexamethason eine deutliche Zunahme der Expression von *Per2*, *Dbp*, *Rev-Erb $\alpha$*  und *Npas2* aller drei Fettzelllinien (Abbildung 19, Abbildung 24). Bereits 1993 konnten Chawla und Lazar zeigen, dass die *Rev-Erb $\alpha$* -Expression im Rahmen der Differenzierung von 3T3-L1- und 3T3-F442A-Zellen ansteigt (45). Dies könnte bedeuten, dass mit zunehmender metabolischer Aktivität der Fettzelle auch die Expression der Uhrengene angepasst wird und somit eine höhere Amplitude durch verstärkte Expression der beteiligten Gene entsteht.

Die Differenzierung hatte nicht nur Einfluss auf die Amplitude, sondern auch auf die Phasenlage der Uhrengenenexpression. So zeigte sich in den reifen Adipozyten eine geringe Phasenverschiebung nach vorne

(Abbildung 16 B). Ein Dexamethason-Effekt sollte das Gegenteil bewirken (s.o.), sodass ein Einfluss der Synchronisationsmethode hier nicht die entscheidende Erklärung darstellt. In der Literatur finden sich bisher keine vergleichbaren Experimente. Ursache für eine frühere Phase könnte ein schnellerer Abbau der Uhrenproteine des negativen Armes (z.B. PER2, PER1, CRY1, etc.) nach der Differenzierung sein. Eine weitere Ursache könnte die verstärkte Expression von *Bmal1* oder *Clock* sein. Allerdings war *Bmal1* weniger stark und *Clock* lediglich ca. 2-fach höher exprimiert als in den Prä-Adipozyten. Ebenso zeigten beide eine geringere Amplitudensteigerung als *Per2*, *Dbp*, *Rev-Erba* und *Npas2* (Abbildung 19, Abbildung 24). Daher soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass dem Zellkulturmedium der reifen Adipozyten, nicht der Prä-Adipozyten, Thyroxin und Insulin zum Zwecke der Differenzierung zugesetzt war und somit ein Einfluss auf die Expressionsstärke, Phase sowie Amplitude der Uhrengene nicht ausgeschlossen werden kann. Hardman *et al.* beispielsweise zeigten an menschlichen Haarfollikeln, dass die *BMAL1*- und *PER1*-Expression nach Exposition mit 100 nM Thyroxin (wie in dieser Arbeit verwendet) deutlich reduziert wurde und die Amplitude abnahm (125). Andererseits zeigten sich in der Analyse des Einflusses von Insulin gegenteilige Effekte. Sato *et al.* zeigten 2014 an WAT, dass Insulin eine anhaltende Phasenverschiebung nach hinten und nicht wie hier eine Phasenverschiebung nach vorne auslöst (277). Dang *et al.* postulieren anhand von Mäuseleberdaten, dass Insulin zu einer geringeren Aktivität von *Bmal1* führt (68) welches ebenfalls daher keine Erklärung für die Phasenverschiebung nach vorne darstellt. Bereits zwei Arbeiten konnten zeigen, dass eine phasenabhängige Stimulation von Hepatozyten und Adipozyten mit Insulin eine Phasenverschiebung nach vorne oder hinten auslösen kann (320, 354). Dabei zeigte sich, dass eine Insulinstimulation zu ZP 0 eine frühere Phasenlage auslöst, wobei eine Stimulation zu ZP 12 eine Verzögerung zur Folge hat. Tuvia *et al.* zeigten, dass sich dieser Effekt durch eine direkte Stimulation der *Per1* und *Per2* Expression ergibt (320). Die Insulinstimulation führte bei Tuvia *et al.* allerdings auch zu einer *REV-ERBA*-Abnahme, sodass die hier gesehene Expressionssteigerung evtl. doch eher mit der Differenzierung zusammenhängen könnte und die gefundenen Veränderungen evtl. doch eine Folge der Differenzierung darstellen.

Für eine insgesamt sehr robuste innere Uhr in Fettzellen vor und nach der Differenzierung spricht die Tatsache, dass die Periodenlänge in allen rhythmischen Genen vor und nach der Differenzierung keinen relevanten Unterschied zeigte (Abbildung 16 A).

Summa summarum konnten Unterschiede des zirkadianen Systems im Laufe der Differenzierung gezeigt werden, wobei die dahinterliegenden Mechanismen noch zu untersuchen sind.

## 4.5 Einfluss der endogenen Uhr auf die Adipokin- und Ucp1-mRNA-Expression in immortalisierten reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Es ist bekannt, dass das weiße Fettgewebe an metabolischen Tagesrhythmen wie dem der Adipokine Leptin und Adiponectin im Blut mitbeteiligt ist (240, 291, 324). Ebenso spielt das braune Fettgewebe eine Rolle in der tageszeitlichen Schwankung der Körpertemperatur (324).

### 4.5.1 Leptin und Adiponectin

Nicht nur Stoffwechselprodukte wie Fettsäuren (291) zeigen zirkadiane Konzentrations-Schwankungen im Blut, sondern auch Hormone des Fettstoffwechsels. Leptin erreicht im Blut bei Menschen und Nagern seinen Nadir während der subjektiven Nacht und zeigt die höchsten Werte am subjektiven Tag bzw. kurz nach Beginn der subjektiven Nacht (2, 32, 327, 369, 97, 98, 133, 136, 154, 204, 287, 295). Kalsbeek *et al.* konnten 2001 bereits zeigen, dass ohne einen funktionierenden SCN dieser Rhythmus nicht nur im Blut, sondern auch auf transkriptioneller Ebene in Ratten-EWAT aufgehoben ist (154). Bezüglich eines zirkadianen Rhythmus‘ von *Leptin* im Fettgewebe finden sich *in vivo* unterschiedliche Aussagen (7, 97, 309, 327). *Ex-vivo*-Studien gibt es hierzu bisher nur beim Menschen. Hier zeigte sich Leptin in subkutanem und viszeralem Fettgewebe rhythmisch exprimiert (97). Eine Studie mit 3T3-L1-Adipozyten von Otway *et al.* zeigte keine rhythmische *Leptin*-Expression (235). Vergleichende Studien in unterschiedlichen murinen Fettgeweben waren vor Beginn dieser Arbeit noch ausstehend. Van der Spek *et al.* konnten an Ratten eine rhythmische Expression in subkutanem Fettgewebe zeigen (327). Interessant ist daher, dass sich in den hier verwendeten Adipozyten keine rhythmische Expression von *Leptin* in mIWAT und mBAT zeigte (Abbildung 20). Der beobachtete stete Anstieg der *Leptin*-Expression nach Synchronisation könnte durch die Synchronisation mit Dexamethason selbst bedingt sein (271). Die rhythmische Expression von *Leptin* in mEWAT (Abbildung 20) wurde *in vivo* bisher durch eine Studie an Mäusen gezeigt (176). In einer weiteren Studie zeigt sich zwar ein leichter Anstieg von *Leptin* in der Nacht; das Tagesprofil wurde allerdings nicht als signifikant zirkadian gewertet (7). Bei Ratten wiederum zeigten bereits verschiedene Studien eine rhythmische Expression von Leptin in EWAT *in vivo* (154, 309). Diese verschiedenen Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass die zirkadiane Expression der Uhrgene im Fettgewebe alleine nicht ausreicht, um einen stabilen Leptin-Rhythmus zu generieren, und dass dieser auf weitere Zeitgeber wie Licht und Nahrungsaufnahme angewiesen ist (67, 136).

Adiponectin zeigt ebenfalls zirkadiane Blutspiegel im Menschen und bei Mäusen mit einem Maximum am Ende des subjektiven Tages (27, 98, 270, 287). Während die *Adipoq*-Expression in mEWAT anders als *in vivo* (7, 26, 27) keine signifikante zirkadiane Rhythmik zeigt, oszillierte sie in mIWAT mit einer Periode von 24 h zirkadian (Abbildung 20, Tabelle 28). In mEWAT wurde eine Signifikanz in der Rhythmik allerdings nicht erreicht ( $p = 0,8$ ). Die Synchronisation mit Dexamethason scheint hierbei erneut eine Rolle zu spielen, da mit Serumschock synchronisierte 3T3-L1-Adipozyten keine zirkadiane Rhythmik von

*Adipoq* aufweisen (235), während wie in dieser Dissertation mit Dexamethason synchronisierte dies durchaus tun (26, 28). Humane *Ex-vivo*-Daten aus subkutanem und viszeralem Fettgewebe zeigen ebenfalls eine zirkadiane Expression (97, 105), sodass in der Zusammenschau von einem endogen zirkadianen Rhythmus von Adiponectin ausgegangen werden kann.

Während der zirkadiane Blutleptinrhythmus nicht sicher endogen durch die Fettzellen ausgelöst zu sein scheint, kann bei Blutadiponectinspiegeln nach aktuellem Stand eher von einem endogen generierten zirkadianen Rhythmus ausgegangen werden. Die allgemeine Datenlage, inklusive der hier generierten Daten, gibt Hinweise darauf, dass die Regulation gegebenenfalls depotabhängig sein könnte und es weitere Experimente braucht, um diese Frage zu klären.

#### 4.5.2 Uncoupling Protein 1 (UCP1)

Während bei Leptin und Adiponectin nicht abschließend geklärt ist, ob sie direkt durch die Uhrgene gesteuert werden, sieht dies für *Ucp1* anders aus. Gerhart-Hines *et al.* konnten 2013 zeigen, dass REV-ERB $\alpha$  an den *Ucp1*-Promotor bindet und *Ucp1* *ex vivo* und in primärer BAT-Zellkultur antiphasisch zu diesem exprimiert wird (101). Zirkadiane *Ucp1*-Expression wurde zuvor bereits von mehreren Arbeitsgruppen in murinem braunen Fettgewebe *in vivo* festgestellt (196, 214, 324, 359). Auch in humanem BAT *ex vivo* und in primären BAT-Zellkulturen wurde eine rhythmische Expression gezeigt (193). Allerdings konnte in dieser Arbeit keine signifikante zirkadiane Rhythmik von *Ucp1* in mBAT festgestellt werden (Abbildung 21). Dies könnte bedeuten, dass der Rhythmus trotz Bindung von REV-ERB $\alpha$  am *Ucp1*-Promotor *in vitro* nicht aufrechterhalten werden kann. Allerdings zeigte sich in diesem Versuch eine deutliche und anhaltende Expressionsreduktion nach der Dexamethason-Stimulation in allen drei Zellreihen, sodass die Expression so stark unterdrückt worden sein könnte, dass die Amplitude zu gering für ein signifikantes Ergebnis wurde (Abschnitt 3.5). Ramage *et al.* und van den Beukel *et al.* zeigten, dass die *Ucp1*-Expression innerhalb der ersten 8 Stunden nach Exposition von BAT mit Dexamethason deutlich abnimmt und dieser Effekt für 48 Stunden anhält (254, 325). So scheint der positive Effekt der Synchronisation mit Dexamethason in diesem Fall gleichzeitig negative Auswirkungen auf *Ucp1* zu haben. Dieser Ansatz sollte bei Versuchen zur Erforschung der zirkadianen *Ucp1*-Expression durch ein anderes Mittel zur Synchronisation ersetzt werden (z.B. Forskolin).

