

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DEFIZIENZ DER c-JUN N-TERMINALEN KINASE UND DAS
METABOLISCHE SYNDROM**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

TIM FREDERICK HAB

aus Donauwörth

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Herdegen

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hampe

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.07.2009

Inhaltsangabe

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK)	1
1.1.1 Aktivatoren von JNK	2
1.1.2 Funktion der JNK	4
1.1.3 JNK Funktion in vivo	4
1.2 Verknüpfung der JNK mit dem Metabolischen Syndrom	6
1.2.1 JNK1, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2	6
1.2.2 Komponenten des Metabolischen Syndroms	7
1.2.3 Blutwerte des Lipidmetabolismus	8
1.2.4 Adiponektin	8
1.3 Fragestellung	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Tierhaltung und Zucht	10
2.2 Wiegen der Mäuse	11
2.3 Lösungen und Reagenzien	11
2.4 Durchführung der Gewebegewinnung	12
2.4.1 Narkotisierung	12
2.4.2 Blutentnahme (BE) und Tötung	12
2.4.3 Perfusion	12
2.4.4 Organentnahme	13
2.4.5 Aufarbeitung des Blutes	13
2.4.6 Histologie	13
2.5 Morphometrie	14
2.5.1 Längenbestimmung	14
2.5.2 Fettschichtdicke	14
2.5.3 Organgewichte	14
2.5.4 Fettzellenvermessung	14
2.6 Statistik	14
2.7 Material und Methoden des Anhangs	15
2.7.1 Real-time-PCR des Leber- und Fettgewebes	15

2.7.2	Vorbereitung der RNA und first strand cDNA Synthese	15
2.7.3	Quantitative Real-time-PCR	15
2.7.4	Plasmaanalyse	15
3	Ergebnisse	16
3.1	Gewichte	16
3.1.1	Gewichtsentwicklung	16
3.1.2	Aussehen und Größe	17
3.1.3	Gewicht zum Sektionszeitpunkt	18
3.2	Fettgewebe	20
3.2.1	Verteilung des Fettgewebes	20
3.2.2	Fettzellgrößen	21
3.3	Organveränderung	24
3.3.1	Organgewichte	24
3.3.2	Fettleber	25
3.3.3	Atherosklerose	26
4	Diskussion	27
4.1	Primärdaten	27
4.2	Morphometrie	27
4.3	Gewichtsentwicklung und Fettgewebe	28
4.4	Fettzellvergrößerung: JNK2/3 ^{-/-} oder Adipositas vermittelt?	29
4.5	Leberzellverfettung und Fettleibigkeit	29
4.6	Kein Schutz vor Atherosklerose durch JNK2/3 ^{-/-} Genotyp	29
5	Zusammenfassung und Ausblick	31
6	Anhang	33
6.1	Ergebnisse der Analyse von Fettgewebe, Leberparenchym und Serum	33
6.1.1	Expressionsmuster des weißen Fettgewebes	33
6.1.1.1	Glukosetransporter 4 (Glut4)	33
6.1.1.2	Adiponektin	33
6.1.1.3	Fettsäuresynthese (FAS)	33
6.1.1.4	Adipose Triglyceride-Lipase (ATGL)	34

6.1.1.5	Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor Gamma (PPAR γ)	34
6.1.2	Expressionsmuster der Leber	36
6.1.2.1	Kohlenhydratstoffwechsel der Leber	36
6.1.2.2	Fettstoffwechsel der Leber	36
6.1.3	Blutanalyse	37
6.1.3.1	Insulin	37
6.1.3.2	Triglyzeride und freie Fettsäuren	38
6.1.3.3	Gesamtcholesterin	40
6.2	Diskussion der Ergebnisse vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung	40
6.2.1	Insulinresistenz des Fettgewebes	41
6.2.2	Fragliche Insulinresistenz in der Leber	41
6.2.3	Blutwerte	42
7	Literaturverzeichnis	45
8	Abkürzungsverzeichnis	57
9	Abbildungsverzeichnis	58
10	Tabellenverzeichnis	59
11	Danksagung	60
12	Lebenslauf	61

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit baut auf der Beobachtung der Arbeitsgruppe Herdegen auf, dass der genetische Knockout des JNK2 und JNK3 Gens bei C57BL/6 Mäusen ($JNK2/3^{-/-}$) zu ausgeprägter Adipositas führt. Deshalb wurden die $JNK2/3^{-/-}$ Mäuse auf Gewichtsveränderung, Veränderung der Organe und Blutparameter hin untersucht.

1.1 c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK)

Die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) - auch SAPK (stress-activated MAP kinase) genannt - gehört zur Familie der MAP Kinasen (mitogen activated protein kinases). Die Unterformen JNK1, JNK2 und JNK3 werden durch drei verschiedene Gene kodiert. Bei Mäusen liegt das kodierende Gen für JNK1 auf Chromosom 14 B, für JNK2 auf Chromosom 11 B1.3 und für JNK3 auf Chromosom 5. Die korrespondierenden Stellen im humanen Genom sind 10q11.22, 5q35 und 4q21.3 (Bogoyevitch, 2006). Die Abbildung 1 verdeutlicht die räumliche Struktur am Beispiel von JNK3.

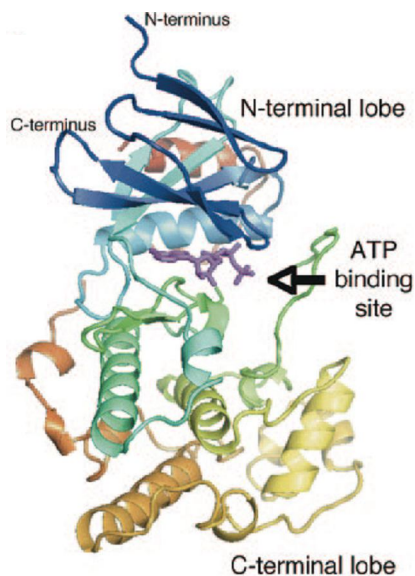


Abb. 1 JNK Struktur

Aufbau der JNK am Beispiel der Kristallstruktur von JNK3. Die Struktur ist in Form einer farbigen Schleife dargestellt, die am N-Terminus mit blau beginnt und über grün und gelb zum roten C-Terminus verläuft. Das dem ATP analoge Adenylylimidodiphosphat ist durch violette Striche gekennzeichnet (aus Xie et al., 1998).

Durch alternatives Splicing entstehen zehn Isoformen mit einem Molekulargewicht von 46 kDa bis 54 kDa. Die Namensgebung erfolgt entsprechend ihrer Spleißform und Position im Mausegenom (Kyriakis et al., 1994; Gupta et al., 1996) (Abb. 2).

Die drei Isoformen werden im Organismus in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Während JNK1 und JNK2 im Körper ubiquitär vorkommen, wird JNK3 nur im Herz, Hirn und im Hoden exprimiert (Davis, 2000).

1.1.1 Aktivatoren von JNK

Der JNK Signalweg wird unter anderem durch extrazelluläre Stressfaktoren wie UV-Strahlung (Pulverer et al., 1991), Hyperosmolarität (Bogoyevitch et al., 1995), Hitzeschock (Adler et al., 1995) und Lipotoxizität (Solinas et al., 2006) aktiviert. Weitere Faktoren, die aktivierend auf den JNK Signalweg wirken, sind die proinflammatorischen Zytokine TNF- α (Dong et al., 2002) und Interleukin 1 β (IL 1 β), sowie Aktivierung des Toll-like Rezeptors (Bachar et al., 2004). Zu den intrazellulären Aktivatoren zählt z.B. Stress des endoplasmatischen Retikulums. Störungen in der Proteinentstehung und -faltung im endoplasmatischen Retikulum (ER) resultieren in ER-Stress, welcher wiederum zu einer JNK Aktivierung führt. Dies geschieht durch Aktivierung der ER-Stress-Transmembran-Sensorproteinkinase (IRE), gefolgt von dem Adapterprotein TNF Rezeptor assoziiertem Faktor 2 (TRAF2) und der Apoptosesignal regulierenden Kinase (ASK) (Urano et al., 2000).

Der Signalweg der extrazellulären Stimulation umfasst die Aktivierung von mehreren kleinen G-Proteinen und Adapterproteinen, gefolgt von einer Proteinkinase Kaskade. Diese Kinasekaskade besteht aus mehreren Mitgliedern der MAPK-Kinase-Kinasefamilie (wie die mitogen activated protein kinase kinase [MEKK], hematopoietic progenitor kinase [HPK], der mixed-lineage kinase [MLK], transforming growth factor β -activated kinase [TAK] und ASK) (Davis, 2000).

Die gemeinsame Endstrecke der Kaskaden der intra- und extrazellulären Stimuli besteht aus den MAPK Kinasen MKK4 sowie MKK7 und führt zur JNK Aktivierung (Davis, 2000). Eine schematische Darstellung des JNK Aktivierungsweges erfolgt in der Abb. 2.