Auch wenn subkutanes Fettgewebe nicht maßgeblich an der Wärmeproduktion durch *Ucp1* beteiligt ist, war interessanterweise *Ucp1* in mIWAT trotz der Expressionsreduktion signifikant zirkadian exprimiert (Abbildung 21). Monnier *et al.* untersuchten die Expression von *Ucp1* in subkutanem und viszeralem Fettgewebe von Mäusen *in vivo* (Licht:Dunkel 12h:12h) und zeigten ebenfalls eine zirkadiane Expression, die ohne das Protein aus einer Stabilisierungsschleife des TTL, *Rora*, sogar deutlich verstärkt ausfiel (214). Auch wenn *in vivo* *Ucp1* in viszeralem Fettgewebe zirkadian exprimiert ist, konnte dies in den immortalisierten Zellen nicht festgestellt werden. So ist hier auch im Gegensatz zu der Expression in mIWAT und mBAT keine rhythmische Tendenz erkennbar (Abbildung 21). Wie auch in subkutanem Fettgewebe wäre ein biologischer Nutzen einer rhythmischen *Ucp1*-Expression im viszeralen Fettgewebe

nicht eindeutig. Dennoch zeigt die rhythmische Expression *in vitro* von *Ucp1* in mIWAT allerdings die gute Verzahnung der inneren Uhr mit der Thermoregulation. Weitere Versuche in mBAT oder anderen *In-vitro*-BAT-Modellen (z.B. HIB-1B (169)) sind notwendig, um Klarheit zu schaffen, ob BAT endogen zu einer rhythmischen Körpertemperatur beitragen kann oder dafür exogene Stimulation notwendig ist.

#### **4.6 Anwendbarkeit des Zellmodells für (depotspezifische) Studien der zirkadianen Funktion des Fettgewebes**

Auch wenn der Einfluss der Uhrgene auf p53 und andere an der Zellteilung beteiligte Proteine bekannt ist (vgl. (289)), blieb herauszufinden, ob SV40 T-immortalisierte Adipozyten, wie andere Fettzelllinien eine funktionierende Uhr aufweisen oder das Uhrwerk durch die Immortalisierung zerstört wird. Zusammengefasst kann man sagen, dass als Zeichen eines endogen zirkadianen Uhrwerks relevante Uhrgene auch in den hier verwendeten Adipozyten zirkadian exprimiert wurden. Daraus ergeben sich zwei wichtige Punkte: Erstens ergeben sich hierdurch weitere Beweise für eine eigenständige innere Uhr von Fettzellen und zweitens geht diese durch die SV40 T-Immortalisierung nicht verloren. Außerdem zeigte sich die Uhrgenexpression vergleichbar mit bereits erhobenen Daten anderer Arbeitsgruppen (Abschnitt 4.3.3). Gründe für mögliche Unterschiede zu den publizierten Daten wurden an der jeweiligen Stelle diskutiert und beinhalteten neben der Immortalisierung z.B. die Synchronisationsmethode mit Dexamethason.

Auch wenn die Klärung der Depot-Spezifität der immortalisierten Adipozyten nicht Teil dieser Dissertation sein sollte, spielt die Frage jedoch eine Rolle bezüglich der Anwendbarkeit des Zellmodells für zukünftige Studien. Idealerweise repliziert ein *In-vitro*-Modell weitestgehend die Situation *in vivo*. Bei weißem Fettgewebe wären das univakuoläre reife Adipozyten sowie eine eher geringe Expression von *Ucp1*. Wie in Abschnitt 4.2 erläutert traf dies auf die SV40 T-immortalisierten WAT-Adipozyten nicht zu. Ebenso zeigten die BAT-Zellen unerwarteterweise eine deutliche Leptin- und Adiponectin-Expression. Auch wenn sich für beides Erwähnungen in der Literatur finden, bleibt die Frage, ob nach der Immortalisierung noch von einer echten Depot-Spezifität gesprochen werden kann. Zur Differenzierung wäre es daher sinnvoll, weitere Marker, die für die zu untersuchende Eigenschaft wichtig sind, zu eruieren und zu testen. Interessante Kandidaten zur näheren Unterscheidung zwischen den drei Depots nach einer Studie von de Jong *et al.* wären PRDM16, cell death activator CIDE-A (Cidea), TNF receptor superfamily member 9 (Cd137) sowie in Prä-Adipozyten transcription factor 21 (Tcf21), homeobox C8 (Hoxc8) und weitere (69).

## 4.7 Fazit und Ausblick

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob SV40 T-immortalisierte Adipozyten verschiedener muriner Fettdepots eine funktionierende molekulare innere Uhr aufweisen. Außerdem fehlte es zum Teil an *In-vitro*-Daten zur endogenen zirkadianen Rhythmik spezifischer Uhrgene in Fettzellen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte nun gezeigt werden, dass trotz Immortalisierung die innere Uhr sowohl in Prä-, als auch reifen Adipozyten funktioniert und zum Teil konnte für einige Uhrgene und auch Adipokine, nach derzeitigem wissenschaftlichem Stand, zum ersten Mal eine zirkadiane Expression in bestimmten Fettdepots festgestellt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zirkadianen Eigenschaften dieser *In-vitro*-Modelle aus weißem und braunem Fettgewebe mit der *In-vivo*-Situation vergleichbar sind und sich somit für die Grundlagenforschung im Bereich der zirkadianen Uhr in Fettzellen eignen. Groß angelegte zirkadiane Forschungsprojekte zum Thema Interaktion von Fettgeweben mit Hormonen und anderen Zeitgebern oder auch die Wirkstoffforschung - zur Bekämpfung von Chronodisruption und deren Folgen - wären mit den depot-spezifischen immortalisierten Fettzelllinien, neben Studien zur Erforschung der Auswirkungen genetischer Veränderungen auf die zirkadiane Uhr und den Metabolismus, möglich und stellen somit eine Alternative zu aufwändigen und kostenintensiven *in vivo* und *ex vivo* Studien dar.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Wechsel zwischen Tag und Nacht bestimmt seit jeher unseren Tagesablauf. Organismen haben über die Zeit eine Strategie entwickelt, welche es ihnen ermöglicht, sich an die damit einhergehenden Gegebenheiten anzupassen. Die zirkadianen Rhythmen steuern unter anderem die Aktivität, das Essverhalten und Stoffwechselprozesse (166, 266). Die Störung des natürlichen Rhythmus, durch Schichtarbeit oder Jetlag kann Folgen haben (266). Schichtarbeit, beispielsweise, geht mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas sowie Herz-Kreislaufkrankungen einher (134, 180, 322). Als metabolisch wichtiges Organ spielt das Fettgewebe hierbei eine wichtige Rolle. Es speichert Energie (50) und über Adipokine, wie Leptin und Adiponectin, informiert das Fettgewebe die anderen Organe über den Energiezustand im Körper (162). Subkutanes Fettgewebe ist der größte Energiespeicher während viszerales Fettgewebe unter anderem Organe umhüllt und sich vor allem im Bauchraum befindet. Inzwischen weiß man, dass speziell die viszerale Adipositas mit den bekannten Folgeerkrankungen, wie Herzkreislaufkrankungen oder dem Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist (31). Braunes Fettgewebe wiederum wandelt Energie in Wärme um und ist damit in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Wissenschaft gerückt (328). Zur Sicherstellung einer stabilen Energieversorgung des Körpers folgt der Fettstoffwechsel auch einem zirkadianen Rhythmus (166). So zeigen Adipozyten eine endogene zirkadiane Expression wichtiger Uhrgene (166, 235, 286). Bisher fehlten allerdings teilweise zirkadiane *in vitro* Modelle für die verschiedenen Fettgewebsarten. In dieser Dissertation wurden daher Simian-Virus 40 T-Antigen immortalisierte Adipozyten aus murinem subkutanem, viszeralem und braunem Fettgewebe auf ihre zirkadianen Eigenschaften hin untersucht (zum Beispiel 6, 9). Es konnte gezeigt werden, dass auch nach der Immortalisierung die zirkadiane Expression wichtiger Uhrgene, sowohl vor als auch nach der Differenzierung, erhalten geblieben ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich im Laufe der Adipozytendifferenzierung Expressionshöhe und Amplitude des zirkadianen Rhythmus ändern. Erfreulicherweise hat sich gezeigt, dass wichtige zirkadiane Eigenschaften mit der Situation *in vivo* vergleichbar geblieben sind und sich die immortalisierten Adipozyten somit für die Erforschung zirkadianer Eigenschaften unterschiedlicher Fettgewebsarten *in vitro* eignen. Daher konnte sich der weiterführenden Frage gewidmet werden, ob der teils rhythmische Blutspiegel von Leptin und Adiponectin (252) und die zirkadiane Körpertemperaturschwankung (260) auf eine zirkadiane Expression der beteiligten Gene (*Lep*, *Adipoq*, *Ucp1*) zurückzuführen ist. Hierfür zeigten sich allerdings keine eindeutigen Ergebnisse.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Dissertation, neben dem Einfluss der Adipozytendifferenzierung auf die innere Uhr, gezeigt werden, dass sich Simian-Virus 40 T-Antigen immortalisierte Adipozyten verschiedener muriner Fettdepots prinzipiell als *in vitro* Modell zur Erforschung der zirkadianen Uhr im Fettgewebe eignen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrahamson EE, Moore RY. 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916(1–2):172–91
2. Ahrén. 2000. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol Scand.* 169(4):325–31
3. Akashi M, Takumi T. 2005. The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol.* 12(5):441–48
4. Ali SH, DeCaprio JA. 2001. Cellular transformation by SV40 large T antigen: Interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol.* 11(1):15–22
5. Almalki SG, Agrawal DK. 2016. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 92(1–2):41–51
6. Ambele MA, Dessels C, Durandt C, Pepper MS. 2016. Genome-wide analysis of gene expression during adipogenesis in human adipose-derived stromal cells reveals novel patterns of gene expression during adipocyte differentiation. *Stem Cell Res.* 16(3):725–34
7. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. 2005. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology.* 146(12):5631–36
8. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. 2009. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity.* 17(11):2100–2102
9. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa JI, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoaka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 257(1):79–83
10. Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GMC, Fabbri A, Caprio M. 2010. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem.* 110(3):564–72
11. Armengol J, Villena JA, Hondares E, Carmona MC, Sul HS, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. 2012. Pref-1 in brown adipose tissue: specific involvement in brown adipocyte differentiation and regulatory role of C/EBP $\delta$ . *Biochem J.* 443(3):799–810
12. Armstrong S. 1980. A chronometric approach to the study of feeding behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 4(1):27–53
13. Aschoff J. 1965. Circadian rhythms in man. *Science (80- ).* 148(3676):1427–32
14. Astiz M, Heyde I, Oster H. 2019. Mechanisms of communication in the Mammalian Circadian timing system. *Int J Mol Sci.* 20:343
15. Ayyar VS, Sukumaran S. 2021. Circadian rhythms: influence on physiology, pharmacology, and therapeutic interventions. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 48(3):321–38
16. Azahari N, Muzaffar Ali Khan Khattak M, Taher M, Jauhari Arief Ichwan S. 2014. Dose Water Extract of Cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*) Exhibits Anti-Diabetic Properties in Cultured 3T3-L1 Adipocytes: A Concurrent Assessment of Adipogenesis, Lipolysis and Glucose Uptakes. *J Food Nutr Res.* 2(11):764–69
17. Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M. 2012. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One.* 7(5):e36569
18. Bahmad HF, Daouk R, Azar J, Sapudom J, Teo JCM, Abou-Kheir W, Al-Sayegh M. 2020. Modeling Adipogenesis: Current and Future Perspective. *Cells.* 9(10):1–21
19. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science (80- ).* 289(5488):2344–47

20. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 93(6):929–37
21. Bamshad M, Aoki VT, Gregory Adkison M, Warren WS, Bartness TJ. 1998. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 275:R291–99
22. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Jacobino JP, De Matteis R, Cinti S. 2010. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *AJP Endocrinol Metab*. 298(6):E1244–53
23. Barclay JL, Shostak A, Leliavski A, Tsang AH, Johren O, Muller-Fielitz H, Landgraf D, Naujokat N, van der Horst GTJ, Oster H. 2013. High-fat diet-induced hyperinsulinemia and tissue-specific insulin resistance in Cry-deficient mice. *AJP Endocrinol Metab*. 31(6):577–87
24. Barclay JL, Tsang AH, Oster H. 2012. Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. *Prog Brain Res*. 199:163–81
25. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. 1984. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*. 312:752–54
26. Barnea M, Chapnik N, Genzer Y, Froy O. 2015. The circadian clock machinery controls adiponectin expression. *Mol Cell Endocrinol*. 399:284–87
27. Barnea M, Madar Z, Froy O. 2010. High-fat diet followed by fasting disrupts circadian expression of adiponectin signaling pathway in muscle and adipose tissue. *Obesity*. 18(2):230–38
28. Barnea M, Madar Z, Froy O. 2013. Dexamethasone induces high-amplitude rhythms in preadipocytes, but hinders circadian expression in differentiated adipocytes. *Chronobiol Int*. 30(6):837–42
29. Bartness TJ, Shrestha YB, Vaughan CH, Schwartz GJ, Song CK. 2010. Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Mol Cell Endocrinol*. 318(1–2):34–43
30. Bartness TJ, Song CK, Demas GE. 2001. SCN efferents to peripheral tissues: Implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms*. 16(3):196–204
31. Blundell JE, Dulloo AG, Salvador J, Frühbeck G. 2014. Clinical Information Beyond BMI-Phenotyping the Obesities BMI-Help or Hindrance? *Obes Facts*. 7:322–28
32. Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Krueger JM. 2004. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: Effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 287(5 56-5):R1071–R1079
33. Bray MS, Ratcliffe WF, Grenett MH, Brewer RA, Gamble KL, Young ME. 2013. Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. *Int J Obes*. 37(6):843–52
34. Brown SA, Fleury-Olela F, Nagoshi E, Hauser C, Juge C, Meier CA, Chicheportiche R, Dayer JM, Albrecht U, Schibler U. 2005. The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol*. 3(10):e338
35. Brown SA, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U. 2002. Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. *Curr Biol*. 12:1574–83
36. Brunner E, Konietzschke F, Pauly M, Puri ML. 2017. Rank-based procedures in factorial designs: hypotheses about non-parametric treatment effects. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol*. 79(5):1463–85
37. Buhr ED, Takahashi JS. 2013. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*. 217:3–27
38. Buhr ED, Yoo S-H, Takahashi JS. 2010. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science (80- )*. 330(6002):379–85
39. Bunker MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Laurel A, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. 2013. Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. . 103(7):1009–17
40. Buyse M, Viengchareun S, Bado A, Lombès M. 2001. Insulin and glucocorticoids differentially regulate leptin transcription and secretion in brown adipocytes. *FASEB J*. 15(8):1357–66
41. Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. 84(1):277–359

42. Carlotti F, Bazuine M, Kekarainen T, Seppen J, Pognonec P, Maassen JA, Hoeben RC. 2004. Lentiviral vectors efficiently transduce quiescent mature 3T3-L1 adipocytes. *Mol Ther.* 9(2):209–17
43. Chaix A, Lin T, Le HD, Chang MW, Panda S. 2019. Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metab.* 29(2):303-319.e4
44. Chappuis S, Ripperger JA, Schnell A, Rando G, Jud C, Wahli W, Albrecht U. 2013. Role of the circadian clock gene *Per2* in adaptation to cold temperature. *Mol Metab.* 2(3):184–93
45. Chawla A, Lazar MA. 1993. Induction of Rev-Erba, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the  $\alpha$ -thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 268(22):16265–69
46. Cheon S, Park N, Cho S, Kim K. 2013. Glucocorticoid-mediated *Period2* induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucleic Acids Res.* 41(12):6161–74
47. Cherington V, Brown M, Paucha E, St Louis J, Spiegelman BM, Roberts TM. 1988. Separation of simian virus 40 large-T-antigen-transforming and origin-binding functions from the ability to block differentiation. *Moleculand Cell Biol.* 8(3):1380–84
48. Cherington V, Morgan B, Spiegelman BM, Roberts TM. 1986. Recombinant retroviruses that transduce individual polyoma tumor antigens: effects on growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4307–11
49. Chilton JM, Le Doux JM. 2008. Quantitative analysis of retroviral and lentiviral gene transfer to murine embryonic stem cells. *J Biotechnol.* 138(1–2):42–51
50. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. 2016. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 7:30
51. Choi H, Lee H, Kim TH, Kim HJ, Lee YJ, Lee SJ, Yu JH, Kim D, Kim KS, Park SW, Kim JW. 2014. *G0/G1* switch gene 2 has a critical role in adipocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 21(7):1071–80
52. Chu DT, Gawronska-Kozak B. 2017. Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response. *Biochimie.* 138:102–5
53. Cinti S. 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *AJP Endocrinol Metab.* 297(5):E977–86
54. Cinti S. 2012. The adipose organ at a glance. *DMM Dis Model Mech.* 5(5):588–94
55. Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. 1997. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology.* 138(2):797–804
56. Classon M, Kennedy BK, Mulloy R, Harlow E. 2000. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci.* 97(20):10826–31
57. Conde J, Scotece M, Gómez R, López V, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. 2011. Adipokines: Biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *BioFactors.* 37(6):413–20
58. Cook A, Cowan C. 2009. Adipose. *StemBook.* 119:693–705
59. Cook KS, Hunt CR, Spiegelman BM. 1985. Developmentally regulated mRNAs in 3T3-adipocytes: Analysis of transcriptional control. *J Cell Biol.* 100(2):514–20
60. Coomans CP, Van Den Berg SAA, Houben T, Van Klinken JB, Van Den Berg R, Pronk ACM, Havekes LM, Romijn JA, Van Dijk KW, Biermasz NR, Meijer JH. 2013. Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *FASEB J.* 27(4):1721–32
61. Crew RC, Mark PJ, Waddell BJ. 2018. Obesity Disrupts Rhythmic Clock Gene Expression in Maternal Adipose Tissue during Rat Pregnancy. *J Biol Rhythms.* 33(3):289–301
62. Cristancho AG, Lazar MA. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(11):722–34
63. Cummings DE, Schwartz MW. 2003. Genetics and Pathophysiology of Human Obesity. *Annu Rev Med.* 54(February 2003):453–71
64. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H,

- Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 360(15):1509–17
65. Dali-Youcef N, Matakı C, Coste A, Messaddeq N, Giroud S, Blanc S, Koehl C, Champy MF, Chambon P, Fajas L, Metzger D, Schoonjans K, Auwerx J. 2007. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(25):10703–8
66. Dallmann R, Viola AU, Tarokh L, Cajochen C, Brown SA. 2012. The human circadian metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(7):2625–29
67. Damiola F, Le Minli N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14(23):2950–61
68. Dang F, Sun X, Ma X, Wu R, Zhang D, Chen Y, Xu Q, Wu Y, Liu Y. 2016. Insulin post-transcriptionally modulates Bmal1 protein to affect the hepatic circadian clock. *Nat Commun.* 7:12696
69. de Jong JMA, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J. 2015. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 308(12):E1085–1105
70. Debruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. 2007. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci.* 10(5):543–45
71. DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM. 2006. A Clock Shock: Mouse CLOCK Is Not Required for Circadian Oscillator Function. *Neuron.* 50(3):465–77
72. Deem JD, Muta K, Ogimoto K, Nelson JT, Velasco KR, Kaiyala KJ, Morton GJ. 2018. Leptin regulation of core body temperature involves mechanisms independent of the thyroid axis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 315:E552–64
73. Djian P, Phillips M, Green H. 1985. The activation of specific gene transcription in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Cell Physiol.* 124(3):554–56
74. Doi R, Oishi K, Ishida N. 2010. CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. *J Biol Chem.* 285(29):22114–21
75. Dufau J, Shen JX, Couchet M, De Castro Barbosa T, Mejhert N, Massier L, Griseti E, Mouisel E, Amri E-Z, Lauschke VM, Rydén M, Langin D. 2021. In vitro and ex vivo models of adipocytes. *Am J Physiol Physiol.* ajpcell.00519.2020
76. Dumbell R, Matveeva O, Oster H. 2016. Circadian clocks, stress, and immunity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 7:37
77. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 27:79–101
78. Durgan DJ, Young ME. 2010. The cardiomyocyte circadian clock: Emerging roles in health and disease. *Circ Res.* 106(4):647–58
79. Eckel-Mahan KL, Patel VR, De Mateo S, Orozco-Solis R, Ceglia NJ, Sahar S, Dilag-Penilla SA, Dyar KA, Baldi P, Sassone-Corsi P. 2013. Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell.* 155(7):1464–78
80. Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. 1998. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 274:R1309–16
81. Esteve Ràfols M. 2014. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol y Nutr (English Ed.* 61(2):100–112
82. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145(5):2273–82
83. Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR. 2001. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol.* 21(1):319–29
84. Fischer AW, Cannon B, Nedergaard J. 2019. Leptin: Is it thermogenic? *Endocr Rev.* 41(2):232–60
85. Fonjallaz P, Ossipow V, Wanner G, Schibler U. 1996. The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter

- preferences. *EMBO J.* 15(2):351–62
86. Fonken LK, Nelson RJ. 2014. The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocr Rev.* 35(4):648–70
  87. Fonken LK, Workman JL, Walton JC, Weil ZM, Morris JS, Haim A, Nelson RJ. 2010. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(43):18664–69
  88. Frederich RC, Löllmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, Flier JS. 1995. Expression of ob mRNA and its Encoded Protein in Rodents. *J Clin Invest.* 96:1658–63
  89. Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brodin RE. 1993. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J Clin Invest.* 92(5):2191–98
  90. Friedman J. 2014. Leptin at 20: An overview. *J Endocrinol.* 223(1):T1-8
  91. Friedman JM, Halaas JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395:763–70
  92. Friedrichs M, Kolbe I, Seemann J, Tsang AH, Cherradi L, Klein J, Oster H. 2018. Circadian clock rhythms in different adipose tissue model systems. *Chronobiol Int.* 35(11):1543–52
  93. Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso JA, Fernández S, Rodríguez A. 2014. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev.* 27(1):63–93
  94. Funcke JB, Scherer PE. 2019. Beyond adiponectin and leptin: Adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *J Lipid Res.* 60(10):1648–97
  95. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. 2000. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr.* 72:694–701
  96. Gallego M, Virshup DM. 2007. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(2):139–48
  97. Garaulet M, Ordovas JM, Gomez-Abellan P, Martinez JA, Madrid JA. 2011. An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism. *J Cell Physiol.* 226(8):2075–80
  98. Gavrilu A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS. 2003. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: Comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(6):2838–43
  99. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* 280(5369):1564–69
  100. Gentile AM, Lhamyani S, Coín-Aragüez L, Oliva-Olivera W, Zayed H, Vega-Rioja A, Monteseirin J, Romero-Zerbo SY, Tinahones FJ, Bermúdez-Silva FJ, El Bekay R. 2016. RPL13A and EEF1A1 are suitable reference genes for qPCR during adipocyte differentiation of vascular stromal cells from patients with different BMI and HOMA-IR. *PLoS One.* 11(6):e0157002
  101. Gerhart-Hines Z, Feng D, Emmett MJ, Everett LJ, Loro E, Briggs ER, Bugge A, Hou C, Ferrara C, Seale P, Pryma DA, Khurana TS, Lazar MA. 2013. The nuclear receptor Rev-erba controls circadian thermogenic plasticity. *Nature.* 503(7476):410–13
  102. Gessner C. 1551. *Conradi Gesneri medici Tigurini Historiæ animalium Lib. I. de quadrupedibus.* Tiguri: Apud Christ. Froschouerum., 1–1164 S.
  103. Gesta S, Kahn CR. 2017. White adipose tissue. In *Adipose Tissue Biology*, Hrsg. ME Symonds, S. 149–99. Cham: Springer International Publishing. 2. Aufl.
  104. Gomez-Abellan P, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Ordovas JM, Garaulet M. 2012. Glucocorticoids Affect 24 h Clock Genes Expression in Human Adipose Tissue Explant Cultures. *PLoS One.* 7(12):e50435
  105. Gomez-Abellan P, Gomez-Santos C, Madrid JA, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, Ordovas JM, Garaulet M. 2010. Circadian expression of adiponectin and its receptors in human adipose tissue. *Endocrinology.* 151(1):115–22
  106. Gómez-Abellán P, Madrid JA, Luján JA, Frutos MD, González R, Martínez-Augustín O, De Medina FS, Ordovás JM, Garaulet M. 2012. Sexual dimorphism in clock genes expression in human adipose tissue.

- Obes Surg.* 22(1):105–12
107. Gómez-Santos C, Gómez-Abellán P, Madrid JA, Hernández-Morante JJ, Lujan JA, Ordovas JM, Garaulet M. 2009. Circadian Rhythm of Clock Genes in Human Adipose Explants. *Obes (silver spring)*. 17(8):1481–1485
  108. Gong D-W, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. 1996. Molecular Genetics: Genomic Structure and Promoter Analysis of the Human obese Gene Genomic Structure and Human obese Gene \*. *J Biol Chem*. 271(8):3971–75
  109. Goossens GH. 2017. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*. 10:207–15
  110. Green H, Kehinde O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*. 1(3):113–16
  111. Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 5(1):19–27
  112. Greenwell BJ, Trott AJ, Beytebiere JR, Pao S, Bosley A, Beach E, Finegan P, Hernandez C, Menet JS. 2019. Rhythmic Food Intake Drives Rhythmic Gene Expression More Potently than the Hepatic Circadian Clock in Mice. *Cell Rep*. 27(3):649-657.e5
  113. Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, Granneman JG, Piomelli D, Leff T, Sassone-Corsi P. 2010. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR $\gamma$ . *Cell Metab*. 12(5):509–20
  114. Guennoun A, Kazantzis M, Thomas R, Wabitsch M, Tews D, Sastry KS, Abdelkarim M, Zilberfarb V, Strosberg AD, Chouchane L. 2015. Comprehensive molecular characterization of human adipocytes reveals a transient brown phenotype. *J Transl Med*. 13:135
  115. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. 1998. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 102(2):412–20
  116. Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 20(5):391–403
  117. Guo B, Chatterjee S, Li L, Kim JM, Lee J, Yechoor VK, Minze LJ, Hsueh W, Ma K. 2012. The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway. *FASEB J*. 26(8):3453–63
  118. Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K. 2009. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets*. 13(2):235–46
  119. Hallenborg P, Fjære E, Liaset B, Petersen RK, Murano I, Sonne SB, Falkerslev M, Winther S, Jensen BAH, Ma T, Hansen JB, Cinti S, Blagoev B, Madsen L, Kristiansen K. 2015. p53 regulates expression of uncoupling protein 1 through binding and repression of PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ . *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 310:E116–E128
  120. Haluzik M, Pařízková J, Haluzik MM. 2004. Adiponectin and Its Role in the Obesity-Induced Insulin Resistance and Related Complications. *Physiol Res*. 53:123–29
  121. Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. 1995. Increase obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese human. *Nat Med*. 1(9):953–56
  122. Hansen JB, Jorgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Boye HA, Petrovic N, Enerback S, Nedergaard J, Cinti S, Riele H t., Kristiansen K. 2004. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci*. 101(12):4112–17
  123. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. 2002. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 29(10):1393–98
  124. Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. 1990. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 343:536–40
  125. Hardman JA, Haslam IS, Farjo N, Farjo B, Paus R. 2015. Thyroxine differentially modulates the peripheral clock: Lessons from the human hair follicle. *PLoS One*. 10(3):1–15
  126. Harmelen V Van, Dicker A, Ryde M, Hauner H, Lo F, Arner P. 2002. Increased Lipolysis and Decreased Leptin Production by Human Omental as Compared With Subcutaneous. *Diabetes*. 51(19):2029–36
  127. Harmelen V Van, Reynisdottir S, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F, Arner P. 1998. Leptin

- Secretion From Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Women. *Diabetes*. 47:913–17
128. Hasan S, Santhi N, Lazar AS, Slak A, Lo J, von Schantz M, Archer SN, Johnston JD, Dijk D-J. 2012. Assessment of circadian rhythms in humans: comparison of real-time fibroblast reporter imaging with plasma melatonin. *FASEB J*. 26(6):2414–23
  129. Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S, Kanai A, Suzuki Y, Sassone-Corsi P, Aburatani H, Sugano S, Takumi T. 2010. Genome-Wide Profiling of the Core Clock Protein BMAL1 Targets Reveals a Strict Relationship with Metabolism. *Mol Cell Biol*. 30(24):5636–48
  130. He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M. 1995. The mouse obese gene: Genomic organization, promoter activity, and activation by ccaat/enhancer-binding protein  $\alpha$ . *J Biol Chem*. 270(48):28887–91
  131. Henry BA, Clarke IJ. 2008. Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. *J Neuroendocrinol*. 20(6):842–49
  132. Hepler C, Vishvanath L, Gupta RK. 2017. Sorting out adipocyte precursors and their role in physiology and disease. *Genes Dev*. 31(2):127–40
  133. Heptulla R, Smitten A, Teague B, Tamborlane W V., Ma Y-Z, Caprio S. 2001. Temporal Patterns of Circulating Leptin Levels in Lean and Obese Adolescents: Relationships to Insulin, Growth Hormone, and Free Fatty Acids Rhythmicity. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(1):90–96
  134. Hermansson J, Bøggild H, Hallqvist J, Karlsson B, Knutsson A, Nilsson T, Reuterwall C, Gådin KG. 2019. Interaction between shift work and established coronary risk factors. *Int J Occup Environ Med*. 10(2):57–65
  135. Herxheimer A. 2014. Jet lag. *BMJ Clin Evid*. 04:2303
  136. Heyde I, Oster H. 2019. Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. *Sci Rep*. 9(1):1–13
  137. Higgins C, Chatterjee S, Cherington V. 1996. The block of adipocyte differentiation by a C-terminally truncated, but not by full-length, simian virus 40 large tumor antigen is dependent on an intact retinoblastoma susceptibility protein family binding domain. *J Virol*. 70(2):745–52
  138. Hogenesch JB, Gu Y-Z, Jain S, Bradfield CA. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci*. 95(10):5474–79
  139. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 271(18):10697–703
  140. Hube F, Lietz U, Igel M, Jensen PB, Tornqvist H, Joost HG, Hauner H. 1996. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res*. 28:690–93
  141. Hughes ME, Hogenesch JB, Kornacker K. 2010. JTK\_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. *J Biol Rhythms*. 25(5):372–80
  142. Hunt CR, Ro JH, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM. 1986. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc Natl Acad Sci*. 83(11):3786–90
  143. Husse J, Hintze SC, Eichele G, Lehnert H, Oster H. 2012. Circadian clock genes Per1 and Per2 regulate the response of metabolism-associated transcripts to sleep disruption. *PLoS One*. 7(12):e52983
  144. Husse J, Leliavski A, Tsang AH, Oster H, Eichele G. 2014. The light-dark cycle controls peripheral rhythmicity in mice with a genetically ablated suprachiasmatic nucleus clock. *FASEB J*. 28(11):4950–60
  145. Ibrahim MM. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obes Rev*. 11(1):11–18
  146. Ikeda Y, Sasaki H, Ohtsu T, Shiraishi T, Tahara Y, Shibata S. 2015. Feeding and adrenal entrainment stimuli are both necessary for normal circadian oscillation of peripheral clocks in mice housed under different photoperiods. *Chronobiol Int*. 32(2):195–210
  147. Janszky I, Ljung R. 2008. Shifts to and from Daylight Saving Time and Incidence of Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 359(18):1966–68
  148. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dagaard S, Homøe P, Loft A, De Jong J, Mathur N, Cannon B,

- Nedergaard J, Pedersen BK, Møller K, Scheele C. 2013. A classical brown adipose tissue mrna signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 17(5):798–805
149. Johann K, Cremer AL, Fischer AW, Heine M, Pensado ER, Resch J, Nock S, Virtue S, Harder L, Oelkrug R, Astiz M, Brabant G, Warner A, Vidal-Puig A, Oster H, Boelen A, López M, Heeren J, Dalley JW, Backes H, Mittag J. 2019. Thyroid-Hormone-Induced Browning of White Adipose Tissue Does Not Contribute to Thermogenesis and Glucose Consumption. *Cell Rep.* 27(11):3385–3400.e3
150. Johnston JG, Pollock DM. 2018. Circadian regulation of renal function. *Free Radic Biol Med.* 119:93–107
151. Jung CH, Kim MS. 2013. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res.* 36:201–7
152. Junqueira LC, Carneiro J. 1991. Fettgewebe. In *Histologie*, Hrsg. LC Junqueira, J Carneiro, S. 172–79. Springer International Publishing. 3. Aufl.
153. Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni J V, Gygi SP, Spiegelman BM. 2009. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- $\beta$  transcriptional complex. *Nature.* 460(7259):1154–58
154. Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM. 2001. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology.* 142(6):2677–85
155. Kalsbeek A, La Fleur S, Fliers E. 2014. Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metab.* 3(4):372–83
156. Kantermann T, Juda M, Meroow M, Roenneberg T. 2007. The Human Circadian Clock's Seasonal Adjustment Is Disrupted by Daylight Saving Time. *Curr Biol.* 17(22):1996–2000
157. Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. 2011. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(4):1657–62
158. Karl-Arne Stokkan, Shin Yamazaki, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki, Michael Menaker. 2001. Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science (80- ).* 291(5503):490–93
159. Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE, Speizer FE, Hennekens CH. 1995. Prospective Study of Shift Work and Risk of Coronary Heart Disease in Women. *Circulation.* 92(11):3178–82
160. Keith R, Takahashi S. 1995. Temperature Compensation Chick Pineal Cell Circadian and Temperature Clock Entrainment of the. *Neurobiology.* 75:5681–92
161. Kennaway DJ, Varcoe TJ, Voultzios A, Boden MJ. 2013. Global Loss of Bmal1 Expression Alters Adipose Tissue Hormones, Gene Expression and Glucose Metabolism. *PLoS One.* 8(6):e65255
162. Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6):2548–56
163. Kersten S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2(4):282–86
164. Khacho M, Mekhail K, Pilon-Larose K, Pause A, Cote J, Lee S. 2008. eEF1A Is a Novel Component of the Mammalian Nuclear Protein Export Machinery. *Mol Biol Cell.* 19:5296–5308
165. Kiehn J-T, Koch CE, Walter M, Brod A, Oster H. 2017. Circadian rhythms and clocks in adipose tissues: current insights. *ChronoPhysiology Ther.* Volume 7:7–17
166. Kiehn JT, Tsang AH, Heyde I, Leinweber B, Kolbe I, Leliavski A, Oster H. 2017. Circadian rhythms in adipose tissue physiology. *Compr Physiol.* 7(2):383–427
167. Kim HJ, Yoon BK, Park H, Seok JW, Choi H, Yu JH, Choi Y, Song SJ, Kim A, Kim JW. 2016. Caffeine inhibits adipogenesis through modulation of mitotic clonal expansion and the AKT/GSK3 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *BMB Rep.* 49(2):111–15
168. Klarsfeld A. 2013. At the dawn of chronobiology
169. Klaus S, Choy L, Champigny O, Cassard-Doulcier A-M, Ross S, Spiegelman B, Ricquier D. 1994. Characterization of the novel brown adipocyte cell line HIB 1B Adrenergic. *J Cell Sci.* 107(1):313–19
170. Klein J, Fasshauer M, Benito M, Kahn CR. 2000. Insulin and the  $\beta$ 3-Adrenoceptor Differentially