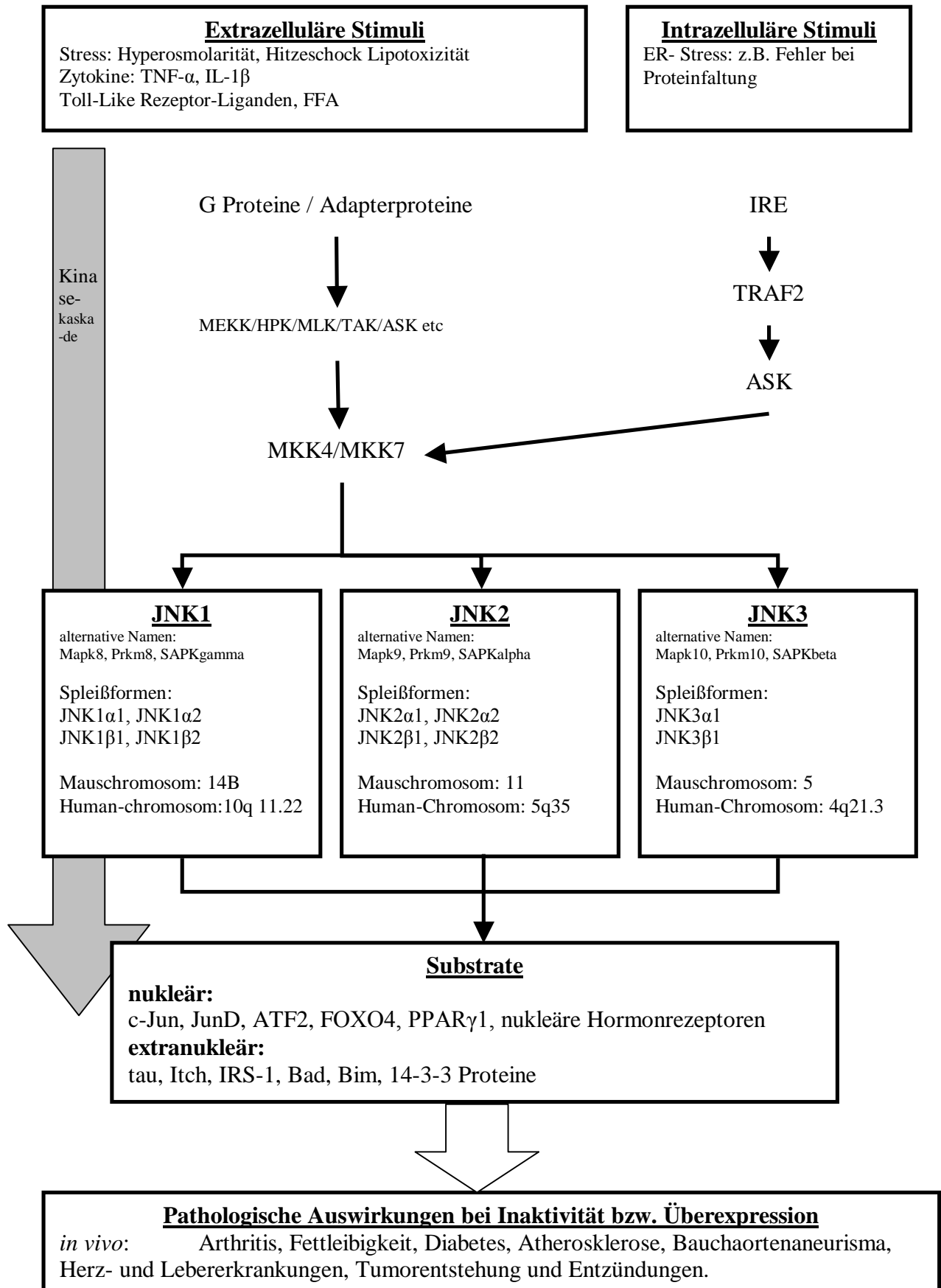


Abb. 2 Darstellung des JNK Signalwegs

1.1.2 Funktion der JNK

JNK wirken auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Dem Namen entsprechend phosphorylieren sie die Transaktivierungsdomäne von c-Jun (Pulverer et al., 1991; Dérijard et al., 1994) und potenzieren damit die c-Jun Transkriptionsaktivität durch Verlust der Repression vermittelnden Histondeacetylase 3 (Weiss et al., 2003). Zudem gibt es noch weitere Substrate, welche in nukleäre und extranukleäre Substrate unterteilt werden. Diese können durch die JNK aktiviert oder auch gehemmt werden.

Zu den nukleären Substraten gehören Proteine wie z.B. die Transkriptionsfaktoren JunD und ATF2 des AP-1 Transkriptionskomplexes (Ip & Davis, 1998), der Transkriptionsfaktor FOXO4 (Essers et al., 2004) sowie PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox factor-1, Kaneto et al., 2002). Weitere Substrate der JNK sind kernständige Hormonrezeptoren wie der Peroxisomenproliferator aktivierte Rezeptor γ , der Glukokortikoidrezeptor und der Retinolsäurerezeptor (Camp et al., 1999; Rogatsky et al., 1998; Srinivas et al., 2005).

Zu den nicht-nukleären Substraten zählen das mikrotubuliassoziierte Protein tau (Yoshida H et al., 2004), zytosolische Proteine wie die E3 Ligase Itch (Gao et al., 2004) und das Insulinrezeptor-Dockingprotein Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) (Aguirre et al., 2000). Die mitochondrialen Proteine, Mitglieder der Bcl Familie, Bad und Bim gehören ebenfalls zu diesen nicht-nukleären Substraten (Yu et al., 2004; Putcha et al., 2003).

Zusätzlich antagonisieren JNK durch Phosphorylierung der 14-3-3 Adapterproteingruppe die Akt-vermittelten Überlebenssignale (Sunayama et al., 2005) und führen zur Translokation von Abl im Zellkern (Yoshida K et al., 2005) und von Bax im Mitochondrium (Tsuruta et al., 2004).

1.1.3 JNK Funktionen *in vivo*

Die bei Experimenten beobachteten Funktionen der JNK *in vivo* sind vielfältig. JNK sind an Krankheitsbildern wie Arthritis, Fettleibigkeit, Diabetes und Atherosklerose beteiligt und wirken an der Pathogenese von Bauchortenaneurismata, Herz- und Lebererkrankungen sowie Tumorentstehung mit (vgl. Tabelle 1).

Des Weiteren sind sie für eine Vielzahl von komplexen Prozessen im zentralen Nervensystem (Brecht et al., 2004) verantwortlich, diese werden in dieser Arbeit aber nicht weiter verfolgt.

Veränderung JNK	Parameter	Modell	Referenz	
JNK 1^{-/-}	Gewicht ↓	C57BL/6 Maus (hoch kalorische und fettreiche Kost)	Hirosumi et al., 2002	
	Fettzelldurchmesser ↓			
	Subkutanes Fettdepot ↓			
	Plasma: Triglyzeride → Freie Fettsäuren → Cholesterin →	C57BL/6 Maus		
	Adiponektin ↑			
	Blutinsulinspiegel ↓ Blutglukosespiegel ↓			
	Schutz vor Diabetes mellitus Typ 2			
	Schutz vor Arthritis	C57BL/6 Maus		David et al., 2002
	Milderung von Non-alcoholic fatty liver disease	C57BL/6 Maus		Schattenberg et al., 2006
	Hauttumorwachstum ↑ Maligne Entartung ↑	C57BL/6 Maus		Chen et al., 2001
Glukokinase ↑	Leberspezifischer JNK1 Knockout, C57BL/6 Maus	Yang R et al., 2007		
Fettleber ↓ bei hoch kalorischer und fettreicher Kost	C57BL/6 Maus	Tuncman et al., 2006		
JNK 2^{-/-}	Kein Unterschied bezüglich des Fettgewebes	C57BL/6 Maus (hoch kalorische und fettreiche Kost)	Hirosumi et al., 2002.	
	Blutinsulinspiegel ↑ Blutglukosespiegel ↑	C57BL/6 Maus		
	Schutz vor Arthritis	C57BL/6 Maus	Han et al., 2002	
	Atherosklerose ↓ Schaumzellen ↓	C57BL/6 Maus	Ricci et al., 2004	
	Hauttumorwachstum ↓ Maligne Entartung ↓	C57BL/6 Maus	Chen et al., 2001	
	Fettleber ↑ bei hoch kalorischer und fettreicher Kost	C57BL/6 Maus	Tuncman et al., 2006	
	Rückgang von Bauchaortenaneurismata	C57BL/6 Maus	Yoshimura et al., 2005	
	Typ 1 Diabetes ↓ und evtl. erhöhte Apoptoseresistenz der β-Zellen des Pankreas	C57BL/6 Maus	Jaeschke et al., 2005.	
JNK 3^{-/-}	Schutz vor Axotomie und Neuronenzelltod	C57BL/6 Maus	Keramaris et al., 2005	
	Neuroprotektion	C57BL/6 Maus	Yang DD et al. 1997	
JNK1↓ oder JNK2↓	Kardioprotektive Wirkung bezüglich Hypertrophie und Ischämie	C57BL/6 Maus	Kaiser et al., 2005	

JNK1^{-/-} und JNK2^{-/-}	Embryonaler Tod durch fehlerhafte neuronale Morphogenese	C57BL/6 Maus	Sabapathy et al., 1999
JNK2^{-/-} und JNK3^{-/-}	Geringerer dopaminerges Zellverlust bei Parkinsonkrankheit	C57BL/6 Maus	Hunot et al., 2004

Tabelle 1 JNK Funktionen *in vivo*

Übersicht der *in vivo* Funktionen der JNK. ↑ = Erhöhung, ↓ = Verminderung, → = keine Veränderung.

1.2 Verknüpfung der JNK mit dem Metabolischen Syndrom

Die Effekte der JNK auf Glukostase, Insulinresistenz, Fettstoffwechsel, Dyslipidämie, Adipositas und Herzkreislauf-Störungen, wie Atherosklerose, verdeutlichen die Verstrickung der JNK mit dem Metabolischen Syndrom.

1.2.1 JNK1, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2

Insulinresistenz (IR) beschreibt das Unvermögen des Organismus auf den endogenen Botenstoff Insulin adäquat zu reagieren und wird als Vorstufe von Diabetes mellitus Typ 2 gesehen. JNK1 führt anstatt der aktivierenden Tyrosin-Phosphorylierung zu Serin-Phosphorylierung von IRS-1, was eine fehlerhafte Insulin-Signaltransduktion zur Folge hat. Dies äußert sich in Form von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 (Aguirre et al., 2000; Hirosumi et al., 2002). Die Hemmung von JNK1 führt zu einer Minderung der hepatischen Glukoseproduktion, erhöht die Glukoseverwertung und deren Aufnahme in der Peripherie bei Mäusen mit genetisch induziertem Diabetes (db/db Maus) (Kaneto et al., 2004). Durch JNK1 Inaktivierung in diesen db/db Mäusen erhöht sich die Insulin Freisetzung des Pankreas und die Insulinsensitivität bessert sich. Sowohl bei diesen Tieren als auch bei Tieren mit diätinduzierter Insulinresistenz nehmen die Blutzucker- und Seruminsulinspiegel nach JNK1 Inaktivierung ab. Zudem bietet eine JNK1 Insuffizienz einen partiellen Schutz vor Adipositas, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und diätetisch verursachtem Diabetes mellitus Typ 2 (Kaneto et al., 2005). Ein JNK1 Knockout in der Leber verbessert dort die Funktion des Insulinrezeptors und mindert eine diätinduzierte Insulinresistenz (Aguirre et al., 2000).

Durch selektive JNK1 Inhibierung konnte die Insulinsensitivität bei Mäusen mit Typ 2 Diabetes wieder hergestellt werden (Stebbins et al., 2008).

1.2.2 Komponenten des Metabolischen Syndroms

Adipositas, freie Fettsäuren, Verfettung von Leberzellen und Atherosklerose

Bei Adipositas, Diabetes Mellitus Typ 2, Hyperlipidämie und damit auch beim Metabolischen Syndrom sind die freien Fettsäuren im Serum erhöht (Boden, 2001; Roden et al., 2004; Kim C et al., 2006). Große Mengen an freien Fettsäuren führen zu einer erhöhten Basalsekretion des Insulins und verhindern zudem die glukosevermittelte Insulinsekretion mit folgender β -Zellapoptose (Gremlich et al., 1997; Bollheimer et al., 1998; Shimabukuro et al., 1998; Jacqueminet et al., 2000).

Dauerhaft erhöhte freie Fettsäuren wirken in Form von oxidativem Stress schädlich auf die Zellen des Organismus. In den β -Zellen des Pankreas führt dies zu einer JNK1-vermittelten Funktionsabnahme von PDX-1 (pancreoduodenal homeobox faktor-1) mit der Folge einer verminderten Insulinsynthese und -sekretion. Dieser Prozess wird Lipotoxizität genannt und führt auch zu der Entstehung von Typ 2 Diabetes (Unger et al., 1995; Kaneto et al., 2005).

In Adipozyten entsteht durch ein Überangebot an freien Fettsäuren eine Proteinkinase C (PKC)-vermittelte JNK Aktivierung mit folgender IR (Gao et al., 2004). Da ebenfalls die Funktion des Glukosetransporters 4 (Glut4) IRS-1 abhängig reguliert wird, sind JNK in den Fettzellen auch über diesen Weg für eine IR verantwortlich (Nguyen et al., 2005; Watson & Pessin, 2001). Außerdem ist JNK1 an der Entstehung der Fettleber beteiligt (Schattenberg et al. 2006).

Adipositas

Die JNK Aktivität ist bei Adipositas und bei Diabetes erhöht (Aguirre et al., 2000; Carlson et al., 2003; Ozcan et al., 2004). Ebenfalls gesichert ist, dass sowohl das Metabolische Syndrom als auch die IR mit dem BMI korrelieren (Esteghamati et al., 2008). Speziell JNK1 steht mit Adipositas in Verbindung. Eine Defizienz dieser JNK Isoform führt zu vermindertem Körpergewicht, verbesserter Insulinsensitivität und Insulinsignaltransduktion bei diätetisch sowie genetisch bedingter Adipositas (Hirosumi et al., 2002).

Bei Diabetes und Fettleibigkeit sind die Adipozyten vergrößert (Carlson et al., 2003; Guo et al., 2004). Bei Mäusen mit JNK1 Defizienz ist die subkutane Fettschicht um 33% verringert und die Fettzellen sind verkleinert. Im Gegensatz dazu hat eine JNK2 Defizienz keinen Einfluss auf Gewicht, Fettgewebsverteilung oder Fettzellgröße (Hirosumi et al., 2002). Demzufolge besteht eine JNK1 spezifische Verknüpfung mit Adipositas und Fettzellgröße.

Atherosklerose

Schaumzellen sind ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Atherosklerose und JNK2 ist bei der Entstehung dieser Zelltypen maßgeblich beteiligt. Der Funktionsverlust dieser JNK Isoform führt zu einer Hemmung der atherosklerotischen Plaquebildung in Tiermodellen. (Ricci et al., 2004; Sumara et al., 2005).

1.2.3 Blutwerte des Lipidmetabolismus

Eine JNK1 Defizienz zeigt keine Auswirkung bezüglich der Konzentrationen von freien Fettsäuren, Triglyzeriden und Cholesterin im Blut von adipösen oder normalgewichtigen Mäusen (Hirosumi et al., 2002). Bis auf eine Reduktion des Cholesterins im Vergleich zu adipösen Mäusen verändert eine JNK2 Defizienz die oben genannten Blutwerte nicht (Tuncman et al., 2006).

1.2.4 Adiponektin

Adiponektin, ein adipozytenspezifisches Protein, korreliert negativ mit dem Triglyzeridspiegel im Serum und ist bei Diabetes mellitus Typ 2 vermindert (Hotta et al., 2000). Es ist umgekehrt proportional zur Fettzellgröße (Skurk et al., 2007) und korreliert negativ mit der Fähigkeit der Glukoseverwertung (Chandalia et al., 2007). Sowohl bei Übergewicht als auch bei Typ 2 Diabetes ist Adiponektin im Plasma erniedrigt (Weyer et al., 2001). Eine Gabe von rekombinantem Adiponektin kann eine Insulinresistenz signifikant verbessern (Yamauchi et al., 2001). Das Adiponektin-Gen (apM1) wird durch Insulin hoch reguliert (Scherer et al., 1995; Hu et al., 1996). Eine Aktivierung von JNK führt zur Hemmung, eine JNK1 Defizienz dagegen zu Erhöhung der Adiponektin Produktion in Adipozyten (Kim KY et al., 2005; Hirosumi et al., 2002). Kann der Insulinsignalweg durch JNK gestört werden, so könnte sich dies auch auf die Adiponektinproduktion auswirken. Dementsprechend wird angenommen, dass Adiponektin durch JNK beeinflusst werden kann.

1.3 Fragestellung

Die oben genannten Erkenntnisse sprechen für eine Beteiligung der JNK an der Pathogenese des Metabolischen Syndroms.

Es existiert bisher noch keine Arbeit, die sich mit den Auswirkungen des JNK2/3 Knockouts auf die Morphologie, mit Ausnahme des ZNS, im Mausmodell befasst.