- Regulate Uncoupling Protein-1 Expression. *Mol Endocrinol.* 14(6):764–73
171. Klein J, Fasshauer M, Klein HH, Benito M, Ronald Kahn C. 2002. Novel adipocyte lines from brown fat: A model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *BioEssays.* 24(4):382–88
  172. Klein J, Fasshauer M, Lowell BB, Benito M, Kahn CR, Ito M. 1999.  $\beta$ -3-Adrenergic Stimulation Differentially Inhibits Insulin Signaling and Decreases Insulin-induced Glucose Uptake in Brown Adipocytes. *J Biol Chem.* 274(49):34795–802
  173. Kohlie R, Perwitz N, Resch J, Schmid SM, Lehnert H, Klein J, Iwen KA. 2017. Dopamine directly increases mitochondrial mass and thermogenesis in brown adipocytes. *J Mol Endocrinol.* 58(2):57–66
  174. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. 2007. High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metab.* 6(5):414–21
  175. Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, Takahashi JS. 2012. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science (80- ).* 338(6105):349–54
  176. Kolbe I. *The interplay of central and peripheral circadian clocks in white adipose function and metabolic homeostasis.* Rer.nat. Diss. Lübeck, 2017
  177. Kolbe I, Brehm N, Oster H. 2019. Interplay of central and peripheral circadian clocks in energy metabolism regulation. *J Neuroendocrinol.* 31:e12659
  178. Kolbe I, Carrasco-Benso MP, López-Mínguez J, Luján J, Scheer FAJL, Oster H, Garaulet M. 2019. Circadian period of luciferase expression shortens with age in human mature adipocytes from obese patients. *FASEB J.* 33(1):
  179. Kolbe I, Husse J, Salinas G, Lingner T, Astiz M, Oster H. 2016. The SCN Clock Governs Circadian Transcription Rhythms in Murine Epididymal White Adipose Tissue. *J Biol Rhythms.* 31(6):577–87
  180. Kolbe I, Oster H. 2019. Chronodisruption, metabolic homeostasis, and the regulation of inflammation in adipose tissues. *Yale J Biol Med.* 92(2):317–25
  181. Kopelmann PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature.* 404(6778):635–43
  182. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U. 2007. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* 5(2):0179–89
  183. Kotzbeck P, Giordano A, Mondini E, Murano I, Severi I, Venema W, Cecchini MP, Kershaw EE, Barbatelli G, Haemmerle G, Zechner R, Cinti S. 2018. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res.* 59(5):784–94
  184. Kraus D, Fasshauer M, Ott V, Meier B, Jost M, Klein HH, Klein J. 2002. Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes. *J Endocrinol.* 175:185–91
  185. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 98(2):193–205
  186. Kuryszko J, Slawuta P, Sapikowski G. 2016. Secretory function of adipose tissue. *Pol J Vet Sci.* 19(2):441–46
  187. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. 1999. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol.* 11(8):643–52
  188. Lahti TA, Leppämäki S, Lönnqvist J, Partonen T. 2008. Transitions into and out of daylight saving time compromise sleep and the rest-activity cycles. *BMC Physiol.* 8(1):3
  189. Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK. 2016. NPAS2 Compensates for Loss of CLOCK in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genet.* 12(2):e1005882
  190. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. 2005. Adipokines: Molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 288:H2031–H2041
  191. Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F, Schibler U, Bonfils C. 1999. Circadian Expression of the Steroid 15  $\alpha$ -Hydroxylase (Cyp2a4) and Coumarin 7-Hydroxylase (Cyp2a5) Genes in Mouse Liver Is Regulated by the PAR Leucine Zipper Transcription Factor DBP. *Mol Cell Biol.* 19(10):6488–99

192. Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schütz G, Schibler U. 2001. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 20(24):7128–36
193. Lee P, Bova R, Schofield L, Bryant W, Dieckmann W, Slattery A, Govendir MA, Emmett L, Greenfield JR. 2016. Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans. *Cell Metab.* 23(4):602–9
194. Lee YK, Cowan CA. 2013. White to brite adipocyte transition and back again. *Nat Cell Biol.* 15(6):568–69
195. Lekkas D, Paschos GK. 2019. The circadian clock control of adipose tissue physiology and metabolism. *Auton Neurosci Basic Clin.* 219(April):66–70
196. Li S, Yu Q, Wang GX, Lin JD. 2013. The Biological Clock is Regulated by Adrenergic Signaling in Brown Fat but is Dispensable for Cold-Induced Thermogenesis. *PLoS One.* 8(8):e70109
197. Liu AC, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Welsh DK, Kay SA. 2008. Redundant function of REV-ERBa and  $\beta$  and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genet.* 4(2):e1000023
198. Liu X, Zwiebel LJ, Hinton D, Benzer S, Hall JC, Rosbash M. 1992. The period gene encodes a predominantly nuclear protein in adult *Drosophila*. *J Neurosci.* 12:2735–44
199. Loboda A, Fine B, Joseph J, Nebozhyn M, Zhang C, He Y, Yang X, Wright C, Morris M, Chalikonda I, Ferguson M, Emilsson V, Leonardson A, Lamb J, Dai H, Schadt E, Greenberg HE. 2009. Diurnal variation of the human adipose transcriptome and the link to metabolic disease. *BMC Med Genomics.* 2:7
200. Lončar D. 1991. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res.* 266(1):149–61
201. Madsen L, Petersen RK, Sørensen MB, Jørgensen C, Hallenborg P, Pridal L, Fleckner J, Amri E-Z, Krieg P, Furstenberger G, Berge RK, Kristiansen K. 2003. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem J.* 375(Pt 3):539–49
202. Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM. 1995. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci.* 92(15):6957–60
203. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. 1995. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1(11):1155–61
204. Mäntele S, Otway DT, Middleton B, Bretschneider S, Wright J, Robertson MD, Skene DJ, Johnston JD. 2012. Daily rhythms of plasma melatonin, but not plasma leptin or leptin mRNA, vary between lean, obese and type 2 diabetic men. *PLoS One.* 7(5):e37123
205. Maqsood MI, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM. 2013. Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int.* 37(10):1038–45
206. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. 2002. Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes.* 26(11):1407–33
207. Markussen LK, Isidor MS, Breining P, Andersen ES, Rasmussen NE, Petersen LI, Pedersen SB, Richelsen B, Hansen JB. 2017. Characterization of immortalized human brown and white pre-adipocyte cell models from a single donor. *PLoS One.* 12(9):e0185624
208. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, Jingami H, Kawada T, Nakao K. 1995. Human obese gene expression: Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes.* 44(7):855–58
209. Matsumura R, Matsubara C, Node K, Takumi T, Akashi M. 2013. Nuclear receptor-mediated cell-autonomous oscillatory expression of the circadian transcription factor, neuronal PAS domain protein 2 (NPAS2). *J Biol Chem.* 288(51):36548–53
210. Merten OW, Hebben M, Bovolenta C. 2016. Production of lentiviral vectors. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 3:16017
211. Min A, Min H, Hong HC. 2019. Work schedule characteristics and fatigue among rotating shift nurses in hospital setting: An integrative review. *J Nurs Manag.* 27(5):884–95

212. Moinat M, Deng C, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Dulloo AG, Giacobino JP. 1995. Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett.* 373(2):131–34
213. Molchadsky A, Ezra O, Amendola PG, Krantz D, Kogan-Sakin I, Buganim Y, Rivlin N, Goldfinger N, Folgiero V, Falcioni R, Sarig R, Rotter V. 2013. P53 is required for brown adipogenic differentiation and has a protective role against diet-induced obesity. *Cell Death Differ.* 20:774–83
214. Monnier C, Auclair M, Le Cam G, Garcia MP, Antoine B. 2018. The nuclear retinoid-related orphan receptor ROR $\alpha$  controls circadian thermogenic programming in white fat depots. *Physiol Rep.* 6(8):e13678
215. Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat 10.1016/0006-8993(72)90054-6 : Brain Research | ScienceDirect.com. *Brain Res Bull.* 72(900):54–56
216. Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. 2012. Adipose Tissue Biology. In *Adipose Tissue Biology*, Hrsg. ME Symonds, S. 17–32. New York, NY: Springer New York
217. Morin LP. 2013. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol.* 243:4–20
218. Morris CJ, Purvis TE, Mistretta J, Scheer FAJL. 2016. Effects of the internal circadian system and circadian misalignment on glucose tolerance in chronic shift workers. *J Clin Endocrinol Metab.* 101(3):1066–74
219. Morrison S, McGee SL. 2015. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. *Adipocyte.* 4(4):295–302
220. Mössenböck K, Vegiopoulos A, Rose AJ, Sijmonsma TP, Herzig S, Schafmeier T. 2014. Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling. *PLoS One.* 9(10):e110428
221. Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U. 2004. Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell.* 119(5):693–705
222. Nakao R, Nikawa T, Oishi K. 2017. The skeletal muscle circadian clock: current insights. *ChronoPhysiology Ther.* 7:47–57
223. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *AJP Endocrinol Metab.* 293(2):E444–52
224. Nedergaard J, Cannon B. 2013. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 1831(5):943–49
225. Nikanorova AA, Barashkov NA, Nakhodkin SS, Pshennikova VG, Solovyev A V, Romanov GP, Kuzmina SS, Sazonov NN, Burtseva TE, Odland JØ, Fedorova SA. 2020. The role of leptin levels in adaptation to cold climates. *Int J Environ Res Public Health.* 17:1854
226. Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietzschke F. 2012. nparLD: An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data. *J Stat Softw.* 50(12):1–23
227. O’Keefe EP. 2013. Nucleic Acid Delivery: Lentiviral and Retroviral Vectors. *Mater Methods.* 3:
228. Obert R, Onsidine VC, Inha AKS, Ark M, Eiman LH, Tephens HWS, Yce ARN, Oanna J, Hannesian PO, Heryl C, Arco CM, Ee IJMCK, Auer HLB, Osé J, Aro FC, Pharmacology C. 1996. Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 334(5):292–97
229. Obregon M-J. 2014. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front Physiol.* 5:479
230. Oike H, Sakurai M, Ippoushi K, Kobori M. 2015. Time-fixed feeding prevents obesity induced by chronic advances of light/dark cycles in mouse models of jet-lag/shift work. *Biochem Biophys Res Commun.* 465(3):556–61
231. Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N. 1998. Antiphase Circadian Expression between BMAL1 and period Homologue mRNA in the Suprachiasmatic Nucleus and Peripheral Tissues of Rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 203:199–203
232. Ojha S, Budge H, Symonds ME. 2014. Adipocytes in Normal Tissue Biology. In *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, Hrsg. LM McManus, RN Mitchell, S. 2003–13. Elsevier Inc.
233. Oster H, Challet E, Ott V, Arvat E, de Kloet ER, Dijk DJ, Lightman S, Vgontzas A, Van Cauter E. 2017.