JNK1^{-/-}Mäuse sind vor Komponenten des Metabolischen Syndroms wie Fettleibigkeit und Diabetes mellitus Typ 2 geschützt (Hirosumi et al., 2002). JNK1 ist also ein wichtiger Faktor für die Entstehung dieser Pathologie. Ausgehend von dieser These beschäftige ich mich in dieser Arbeit mit der Annahme, dass eine alleinige Präsenz der JNK1 Isoform bei einem Doppel-Knockout von JNK2 und 3 im Mausmodell zu einer Manifestation des Metabolischen Syndroms führt. Dementsprechend lauten die Fragestellungen dieser Arbeit:

- Wie äußert sich der JNK2/3 Knockout in Hinsicht auf die Komponenten des Metabolischen Syndroms?

Folgende Parameter sollen untersucht werden:

- Länge und Gewicht
 - Gewichtsentwicklung
 - Fettgewebsverteilung und Fettzellgröße
 - Organgewichte
 - Vorliegen einer Fettleber
 - Stoffwechsellage von Leber und Fettgewebe
 - Adiponektinexpression im Fettgewebe
 - Insulin und Fette im Blut
-
- Sind die erhobenen Befunde mit einer diabetischen Stoffwechsellage und einem Metabolischen Syndrom in Verbindung zu bringen?

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung und Zucht

Haltung Zucht und Organentnahme erfolgten gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i. d. F. vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105). Die Tiere wurden im Tierstall des Pharmakologischen Institutes der Universität Kiel gezüchtet und in Gruppen von fünf bis acht gleichgeschlechtlichen Tieren in durchsichtigen Polycarbonat-Käfigen auf Weichholzgranulat gehalten. Die Ernährung bestand aus einer autoklavierten, pelletierten Alleindiät, Haferflocken und Leitungswasser ad libitum. Es wurde ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, eine Raumtemperatur von 20-24° C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-60 % gewährleistet. Die Züchtung, Haltung, das Wiegen und die Sektion der JNK Knockout Tiere erfolgte in Bereichen der Sicherheitsstufe 1 (S1). Das Weichholzgranulat, Käfige, Trinkflaschen und Instrumente, die mit den genetisch veränderten Tieren in Kontakt gekommen waren, wurden getrennt entsorgt bzw. gereinigt.

Wildtyp Mäuse

Genetisch nicht veränderte weibliche Mäuse vom C57BL/6 Stamm wurden als Versuchstiere für die Kontrollgruppe verwendet. Sie werden im Folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnet.

JNK Knockout Mäuse

Die verwendeten JNK Knockout Tiere, bei denen je eine bzw. zwei der drei JNK-Formen genetisch inaktiviert wurden, wurden mit Hilfe des „gene targeting“ bzw. „targeted disruption“ Verfahrens generiert. Die Vektoren (targeting vektors) enthielten Gene aus der genomischen Bibliothek von 129/SV-Mäusen. In den Vektoren wurde das Phosphorylierungsmotiv Threonin-Prolin-Tyrosin durch eine Neomycin- (bei JNK2 und 3) bzw. eine Hygromycin-Kassette (bei JNK1) ersetzt, die als positive Selektionsmarker dienen (Dong et al., 1998; Yang DD et al., 1997; Yang DD et al., 1998). Bei dem Vektor für JNK3 wurde zudem ein weiteres Exon aus dem Gen entfernt. Bei dem JNK1 und 2 Knockout wurden neben dem Phosphorylierungsmotiv noch die jeweiligen Exons der Isoformen α und β entfernt. Die Vektoren wurden dann in embryonale Stammzellen von unterschiedlichen Mausstämmen elektroporiert: beim JNK2 Knockout in embryonale Stammzellen vom Stamm D3 und beim JNK1 und JNK3 Knockout in embryonale Stammzellen vom Stamm W9.5.

Nach positiver Selektion der embryonalen Stammzellen mit Neomycin bzw. Hygromycin und negativer Selektion mit Gancyclovir (bzw. Herpes simplex Thymidinkinase) wurden die rekombinanten embryonalen Stammzellen in C57BL/6 Blastocysten injiziert. Die gewonnenen Chimäre, die eventuell die erwünschte Mutation in der Keimbahn trugen, konnten sie so auf ihre Nachkommen weitergeben. Diese wurden dann für die Züchtung homozygoter Tiere nach den Mendel'schen Regeln verwendet.

Um die große Anzahl der in den Experimenten verwendeten Tiere decken zu können, wurden JNK Knockout Mäuse einmal mit Mäusen des Stammes C57BL/6 rückgekreuzt. Die daraus hervorgehenden heterozygoten Mäuse der F1-Generation wurden wieder gekreuzt, so dass in der F2-Generation homozygote JNK Knockouts und Wildtypen entstanden. Aus dieser Generation gingen dann die Versuchstiergruppen hervor (F3-Generation). Diese Vorgehensweise minimierte einerseits die genetische Variabilität von Knockout- und Wildtypen und sicherte andererseits eine für die durchzuführenden Experimente ausreichende Menge an Versuchstieren (Brecht et al., 2005).

Genotypisierung

Der Genotyp der Tiere wurde stichprobenartig mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kontrolliert. Die Isolierung der DNA erfolgte dabei aus den Mäuseschwänzen mit Hilfe des Quiagen Kits für die DNA Präparation.

2.2 Wiegen der Mäuse

Zur Bestimmung der Gewichtsentwicklung wurden 18 weibliche Tiere des JNK2/3^{-/-} Genotyps und 19 Kontrolltiere über einen Lebenszeitraum von bis zu 90 Lebenswochen in einem Abstand von je 14 Tagen mit einer digitalen Laborwaage gewogen. Um einen möglichst konstanten Wiegezeitpunkt einzuhalten, wurden die Tiere stets zwischen 13 und 15 Uhr nachmittags gewogen. Die Messperiode begann im Mai 2005 und endete mit der Präparation im August 2006.

2.3 Lösungen und Reagenzien

4% Chloralhydrat: 10 g Chloralhydrat (Merck) wurden in 250 ml destilliertem Wasser gelöst.

10xPBS (Phosphate Buffered Saline): 80 g NaCl (Sigma), 11,5 g Na₂HPO₄ (Merck), 2 g KH₂PO₄ (Merck) und 2 g KCl (Merck) wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes mit HCl oder NaOH auf 7,4 wurde mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Als Arbeitslösung wurde eine 1:10-Verdünnung dieser Lösung verwendet (1xPBS).

4% Paraformaldehyd (PFA): 40 g Paraformaldehyd (Roth) wurden in 900 ml PBS bei 60° C gelöst; anschließend wurde auf 1000 ml aufgefüllt.

2.4 Durchführung der Gewebegewinnung

Die Gewinnung der Gewebe wurde immer zwischen 15 und 18 Uhr durchgeführt, um tageszeitabhängige Schwankungen der untersuchten Parameter zu minimieren. Zudem wurden die Genotypen immer zeitnah und abwechselnd präpariert, um möglichst ähnliche Bedingungen zu schaffen.

2.4.1 Narkotisierung

Zur Gewinnung der Gewebe wurden die Mäuse in einer „Ätherbox“ (Durchsichtige runde Plexiglasbox mit Ätherreservoir im Deckel) narkotisiert und danach dem Gewicht entsprechend mit 4%iger Chloralhydratlösung intraperitoneal anästhesiert (200 µl plus 10 µl/g Körpergewicht). Die Narkosetiefe wurde durch Reaktion auf Schmerzreflexe beurteilt.

2.4.2 Blutentnahme (BE) und Tötung

Nach dem Ausbleiben der Schmerzreflexe wurde der Thorax eröffnet und mit einer Li-Heparin Monovette und Kanüle (Sarstedt) transkardial Blut entnommen. Das Blut wurde bis zur weiteren Verarbeitung in Eppendorfreaktionsgefäßen (1,5 ml) auf Eis zwischengelagert. Die Entblutung führte zum Tod der Maus. Die Mäuse, die keine BE erhielten, wurden durch Dekapitierung getötet.

2.4.3 Perfusion

Die weitere Präparierung der Mäuse wurde von den Analyseverfahren der Organe bestimmt. In der Regel folgten der BE zwei transkardiale Perfusionen mit je 20 ml PBS. Für eine PCR wurde nach Blutentnahme der Bauch eröffnet, die Organe entnommen und in Eppendorfreaktionsgefäßen (1,5 ml) in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für eine histologische Untersuchung folgte der PBS Spülung eine zweimalige Perfusion mit je 20 ml 4%igem PFA und die Entnahme und Lagerung der Organe in ebenfalls 4%igem PFA. Injiziert wurden die Lösungen in die linke Herzkammer. Durch einen Entlastungsschnitt im rechten Vorhof konnten die Lösungen den Kreislauf wieder verlassen.

Eine BE und Perfusion erfolgte nicht bei Tieren, die nur zur Fettschichtmessung und Analyse der Organgewichte genutzt wurden.

2.4.4 Organentnahme

Um eine perfusionsbedingte Veränderung der Organgewichte zu verhindern, wurden zur Messung dieser Parameter von jedem Genotyp (WT, JNK2/3^{-/-} und JNK1^{-/-}) jeweils drei Mäuse ohne BE und Perfusion genutzt. Die Entnahme der Organe verlief folgendermaßen: Eröffnung der Haut mit einer Schere, Spaltung des subkutanen Fettgewebes und Durchtrennung des Peritoneums. Die zu entnehmenden Organe wurden freipräpariert, entnommen, vermessen und zu gleichen Teilen in flüssigem Stickstoff und 4%igem Paraformaldehyd konserviert.

2.4.5 Aufarbeitung des Blutes

Das Blut wurde bei 4° C fünf Minuten lang mit einer Geschwindigkeit von 10.000 x g in einer Tischzentrifuge (Sigma 1-15K) zentrifugiert, der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

2.4.6 Histologie

Bei sämtlichen histologischen Arbeiten wurde ich freundlicherweise von Priv. Doz. Dr. med. Martin Anlauf angeleitet und unterstützt. Sie wurden in den Räumen des pathologischen Institutes des Universitätsklinikums der CAU Kiel, geleitet von Herrn Professor Dr. med. Günter Klöppel, durchgeführt. Da Einbettung und Anfertigung der histologischen Schnitte sowie deren Färbung dankenswerterweise von den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors der Pathologie Kiel nach den Hausstandards erfolgte, ist hier der Arbeitsablauf nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

Das bei der Organentnahme gewonnene Gewebe wurde bis zur Weiterverarbeitung in PFA belassen. Um die Schnitte anzufertigen, wurde das Gewebe entwässert und dann in Parafin eingebettet. Die Beschriftung erfolgte mit Bleistift beschriebenen Papierstreifen. Nach dem Aushärten wurden mit dem Mikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad aufgefangen und anschließend auf Objektträger übertragen und zur

Trocknung gelagert. Es folgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und die Betrachtung der Schnitte unter dem Mikroskop.

2.5 Morphometrie

2.5.1 Längenbestimmung

Die Körper-, Schwanz- und Gesamtlänge wurde mit einem Zentimetermaß am betäubten Tier von Schnauze bis Schwanzspitze gemessen.

2.5.2 Fettschichtdicke

Die Messung der subkutanen Fettschichtdicke wurde an Tieren durchgeführt, die keine BE und auch keine Perfusion erhielten (von jedem Genotyp (WT, JNK2/3^{-/-} und JNK1^{-/-}) jeweils drei Mäuse). Um einer eventuellen Fehlmessung entgegen zu wirken, wurde an einem einheitlichen Messpunkt gemessen. Dieser Messpunkt befand sich einen Zentimeter kaudal und lateral des Xyphoides, kontralateral und oberhalb der Injektionsstelle des Anästhetikums. Zusätzlich wurden die Messstellen zuvor mit einem Scherenschlag begradigt.

2.5.3 Organgewichte

Die Gewichtsbestimmung der Organe erfolgte ebenfalls ohne vorherige BE oder Perfusion mittels einer digitalen Laborwaage.

2.5.4 Fettzellenvermessung

Von jeweils drei Tieren jeden Genotyps (WT, JNK1^{-/-} und JNK2/3^{-/-}) wurden Schnitte des Fettgewebes angefertigt. Die histologischen Schnitte (HE Färbung) des Fettgewebes wurden mittels Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung untersucht. In diesen wurden die vollständig sichtbaren Adipozyten pro Gesichtsfeld (GF) ausgezählt. Dies erfolgte in insgesamt 35 GF (elf bis zwölf GF pro Tier, bei je drei Tieren pro Genotyp). Zur Bestimmung der Fettzellgröße diente ein Rasterokular der Firma Olympus.

2.6 Statistik

Die Statistik und die Diagramme wurden mit Microsoft Office Excel 2003 ausgewertet und erstellt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit dem Student t-Test errechnet und Werte $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

2.7 Material und Methoden des Anhangs

2.7.1 Real-time-PCR des Leber- und Fettgewebes

Die Real-time-PCR der Leber und des Fettgewebes sowie des Blutes wurde freundlicher Weise von Frau Prof. Dr. Annette Schürmanns Doktorandin Jana Buchmann am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE), Abteilung Pharmakologie, durchgeführt. Deshalb erfolgt hier nur eine grobe Vorstellung des Materials und der Methoden.

2.7.2 Vorbereitung der RNA und first strand cDNA Synthese

RNA des Mausefettes wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) entsprechend den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Isolierung der RNA der Leber wurde mittels peqGOLD RNA Pure(TM) (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) durchgeführt. cDNA wurde mit dem Superscript III und zufälligen Hexameren als Primer (Invitrogen, Carlsbad, Invitrogen) aus 2 µg RNA generiert. Die Qualität der cDNA wurde durch PCR mit Murin GAPDH Primern (forward: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', reverse: 5'-TCC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3') kontrolliert.

2.7.3 Quantitative Real-time-PCR

Die quantitative Real-time-PCR Analyse wurde mit dem Applied Biosystems 7300 Real-time-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

2.7.4 Plasmaanalyse

Cholesterin und Triglyzeride wurden mit dem Analysesystem VITROS DT60 II (Johnson & Johnson, Neckargemünd, Germany) gemessen. Die Plasma-Insulinspiegel wurden mit dem Insulin ELISA Kit (Crystal Chem Inc, Illinois, USA) festgestellt.

3 Ergebnisse

In der Regel erfolgten die makroskopischen und histologischen Untersuchungen an Tieren des JNK2/3^{-/-} Genotyps im Vergleich zu Kontrolltieren (WT). Zusätzlich wurden bei einigen Untersuchungen JNK1^{-/-} Mäuse zum Vergleich hinzugezogen.

Die biochemischen Analysen der von mir gewonnenen Proben wurde mit freundlicher Unterstützung von Frau Prof. A Schürmann in Potsdam durchgeführt. Die Primärdaten wurden mir zur Auswertung und Diskussion zur Verfügung gestellt, so dass ich mich darauf im Anhang als Teil dieser Arbeit beziehen werde.

3.1 Gewichte

3.1.1 Gewichtsentwicklung

Die JNK2/3^{-/-} Mäuse entwickeln ein höheres Gewicht als die Wildtypen (WT). Bei einem Alter von 30 Wochen sind Mäuse des JNK2/3^{-/-} Genotyps im Gegensatz zu den WT neun Gramm schwerer als die Kontrolltiere ($36,5 \pm 7,4$ g vs. $27 \pm 3,9$ g). In der 40. bis 60. Lebenswoche (LW) erhöht sich das Gewicht der JNK2/3^{-/-} Tiere jede Woche um ca. ein Gramm (39 ± 7 g in der 40. auf $57,4 \pm 10$ g in der 60. LW), das Gewicht der Wildtypen in den folgenden 20 LW erhöht sich nur um 1,2 Gramm ($27,5 \pm 3$ g auf $28,7 \pm 3$ g). Somit beträgt die Gewichtszunahme der JNK2/3^{-/-} Tiere nach der Zeit von 20 LW im Gegensatz zu den Wildtypen ca. das 17-fache. Nach einer Stagnation in der 70. bis 80. LW nimmt das Gewicht der beobachteten Tiere innerhalb der folgenden zehn Wochen erneut um ca. sieben Gramm zu. Das Gewicht der Vergleichspopulation steigt in der gleichen Wachstumszeit nur um 1,8 Gramm ($56,4 \pm 8$ g vs. $30,5 \pm 2,59$ g, $p < 0,005$). Zusammenfassend ergibt sich ab der 50. LW eine anhaltende hoch signifikant ($p < 0,005$) erhöhte Gewichtszunahme der JNK2/3^{-/-} Mäuse (Abb. 3).