- The functional and clinical significance of the 24-hour rhythm of circulating glucocorticoids. *Endocr Rev.* 38(1):3–45
234. Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D, Tian J, Hoffmann MW, Eichele G. 2006. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* 4(2):163–73
235. Otway DT, Frost G, Johnston JD. 2009. Circadian rhythmicity in murine pre-adipocyte and adipocyte cells. *Chronobiol Int.* 26(7):1340–54
236. Otway DT, Mäntele S, Bretschneider S, Wright J, Trayhurn P, Skene DJ, Robertson MD, Johnston JD. 2011. Rhythmic diurnal gene expression in human adipose tissue from individuals who are lean, overweight, and type 2 diabetic. *Diabetes.* 60(5):1577–81
237. Palou M, Priego T, Sánchez J, Rodríguez AM, Palou A, Picó C. 2009. Gene Expression Patterns in Visceral and Subcutaneous Adipose Depots in Rats are Linked to Their Morphologic Features. *Orig Pap Cell Physiol Biochem.* 24:547–56
238. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. 2002. Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell.* 109(3):307–20
239. Park Y-K, Ge K. 2017. Glucocorticoid Receptor Accelerates, but Is Dispensable for, Adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 37(2):e00260-16
240. Paschos GK, Ibrahim S, Song W-L, Kunieda T, Grant G, Reyes TM, Bradfield CA, Vaughan CH, Eiden M, Masoodi M, Griffin JL, Wang F, Lawson JA, Fitzgerald GA. 2012. Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nat Med.* 18(12):1768–77
241. Patke A, Young MW, Axelrod S. 2020. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21(2):67–84
242. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. 2020. Role of leptin in inflammation and vice versa. *Int J Mol Sci.* 21(16):5887
243. Pérez-Pérez A, Toro A, Vilariño-García T, Maymó J, Guadix P, Dueñas JL, Fernández-Sánchez M, Varone C, Sánchez-Margalet V. 2018. Leptin action in normal and pathological pregnancies. *J Cell Mol Med.* 22(2):716–27
244. Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Büning J, Drenckhan M, Zarse K, Ristow M, Lilienthal W, Lehnert H, Klein J. 2010. Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes, Obes Metab.* 12(2):158–66
245. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):45e – 45
246. Pittendrigh CS, Miller HA. 1993. Temporal organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu Rev Physiol.* 55:17–54
247. Poggiogalle E, Jamshed H, Peterson CM. 2018. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metabolism.* 84:11–27
248. Porter C, Herndon DN, Bhattarai N, Ogunbileje JO, Szczesny B, Szabo C, Toliver-Kinsky T, Sidossis LS. 2015. Severe Burn Injury Induces Thermogenically Functional Mitochondria in Murine White Adipose Tissue. *Shock.* 44(3):258–64
249. Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW. 1998. double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell.* 94:83–95
250. Ptitsyn AA, Zvonic S, Conrad SA, Scott LK, Mynatt RL, Gimble JM. 2006. Circadian clocks are resounding in peripheral tissues. *PLoS Comput Biol.* 2(3):126–35
251. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 92(6):829–39
252. Raghov R. 2018. Circadian rhythms of hormone secretion and obesity. *World J Diabetes.* 9(11):195–98
253. Ralph MR, Foster RG, Davis FC. 1990. Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science.* 247:975–78
254. Ramage LE, Akyol M, Fletcher AM, Forsythe J, Nixon M, Carter RN, van Beek EJ, Morton NM, Walker BR, Stimson RH. 2016. Glucocorticoids Acutely Increase Brown Adipose Tissue Activity in

- Humans, Revealing Species-Specific Differences in UCP-1 Regulation. *Cell Metab.* 24(1):130–41
255. Rasmussen MS, Lihn AS, Pedersen SB, Bruun JM, Rasmussen M, Richelsen B. 2006. Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity (Silver Spring)*. 14(1):28–35
256. Rassow J. 2008. Regulation des Energiestoffwechsels. In *Duale Reihe - Biochemie*, Hrsg. J Rassow, R Deutzmann, R Netzker, K Hauser, S. 260–70. Georg Thieme Verlag KG. 2. Aufl.
257. Rassow J. 2008. Abbau von Triacylglycerinen und Ketonkörpern. In *Duale Reihe - Biochemie*, Hrsg. J Rassow, R Deutzmann, R Netzker, K Hauser, S. 123–41. Georg Thieme Verlag KG. 2. Aufl.
258. Rassow J. 2008. ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung. In *Duale Reihe - Biochemie*, Hrsg. J Rassow, R Deutzmann, R Netzker, K Hauser, S. 164–82. Georg Thieme Verlag KG. 2. Aufl.
259. Reddy NL, Tan BK, Barber TM, Randeva HS. 2014. Brown adipose tissue: endocrine determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity. *BMC Obes.* 1(1):13
260. Refinetti R, Menage M. 1992. The Circadian Rhythm of Body Temperature. *Physiol Behav.* 51:613–37
261. Regmi P, Heilbronn LK. 2020. Time-Restricted Eating: Benefits, Mechanisms, and Challenges in Translation. *iScience.* 23(6):101161
262. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL. 2001. NPAS2: An analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science (80- )*. 293:506–9
263. Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. 2020. *Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction*. MDText.com, Inc.
264. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. 2019. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med.* 11:82
265. Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, Schibler U. 2000. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev.* 14(6):679–89
266. Roenneberg T, Merrow M. 2016. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol.* 26(10):R432–43
267. Rong Wan WJ. 2015. It is About Time: Circadian Clock in the Pancreas. *Pancreat Disord Ther.* 05:2
268. Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 15(6):659–67
269. Ross SR, Choy L, Graves RA, Fox N, Soleyjeva V, Klaus S, Ricquier D, Spiegelman BM. 1992. Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:7561–65
270. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, FitzGerald GA. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* 2(11):e377
271. Russell CD, Petersen RN, Rao SP, Ricci MR, Prasad A, Zhang Y, Brolin RE, Fried SK. 1998. Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *Am J Physiol.* 275(3):E507–15
272. Sack RL, Auckley D, Auger RR, Carskadon MA, Wright KP, Vitiello M V., Zhdanova I V. 2007. Circadian rhythm sleep disorders: Part I, basic principles, shift work and jet lag disorders: An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep.* 30(11):1460–83
273. Saely CH, Geiger K, Drexel H. 2012. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* 58(1):15–23
274. Saini C, Morf J, Stratmann M, Gos P, Schibler U. 2012. Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev.* 26(6):567–80
275. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. 2014. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 1842(3):340–51
276. Satish L, Krill-Burger JM, Gallo PH, Etages SD, Liu F, Philips BJ, Ravuri S, Marra KG, LaFramboise WA, Kathju S, Rubin JP. 2015. Expression analysis of human adipose-derived stem cells during in vitro differentiation to an adipocyte lineage. *BMC Med Genomics.* 8:41
277. Sato M, Murakami M, Node K, Matsumura R, Akashi M. 2014. The Role of the Endocrine System in Feeding-Induced Tissue-Specific Circadian Entrainment. *Cell Rep.* 8(2):393–401

278. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 43(4):527–37
279. Satoh Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A. 2006. Time-restricted feeding entrains daily rhythms of energy metabolism in mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 290(5):1276–83
280. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 270(45):26746–49
281. Schibler U, Ripperger J, Brown SA. 2003. Peripheral Circadian Oscillators in Mammals: Time and Food. *J Biol Rhythms*. 18(3):250–60
282. Schmutz I, Ripperger JA, Baeriswyl-Aebischer S, Albrecht U. 2010. The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev*. 24(4):345–57
283. Scott MA, Nguyen VT, Levi B, James AW. 2011. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 20(10):1793–1804
284. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki M a, Beier DR, Spiegelman BM. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 454(7207):961–67
285. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas L, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM. 2008. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab*. 6(1):38–54
286. Seemann J. *Zirkadiane Rhythmen der Adipozytenfunktion*. Med. Diss. Lübeck, 2016
287. Shea SA, Hilton MF, Orlova C, Timothy Ayers R, Mantzoros CS. 2005. Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(5):2537–44
288. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, Van Der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM. 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science (80- )*. 288(5468):1013–19
289. Shostak A. 2017. Circadian Clock, Cell Division, and Cancer: From Molecules to Organism. *Int J Mol Sci*. 18(4):873
290. Shostak A, Husse J, Oster H. 2013. Circadian regulation of adipose function. *Adipocyte*. 2(4):201–6
291. Shostak A, Meyer-Kovac J, Oster H. 2013. Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues. *Diabetes*. 62(7):2195–2203
292. Si Y, Palani S, Jayaraman A, Lee K. 2007. Effects of forced uncoupling protein 1 expression in 3T3-L1 cells on mitochondrial function and lipid metabolism. *J Lipid Res*. 48(4):826–36
293. Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, B??rsheim E, Radhakrishnan RS, Chao T, Ali A, Chondronikola M, Mlcak R, Finnerty CC, Hawkins HK, Toliver-Kinsky T, Herndon DN. 2015. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab*. 22(2):219–27
294. Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN. 1996. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*. 382(6594):810–13
295. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF. 1996. Evidence of free and bound leptin in human circulation: Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest*. 98(6):1277–82
296. Siwicki KK, Eastman C, Petersen G, Rosbash M, Hall JC. 1988. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron*. 1:141–50
297. Smalley RL, Dryer RL. 1963. Brown Fat: Thermogenic Effect during Arousal from Hibernation in the Bat. *Science (80- )*. 140(3573):1333–34
298. Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS. 1999. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 274(18):12632–41
299. Smas CM, Kachinskas D, Liu C-M, Xie X, Dircks LK, Sul HS. 1998. Transcriptional Control of the pref-1 Gene in 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem*. 273(48):31751–58
300. Smas CM, Sul HS. 1993. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. 73(4):725–34

301. Smith RE, Hock RJ. 1963. Brown fat: Thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science (80- )*. 140(3563):199–200
302. So AY-L, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ. 2009. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci*. 106(41):17582–87
303. Soleimani M, Kenarkoochi A, Bamdad T, Soleimanjahi H, Estiri H, Hadi Razavi-Nikoo M. 2014. Efficient Lentiviral Transduction of Adipose Tissue-Derived Mouse Mesenchymal Stem Cells and Assessment of Their Penetration in Female Mice Cervical Tumor Model. *Iran J Cancer Prev*. 7(4):225–31
304. Song C, Wang J, Kim B, Lu C, Zhang Z, Liu H, Kang H, Sun Y, Guan H, Fang Z, Li F. 2018. Insights into the Role of Circadian Rhythms in Bone Metabolism: A Promising Intervention Target? *Biomed Res Int*. 2018:9156478
305. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 453(7196):783–87
306. Spiegelman BM, Frank M, Green H. 1983. Molecular Cloning of mRNA from 3T3 Adipocytes. *J Biol Chem*. 258(16):10083–89
307. Stephan FK, Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69(6):1583–86
308. Su Y, Van Der Spek R, Foppen E, Kwakkel J, Fliers E, Kalsbeek A. 2015. Effects of adrenalectomy on daily gene expression rhythms in the rat suprachiasmatic and paraventricular hypothalamic nuclei and in white adipose tissue. *Chronobiol Int*. 32(2):211–24
309. Sukumaran S, Xue B, Jusko WJ, Dubois DC, Almon RR. 2010. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. *Physiol Genomics*. 42A(2):141–52
310. Szalay AA, Greer LF. 2002. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*. 17:1–32
311. Tahara Y, Shibata S. 2016. Circadian rhythms of liver physiology and disease: Experimental and clinical evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 13(4):217–26
312. Takeda Y, Jothi R, Birault V, Jetten AM. 2012. ROR $\gamma$  directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo. *Nucleic Acids Res*. 40(17):8519–35
313. Takeda Y, Kang HS, Angers M, Jetten AM. 2011. Retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$  directly regulates neuronal PAS domain protein 2 transcription in vivo. *Nucleic Acids Res*. 39(11):4769–82
314. Team RDC, R Development Core Team R. 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found Stat Comput*
315. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B. 2007. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(11):4401–6
316. Tonetti L, Erbacci A, Fabbri M, Martoni M, Natale V. 2013. Effects of transitions into and out of daylight saving time on the quality of the sleep/wake cycle: An actigraphic study in healthy university students. *Chronobiol Int*. 30(10):1218–22
317. Torres N, Vargas-Castillo AE, Tovar AR. 2016. Adipose Tissue: White Adipose Tissue Structure and Function. In *Encyclopedia of Food and Health*, Hrsg. B Caballero, PM Finglas, F Toldrá, S. 35–42. Elsevier Ltd
318. Trayhurn P, Thomas MEA, Duncan JS, Vernon Rayner D. 1995. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett*. 368(3):488–90
319. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science (80- )*. 308(5724):1043–45
320. Tuvia N, Pivovarova-Ramich O, Murahovschi V, Lück S, Grudziecki A, Ost AC, Kruse M, Nikiforova VJ, Osterhoff M, Gottmann P, Gögebakan Ö, Sticht C, Gretz N, Schupp M, Schürmann A, Rudovich N, Pfeiffer AFH, Kramer A. 2021. Insulin Directly Regulates the Circadian Clock in Adipose Tissue.

- Diabetes*. 70(9):1985–99
321. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. 2002. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*. 418:534–39
  322. Ulhôa MA, Marqueze EC, Burgos LGA, Moreno CRC. 2015. Shift work and endocrine disorders. *Int J Endocrinol*. 2015:1–11
  323. Van den Berg MJ, Signal TL, Gander PH. 2020. Fatigue risk management for cabin crew: The importance of company support and sufficient rest for work-life balance—a qualitative study. *Ind Health*. 58(1):2–14
  324. Van den Berg R, Kooijman S, Noordam R, Ramkisoensing A, Abreu-Vieira G, Tambyrajah LL, Dijk W, Ruppert P, Mol IM, Kramar B, Caputo R, Puig LS, de Ruiter EM, Kroon J, Hoekstra M, van der Sluis RJ, Meijer OC, Willems van Dijk K, van Kerkhof LWM, Christodoulides C, Karpe F, Gerhart-Hines Z, Kersten S, Meijer JH, Coomans CP, van Heemst D, Biermasz NR, Rensen PCN. 2018. A Diurnal Rhythm in Brown Adipose Tissue Causes Rapid Clearance and Combustion of Plasma Lipids at Wakening. *Cell Rep*. 22:3521–33
  325. Van Den Beukel JC, Grefhorst A, Quarta C, Steenbergen J, Mastroberardino PG, Lombés M, Delhanty PJ, Mazza R, Pagotto U, Van Der Lely AJ, Themmen APN. 2014. Direct activating effects of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on brown adipose tissue are attenuated by corticosterone. *FASEB J*. 28(11):4857–67
  326. Van der Lans AAJJ, Hoeks J, Brans B, Vijgen GHEJ, Visser MGW, Vosselman MJ, Hansen J, Jorgensen JA, Wu J, Mottaghy FM, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. 2013. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest*. 123(8):3395–3403
  327. Van der Spek R, Fliers E, la Fleur SE, Kalsbeek A. 2018. Daily gene expression rhythms in rat white adipose tissue do not differ between subcutaneous and intra-abdominal depots. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9:206
  328. Vargas-Castillo A, Fuentes-Romero R, Rodriguez-Lopez LA, Torres N, Tovar AR. 2017. Understanding the Biology of Thermogenic Fat: Is Browning A New Approach to the Treatment of Obesity? *Arch Med Res*. 48(5):401–13
  329. Vaudry H, Challet E, Kalsbeek A. 2017. Circadian Rhythms and Metabolism. *Editor Circadian Rhythm Metab Front Endocrinol*. 8:201
  330. *Venn Diagram Maker Online*. <https://www.meta-chart.com/venn>
  331. Vera M, Pani B, Griffiths LA, Muchardt C, Abbott CM, Singer RH, Nudler E. 2014. The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. *Elife*. 3:e03164
  332. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N-J, Enerbäck S, Nuutila P. 2009. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med*. 360(15):1518–25
  333. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. 2012. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res*. 53(4):619–29
  334. Vitiello M V., Smallwood RG, Avery DH, Pascualy RA, Martin DC, Prinz PN. 1986. Circadian temperature rhythms in young adult and aged men. *Neurobiol Aging*. 7(2):97–100
  335. Voshall LB, Price JL, Sehgal A, Saez L, Young MW. 1994. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science (80- )*. 263:1606–9
  336. Wagner I V, Perwitz N, Drenckhan M, Lehnert H, Klein J. 2011. Cannabinoid type 1 receptor mediates depot-specific effects on differentiation, inflammation and oxidative metabolism in inguinal and epididymal white adipocytes. *Nutr Diabetes*. 1:e16
  337. Wang J, Lazar MA. 2008. Bifunctional Role of Rev-erb in Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol*. 28(7):2213–20
  338. Wang Z V, Scherer PE. 2016. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol*. 8(2):93–100
  339. Wang Y, Kim K-A, Kim J-H, Sul HS. 2006. Pref-1, a Preadipocyte Secreted Factor That Inhibits Adipogenesis. *Journal Nutr*. 136:2953–2956
  340. Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G. 1997. Jet-lag. *Lancet*. 350:1611–16

341. Welsh DK, Imaizumi T, Kai SA. 2005. Real-Time Reporting of Circadian-Regulated Gene Expression by Luciferase Imaging in Plants and Mammalian Cells. *Methods Enzymol.* 393:269–88
342. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. 1995. Individual Neurons Dissociated from Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Independently Phased Circadian Firing Rhythms. *Neuron.* 14:697–706
343. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. 2001. Hypoadiponection in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(5):1930–35
344. Whitehead A, Krause FN, Moran A, MacCannell ADV, Scragg JL, McNally BD, Boateng E, Murfitt SA, Virtue S, Wright J, Garnham J, Davies GR, Dodgson J, Schneider JE, Murray AJ, Church C, Vidal-Puig A, Witte KK, Griffin JL, Roberts LD. 2021. Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis. *Nat Commun.* 12(1):1905
345. Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, Wang X, Fleischer JG, Navlakha S, Panda S, Taub PR. 2020. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 31(1):92-104.e5
346. Woon PY, Kaisaki PJ, Bragança J, Bihoreau MT, Levy JC, Farrall M, Gauguier D. 2007. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(36):14412–17
347. Wronska A, Kmiec Z. 2012. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.* 205(2):194–208
348. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, Khandekar M, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. 2012. Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell.* 150(2):366–76
349. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. 2013. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes Dev.* 27(3):234–50
350. Wu X, Zvonic S, Floyd ZE, Kilroy G, Goh BC, Hernandez TL, Eckel RH, Mynatt RL, Gimble JM. 2007. Induction of circadian gene expression in human subcutaneous adipose-derived stem cells. *Obesity.* 15(11):2560–70
351. Wuarin J, Schibler U. 1990. Expression of the Liver-Enriched Transcriptional Activator Protein DBP Follows a Stringent Circadian Rhythm. *Cell.* 63:1257–66
352. Wuarin JE, Falvey E, Lavery D, Talbot D, Schmidt ED, Ossipow V, Fonjallaz P, Schibler U. 1992. The role of the transcriptional activator protein DBP in circadian liver gene expression. *J Cell Sci.* 16:123–27
353. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. 2000. Role of DBP in the Circadian Oscillatory Mechanism. *Mol Cell Biol.* 20(13):4773–81
354. Yamajuku D, Inagaki T, Haruma T, Okubo S, Kataoka Y, Kobayashi S, Ikegami K, Laurent T, Kojima T, Noutomi K, Hashimoto S, Oda H. 2012. Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci Rep.* 2:439
355. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi RI, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science (80- ).* 288(5466):682–85
356. Yamazaki S, Takahashi JS. 2005. Real-Time Luminescence Reporting of Circadian Gene Expression in Mammals. *Methods Enzymol.* 393:288–301
357. Yan J, Wang H, Liu Y, Shao C. 2008. Analysis of gene regulatory networks in the mammalian circadian rhythm. *PLoS Comput Biol.* 4(10):1000193
358. Yanagihara H, Ando H, Hayashi Y, Obi Y, Fujimura A. 2006. High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues. *Chronobiol Int.* 23(5):905–14
359. Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM. 2006. Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. *Cell.* 126(4):801–10
360. Yoo S-H, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song E -j., Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, Takahashi

- JS. 2005. A noncanonical E-box enhancer drives mouse *Period2* circadian oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 102(7):2608–13
361. Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong H-K, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. 2004. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(15):5339–46
362. Yoshitane H, Asano Y, Sagami A, Sakai S, Suzuki Y, Okamura H, Iwasaki W, Ozaki H, Fukada Y. 2019. Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms. *Commun Biol*. 2:300
363. Young P, Arch JRS, Ashwell M. 1984. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett*. 167(1):10–14
364. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F. 2012. FAT SIGNALS - Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*. 15(3):279–91
365. Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M, Hall JC. 1984. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell*. 39:369–376
366. Zhang F, Li W, Li H, Gao S, Sweeney JA, Jia Z, Gong Q. 2020. The effect of jet lag on the human brain: A neuroimaging study. *Hum Brain Mapp*. 41(9):2281–91
367. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. 2014. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci*. 111(45):16219–24
368. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425–32
369. Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC, Mynatt RL, Gimble JM. 2006. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes*. 55(4):962–70

## 7 ANHANG

### 7.1 Ct-Werte der *Leptin*- und *Ucp1*-Expression in Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Tabelle 20: Ct-Werte Leptin und Ucp1-Expression in Prä- und reifen Adipozyten

IWAT			EWAT		
Differenzierung	Ct-Wert <i>Leptin</i>	Ct-Wert <i>Ucp1</i>	Differenzierung	Ct-Wert <i>Leptin</i>	Ct-Wert <i>Ucp1</i>
Pre_1	38,32	35,82	Pre_1	36,78	35,05
Pre_2	36,16	36,49	Pre_2	34,80	34,60
Pre_3	36,15	36,32	Pre_3	35,07	35,11
Tag 6_1	26,03	32,06	Tag 5_1	30,09	24,77
Tag 6_2	25,56	32,01	Tag 5_2	29,82	24,66
Tag 6_3	26,06	32,34	Tag 5_3	30,28	24,82

BAT		
Differenzierung	Ct-Wert <i>Leptin</i>	Ct-Wert <i>Ucp1</i>
Pre_1	35,50	35,03
Pre_2	37,00	34,40
Pre_3	35,63	34,76
Tag 6_1	27,54	29,38
Tag 6_2	26,50	28,00
Tag 6_3	26,92	28,17

## 7.2 Amplitudenänderung der Uhrgene in mit Dexamethason synchronisierten Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe

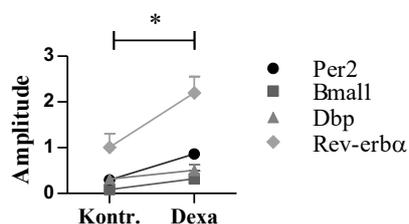


Abbildung 22: Amplituden der zirkadianen Rhythmen von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-erba* in nicht- und synchronisierten Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe

Gruppierte Darstellung der Amplituden von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-erba* als Mittelwert  $\pm$  SEM (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.3.3);  $n = 3$ . \* - signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ; nicht parametrische Varianzanalyse vom ANOVA-Typ, rankFD-Paket, R)

## 7.3 Ergebnisse der JTK\_Cycle-Analyse und Amplituden der Uhrgenenexpression im Zeitprofil von Prä- und reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Tabelle 21: Kontroll-Zeitprofil-Analyse für Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe

Gen	Zirkadian rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude
<i>Per2</i>	Ja	0,005	21	8	0,29
<i>Bmal1</i>	Ja	< 0,001	26	0	0,08
<i>Dbp</i>	Ja	< 0,001	21	10,5	0,31
<i>Rev-erba</i>	Ja	< 0,001	21	5,5	1,01
<i>Npas2</i>	Nein	0,34	28	23	-
<i>Clock</i>	Nein	0,18	20	12,5	-

Tabelle 22: Zeitprofil-Analyse für Prä-Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe (pIWAT)

Gen	Zirkadian rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude
<i>Per2</i>	Ja	< 0,001	23	15,5	2,87
<i>Bmal1</i>	Ja	0,03	22	3,5	0,28
<i>Dbp</i>	Ja	< 0,001	25	15	0,43
<i>Rev-erba</i>	Ja	< 0,001	23	9	0,91
<i>Npas2</i>	Nein	0,06	24	7	-
<i>Clock</i>	Nein	0,17	24	12	-

Tabelle 23: Zeitprofil-Analyse für reife Adipozyten aus inguinalem Fettgewebe (mIWAT)

Gen	Zirkadian rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude
<i>Per2</i>	Ja	< 0,001	24	12	25,93
<i>Bmal1</i>	Ja	0,002	23	20,5	1,85
<i>Dbp</i>	Ja	0,004	24	9,5	16,51
<i>Rev-erba</i>	Ja	< 0,001	22	6	16,46
<i>Npas2</i>	Ja	< 0,001	23	20,5	234,59
<i>Clock</i>	Ja	0,02	23	18	2,46

Tabelle 24: Zeitprofil-Analyse für Prä-Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe (pEWAT)

Gen	Zirkadian rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude
<i>Per2</i>	Ja	< 0,001	25	15	0,86
<i>Bmal1</i>	Ja	< 0,001	22	0	0,32
<i>Dbp</i>	Ja	< 0,001	24	12	0,51
<i>Rev-erba</i>	Ja	< 0,001	22	8,5	2,20
<i>Npas2</i>	Ja	< 0,001	20	5	0,29
<i>Clock</i>	Nein	0,19	20	2,5	-

Tabelle 25: Zeitprofil-Analyse für reife Adipozyten aus epididymalem Fettgewebe (mEWAT)

Gen	Zirkadian rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude
<i>Per2</i>	Ja	< 0,001	25	15	2,68
<i>Bmal1</i>	Ja	< 0,001	23	0	1,26
<i>Dbp</i>	Ja	< 0,001	26	10,5	1,79
<i>Rev-erba</i>	Ja	< 0,001	23	9	4,05
<i>Npas2</i>	Ja	< 0,001	24	0	2,97
<i>Clock</i>	Nein	0,33	21	18,5	-

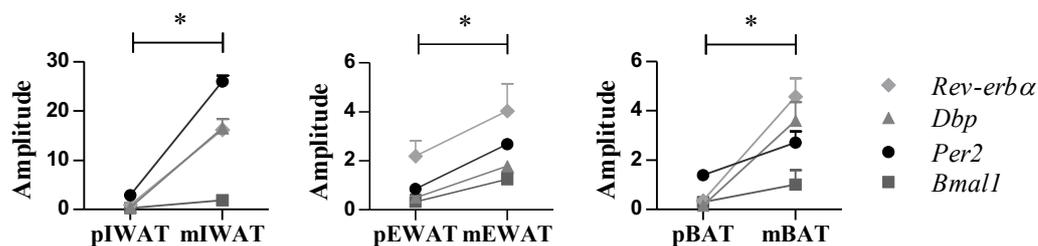
Tabelle 26: Zeitprofil-Analyse für Prä-Adipozyten aus braunem Fettgewebe (pBAT)

Gen	Zirkadian rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude
<i>Per2</i>	Ja	< 0,001	23	15,5	1,39
<i>Bmal1</i>	Ja	< 0,001	22	3,5	0,30
<i>Dbp</i>	Ja	< 0,001	22	14,5	0,16
<i>Rev-erba</i>	Ja	< 0,001	24	12	0,37
<i>Npas2</i>	Nein	0,25	27	3,5	-
<i>Clock</i>	Ja	0,02	26	3	0,28

Tabelle 27: Zeitprofil-Analyse für reife Adipozyten aus braunem Fettgewebe (mBAT)

Gen	Zirkadian rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]	Amplitude
<i>Per2</i>	Ja	< 0,001	26	13	2,72
<i>Bmal1</i>	Ja	< 0,001	23	0	1,01
<i>Dbp</i>	Ja	< 0,001	22	11	3,59
<i>Rev-erba</i>	Ja	< 0,001	26	8	4,58
<i>Npas2</i>	Ja	< 0,001	26	23,5	13,37
<i>Clock</i>	Nein	0,34	28	23	-

#### 7.4 Amplitudenänderung der Uhrengenenexpressionsrhythmik in reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Abbildung 23: Amplituden der zirkadianen Rhythmen von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-erba* vor und nach der Differenzierung in IWAT, EWAT und BAT

Gruppierte Darstellung der Amplituden von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp* und *Rev-erba* als Mittelwert  $\pm$  SEM (Abschnitt 3.2.3);  $n = 3$ . \* - signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ; nicht parametrische Varianzanalyse vom ANOVA-Typ, rankFD-Paket, R)

## 7.5 Auswertung der Uhrengenenexpressionsänderung in Prä- und reifen Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT

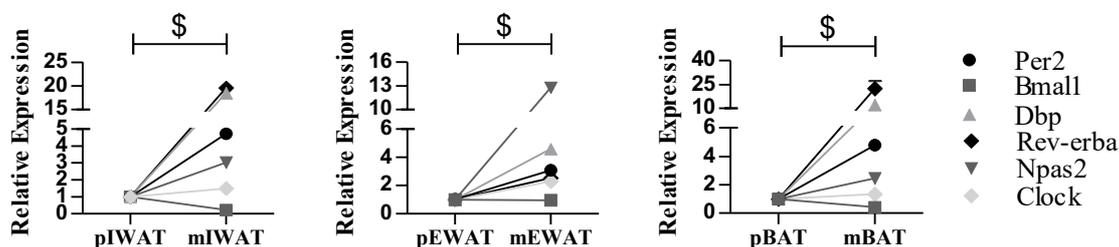


Abbildung 24: Uhrengenenexpression in unsynchronisierten Prä- und reifen Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT

Relative Uhrengenenexpression von *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Npas2* und *Clock* (Daten aus Abbildung 19) in Prä- und reifen Adipozyten in IWAT, EWAT und BAT; n = 3 pro Gen und Kondition. \$ - signifikanter Anstieg der Expression ( $p < 0,05$ , modifizierte Statistik nach dem ANOVA-Typ für nicht-parametrische Daten, nparLD-Paket, R).

## 7.6 JTK\_Cycle-Analyse der *Lep*-, *Adipoq*- und *Ucp1*-Expression im Zeitprofil in reifen Adipozyten aus inguinalem, epididymalem und braunem Fettgewebe

Tabelle 28: JTK\_Cycle-Analyse für mRNA-Profile von Adipokinen und UCP1 in reifen Adipozyten aus IWAT, EWAT und BAT

Gen	Zirkadian Rhythmisch?	p-Wert	Periode [h]	Phase [h]
<b>mIWAT</b>				
<i>Leptin</i>	Nein	0,20	23	15,5
<i>Adiponectin</i>	Ja	< 0,001	24	16,5
<i>Ucp1</i>	Ja	< 0,001	27	11
<b>mEWAT</b>				
<i>Leptin</i>	Ja	0,03	26	3
<i>Adiponectin</i>	Nein	0,08	27	8,5
<i>Ucp1</i>	Nein	1,00	24	14,25
<b>mBAT</b>				
<i>Leptin</i>	Nein	0,31	27	3,5
<i>Adiponectin</i>	Nein	0,69	26	23,5
<i>Ucp1</i>	Nein	0,15	26	3

## 8 DANKSAGUNG

„ZUM GLÜCKLICHSEIN GIBT ES NUR EINEN SCHLÜSSEL. DIE DANKBARKEIT“

– ERNST FESTEL

In diesem Sinne gilt es nun von ganzem Herzen Danke zu sagen. Danke an all diejenigen, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet haben. Angefangen bei meiner Familie und meinen Freunden: Ihr habt mich bis hierhin unterstützt, bestärkt und seid mit mir durch Höhen und Tiefen gegangen. Dank geht an meinem Mann Sandro, der von Anfang an dabei war, zahlreiche Mikroskopiebilder von differenzierenden Adipozyten anschauen musste, Tränen getrocknet und Euphoriestürme ausgehalten hat. Danke, dass du mich nicht nur immer wieder an meine Doktorarbeit erinnert, sondern mir vor allem für die Fertigstellung den Rücken freigehalten und gestärkt hast. Danke Alex für das Korrekturlesen dieser Abschrift.

Liebes Chronophysiologie-Team! Vielen Dank, dass ihr mich aufgenommen, in die Laborarbeit eingeführt und mich den gesamten Weg begleitet habt. Es ist kein Geheimnis, dass mir die Zeit bei und mit euch sehr gut gefallen hat und ihr mir sehr ans Herzen gewachsen seid. Ihr habt die Zeit im Labor unvergesslich gemacht. Thank you, Anthony to help me understand transfection and for your support and help understanding cell culture! Danke an die besten Bürokollegen der Welt, speziell geht der Dank an Isa H., Mariana, Brinja, Violetta, Xenia und Jana für die mentale und fachliche Unterstützung und die tolle Zeit außerhalb der Labormauern! Ein großes Dankeschön geht an meine Betreuerin Isa K., die diese Arbeit und mich von Anfang bis Ende betreute. Danke für deine Hilfe, Kritik, deine Gedanken und für die Korrekturarbeiten dieser Abschrift. Dank geht auch an Nina Perwitz und Lisa Cherradi für die Einführung in die faszinierende Welt der Adipozytenzellkultur, die Bereitstellung der Zellen, sowie die Tipps und Tricks im Umgang mit ihnen. Außerdem gilt mein Dank der deutschen Forschungsgesellschaft für die Unterstützung dieser Dissertation durch das Stipendium und die Teilnahme am Graduiertenkolleg 1957 Adipose-Brain Crosstalk. Die Teilnahme am GRK ermöglichte mir einen tieferen Einblick in die wissenschaftliche Welt abseits meiner Promotionsarbeit.

Zuletzt geht spezieller Dank an meinen Doktorvater Henrik Oster. Über sieben Jahre ist es nun her, dass ich begeistert in der Vorlesung zum Thema „Inneren Uhr“ saß. Im März 2015 ging es dann offiziell los. So möchte ich nicht nur für die Bereitsstellung des Themas, der Materialien und Räume danken, sondern vor allem für das geistige Mentorat, das zur Entstehung dieser Arbeit notwendig war. Danke, dass du mir die Chance gegeben hast, mit Zellen zu arbeiten und mich dann durch die damit einhergehenden produktiven und teils anstrengenden Zeiten im Labor und am Schreibtisch weiter bestärkt hast! Es war mir eine große Ehre mit dir als meinem Doktorvater zusammenzuarbeiten.