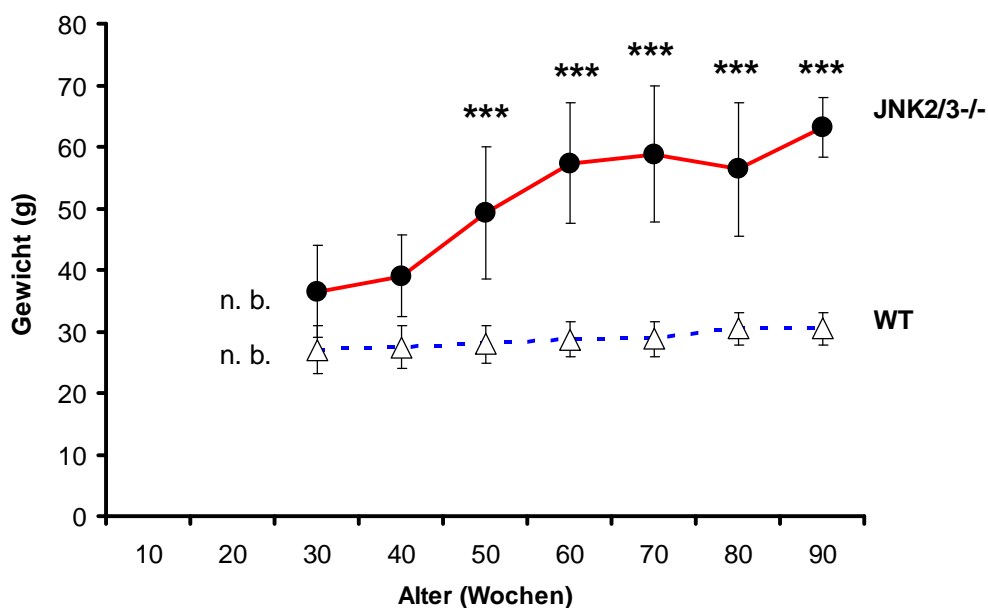


Abb. 3 Körpergewicht

Mittelwerte \pm SD der Gewichtsentwicklung der JNK2/3^{-/-} Mäuse (JNK2/3^{-/-}) und der Wildtyp Kontrollen (WT) bis zur 90. Lebenswoche; JNK2/3^{-/-} Tiere (n=18), WT (n=19), n.b. = nicht bestimmt, *** = $p < 0,005$.

3.1.2 Aussehen und Größe

Äußerlich sind die JNK2/3^{-/-} Tiere und Wildtypmäuse sehr ähnlich, das Fell ist schwarz, flauschig und dicht. Jedoch wirken die JNK2/3^{-/-} Mäuse wesentlich größer (Abb. 4) und sind länger ($19,7 \pm 0,5$ cm vs. $16,9 \pm 1,2$ cm, $p=0,05$, Abb. 5) als die Wildtypen.

Im Vergleich zu Tieren des JNK1^{-/-} Genotyps mit einer durchschnittlichen Größe von $17,7 \pm 0,2$ cm sind die JNK2/3^{-/-} Tiere signifikant länger ($p < 0,01$, Abb. 5).

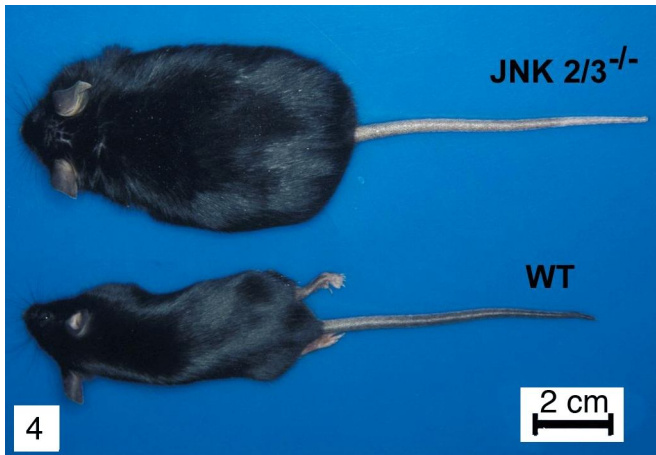


Abb. 4 JNK2/3^{-/-} Maus und Kontrolltier (WT) in der Aufsicht.

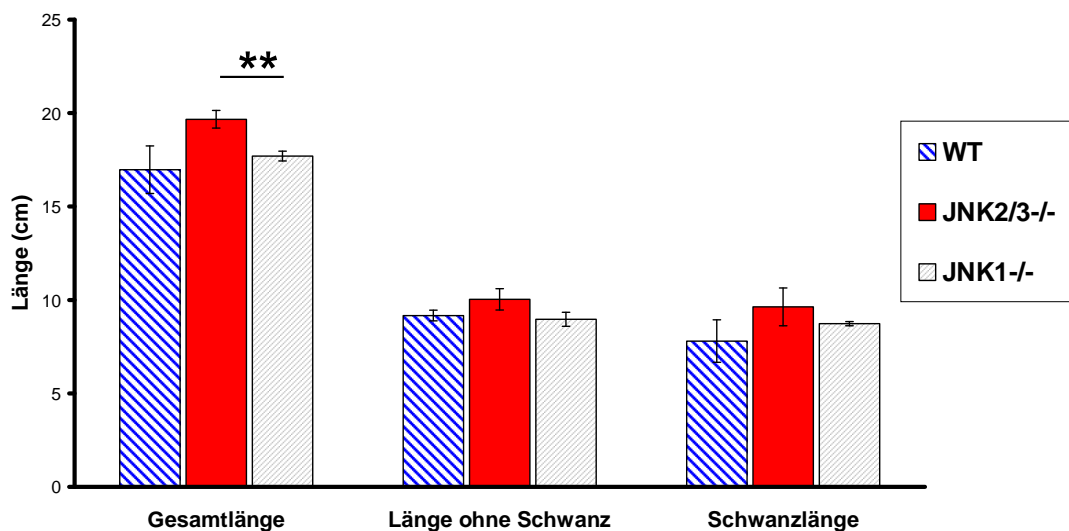


Abb. 5 Körpergrößen

Mittelwerte \pm SD der Gesamtlänge, der Körperlänge ohne Schwanz und der Schwanzlänge der Genotypen im Vergleich (WT, JNK 2/3^{-/-} und JNK1^{-/-} Tiere, je n=3), ** = p<0,01.

3.1.3 Gewicht zum Sektionszeitpunkt

Zum Sektionszeitpunkt sind die 18 JNK2/3^{-/-} Tiere 33-88 Wochen und die 19 Kontrolltiere 50-81 Wochen alt. Die Abb. 6 stellt die jeweiligen Gewichte der Tiere dar. Aus der Verteilung ergibt sich ein signifikant höheres Gewicht von $59,9 \pm 7,8$ Gramm für die JNK2/3^{-/-} Tiere im Gegensatz zu den Kontrolltieren ($28,7 \pm 3,0$ Gramm, p<0,001). Die

Steigung der Regressionsgerade, welche den Trend der Gewichtsverteilung repräsentiert, besitzt bei den $JNK2/3^{-/-}$ Mäusen eine doppelt so hohe Steigung wie bei den WT. Dies unterstreicht ebenfalls die drastisch erhöhte Gewichtsentwicklung durch den $JNK2/3$ Knockout und lässt auf eine stetige Gewichtsvermehrung bei den $JNK2/3^{-/-}$ Tieren schließen (Abb. 6).

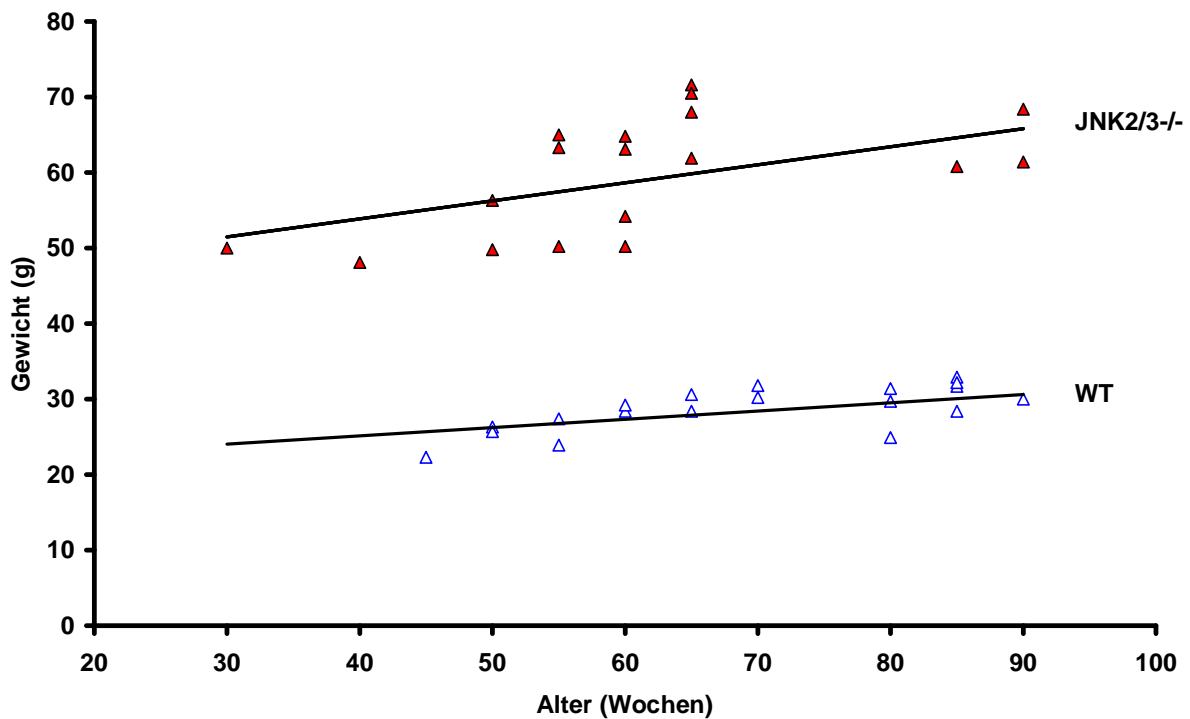


Abb. 6 Gewichtsverteilung

Darstellung der Gewichtsverteilung zum Sektionszeitpunkt in Abhängigkeit mit dem Alter. Die geschlossenen roten Dreiecke stehen für die $JNK2/3^{-/-}$ Tiere (n=18), die blau umrandeten Dreiecke für die WT (n=19). Die Gleichung der Regressionsgerade für die Gewichtsverteilung der $JNK2/3^{-/-}$ Tiere lautet $y = 0,23876x + 44,31$; die der WT lautet $y = 0,1093x + 20,77$.

3.2 Fettgewebe

3.2.1 Verteilung des Fettgewebes

Die JNK2/3^{-/-} Mäuse weisen eine deutlich sichtbare und signifikante Zunahme der subkutanen und viszeralen Fettmenge auf. Die Aufsicht auf den eröffneten Maussitus zeigt bei den JNK2/3^{-/-} Tieren eine wesentlich größere Menge an mesenterialem Fett als bei den Kontrolltieren (Abb. 7). Auch das retroperitoneale Nierenpaket verfügt im Vergleich zu den Wildtypen bei gleich großer Niere (Abb. 14) über eine größere Menge an Fettgewebe (Abb. 8).

Die subkutane Fettschicht der JNK2/3^{-/-} Mäuse ist hoch signifikant verdickt und misst etwa das Dreifache der Stärke der WT und JNK1^{-/-} Tiere ($3,6 \pm 0,3$ mm vs. je 1 ± 0 mm, p jeweils $p < 0,005$, Abb. 9).

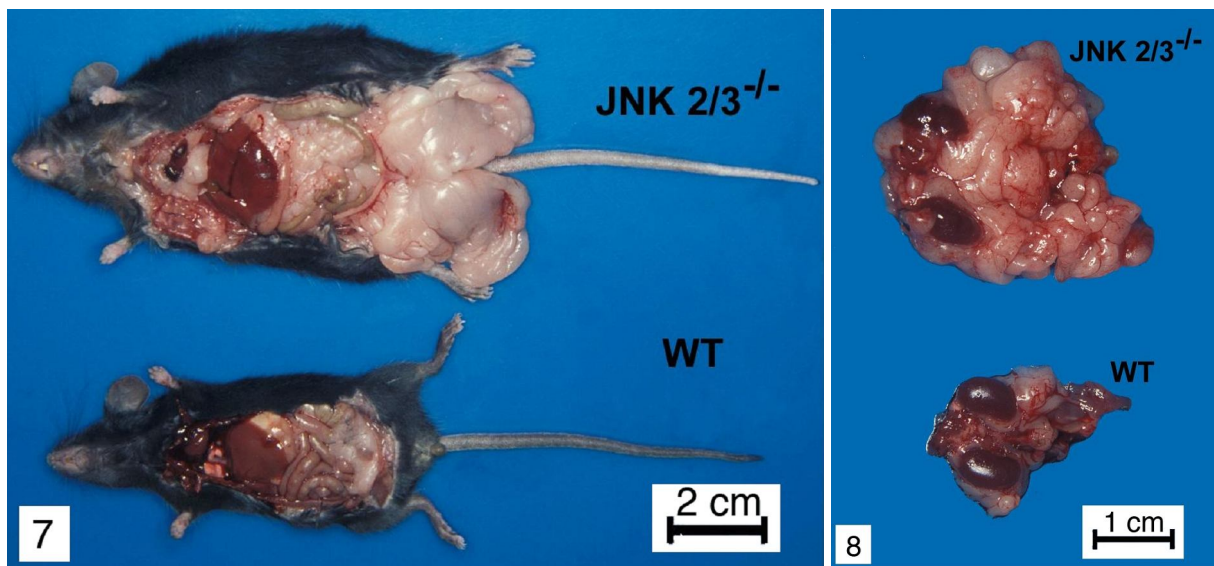


Abb. 7 Maussitus

JNK 2/3^{-/-} und WT mit eröffnetem Situs.

Abb. 8 Nierenpaket

Retroperitoneales Nierenpaket der beiden Vergleichsgruppen JNK2/3^{-/-} und WT.

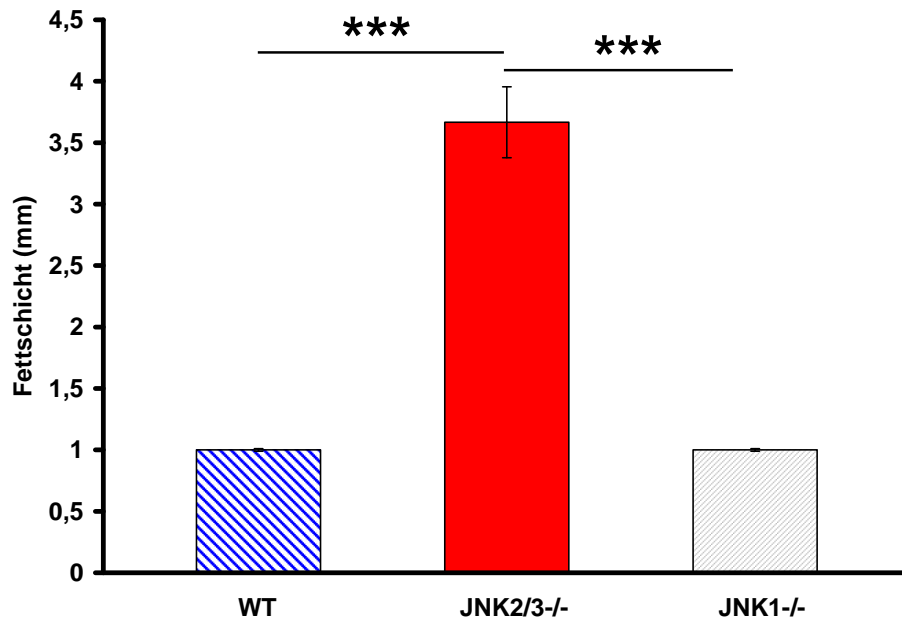


Abb. 9 Subkutanes Fettgewebe

Mittelwerte \pm SD des subkutanen Fettgewebes der WT, JNK2/3^{-/-} und JNK1^{-/-} (je n=3), *** = p<0,005.

3.2.2 Fettzellgrößen

Die histologische Untersuchung des Fettgewebes ergab einen offensichtlichen Unterschied in der Fettzellgröße (Abb. 10 und 11 bei jeweils gleicher mikroskopischer Vergrößerung).

In der Vermessung der Durchmesser bestätigt sich das mikroskopische Bild. Die Fettzellen der JNK2/3^{-/-} Mäuse sind im Vergleich zu den Kontrolltieren mit p<0,005 hoch signifikant vergrößert. Der durchschnittliche Durchmesser der Fettzellen beträgt bei den JNK2/3^{-/-} Tieren $78,9 \pm 28,3 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $38,8 \pm 17,1 \mu\text{m}$ bei den Kontrolltieren. Ebenfalls hoch signifikant vergrößerte Durchmesser der JNK2/3^{-/-} Adipozyten zeigen sich im Vergleich zu den JNK1^{-/-} Mäusen (mittlerer Durchmesser $42,4 \pm 19,1 \mu\text{m}$, p<0,005) (Abb. 12).

Ein weiterer Beweis für eine Vergrößerung der Fettzellen durch den JNK2/3 Knockout ist aus der Anzahl der Zellen zu schließen, die pro Gesichtsfeld unter dem Mikroskop erfasst werden können. Große Fettzellen besitzen ein größeres Volumen als kleine Fettzellen. Dementsprechend ist deren Anzahl in einem definierten Raum weniger als die von kleineren Zellen. Die Fettgewebsschnitte der JNK2/3^{-/-} Mäuse zeigten mit 14 ± 3 Zellen/Gesichtsfeld signifikant weniger Zellen als die WT (23 ± 5 , p<0,005). Die Schnitte der JNK1^{-/-} Mäuse

zeigen 20 ± 2 Zellen/Gesichtsfeld ($p < 0,005$). Der $JNK2/3^{-/-}$ Genotyp besitzt signifikant vergrößerte Fettzellen (Abb. 13).

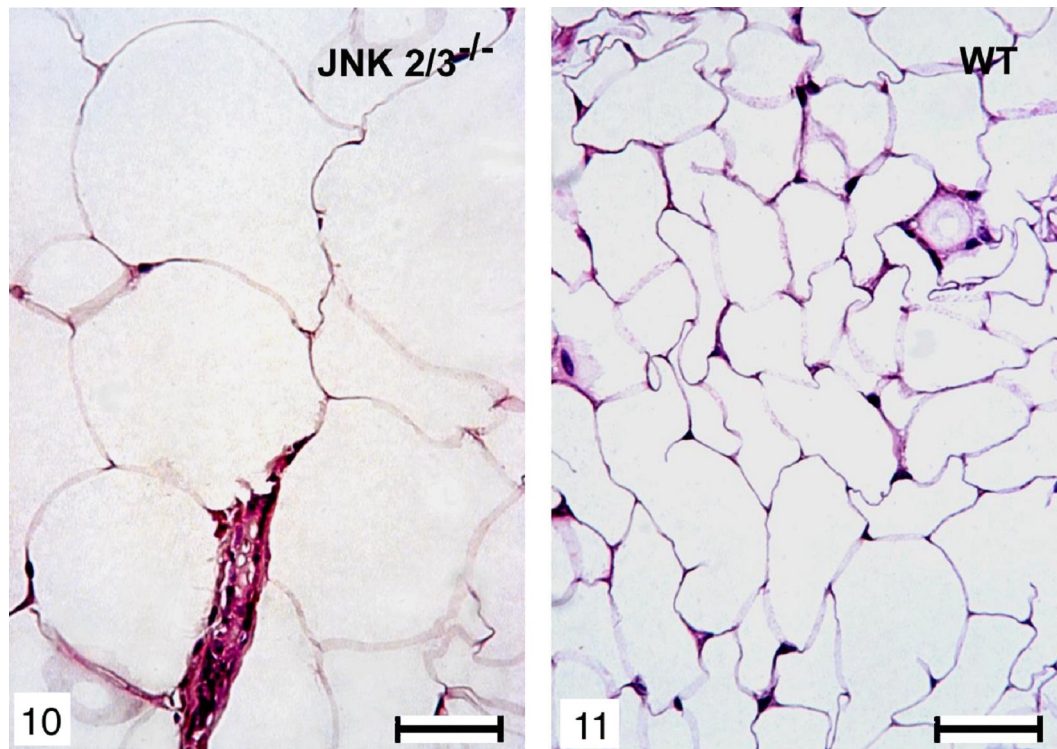


Abb. 10 Fettzellen $JNK2/3^{-/-}$

Mesenteriale Fettzellen der $JNK2/3^{-/-}$ Mäuse, der Maßstab ist identisch mit Abb. 11, HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

Abb. 11 Fettzellen WT

Mesenteriale Fettzellen der Kontrolltiere (WT), der Maßstab ist identisch mit Abb. 10, HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

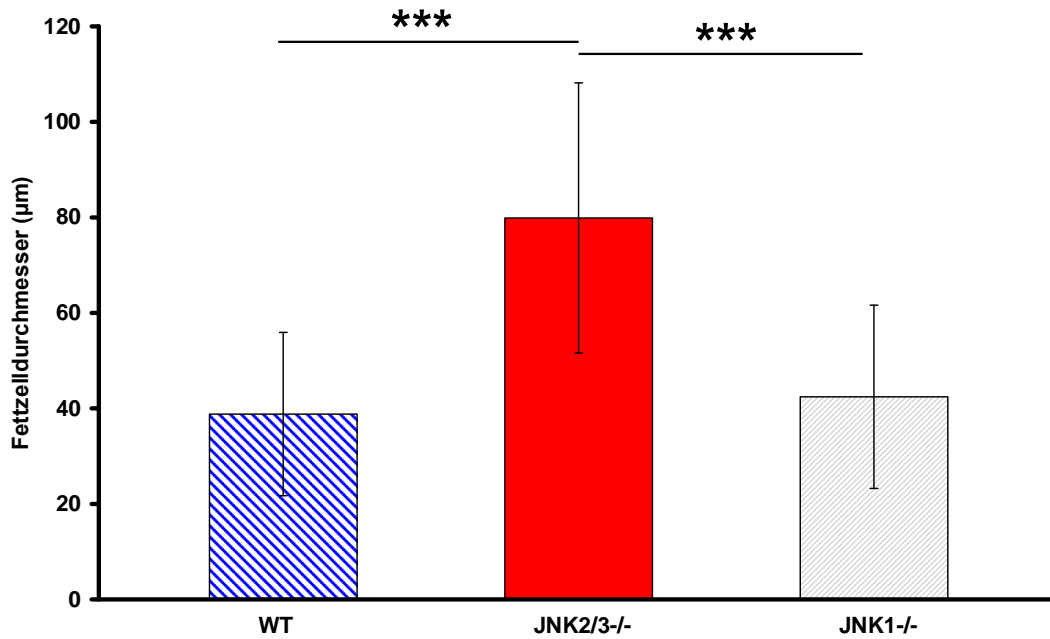


Abb. 12 Fettzellendurchmesser

Mittlere Durchmesser \pm SD der Fettzellen in μm bei WT, JNK 2/3^{-/-}, JNK 1^{-/-} (je n=3), *** = $p < 0,005$.

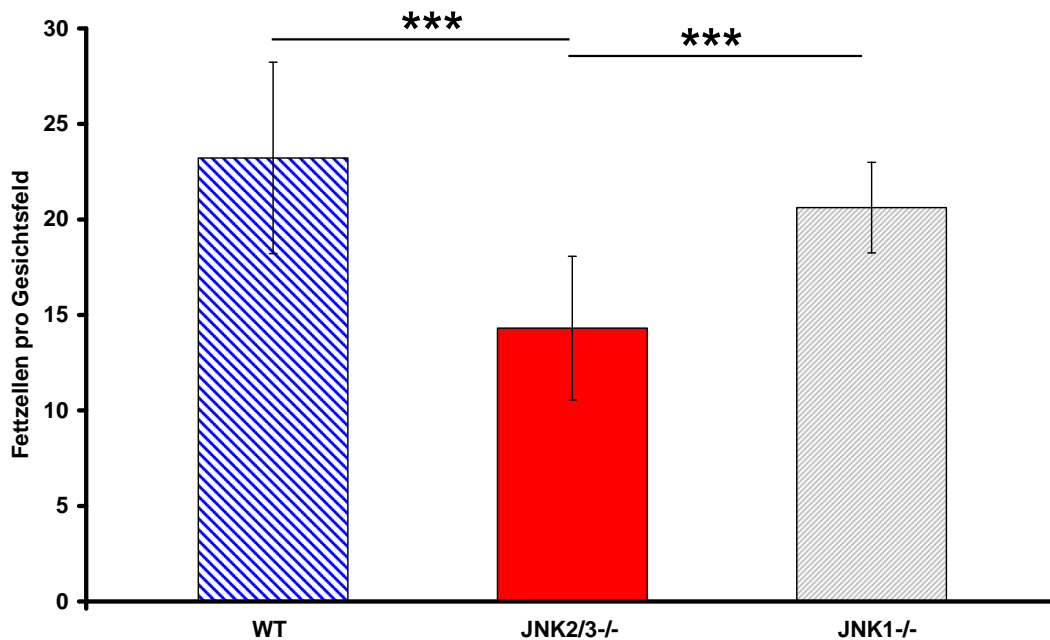


Abb. 13 Fettzellen pro Gesichtsfeld

Darstellung der durchschnittlichen Adipozytenzahl \pm SD pro Gesichtsfeld (35 Gesichtsfelder je Genotyp) bei WT, JNK 2/3^{-/-} und JNK 1^{-/-}, *** = $p < 0,005$.

3.3 Organveränderung

3.3.1 Organgewichte

Die Organe der JNK2/3^{-/-} Mäuse weisen signifikante Unterschiede im Gewicht auf. Das Omentum majus und das Mesenterium der JNK2/3^{-/-} Tiere sind signifikant schwerer. Das Omentum majus der JNK2/3^{-/-} Mäuse wiegt $3,0 \pm 1,1$ g vs. $0,6 \pm 0,3$ g bei den Kontrolltieren ($p < 0,05$) bzw. $0,5 \pm 0,1$ g bei JNK1^{-/-} Tieren ($p < 0,05$). Das Mesenterium der JNK2/3^{-/-} Tiere wiegt im Mittel $0,9 \pm 0,1$ g und ist damit signifikant schwerer als das der WT ($0,3 \pm 0,05$ g, $p < 0,01$) und der JNK1^{-/-} Mäuse ($0,23 \pm 0,01$ g, $p < 0,005$).

Die Gewichtsunterschiede der Herzen, Lungen, Leber, Nieren, Milze und Gehirne aller Genotypen sind nicht signifikant (Abb. 14).

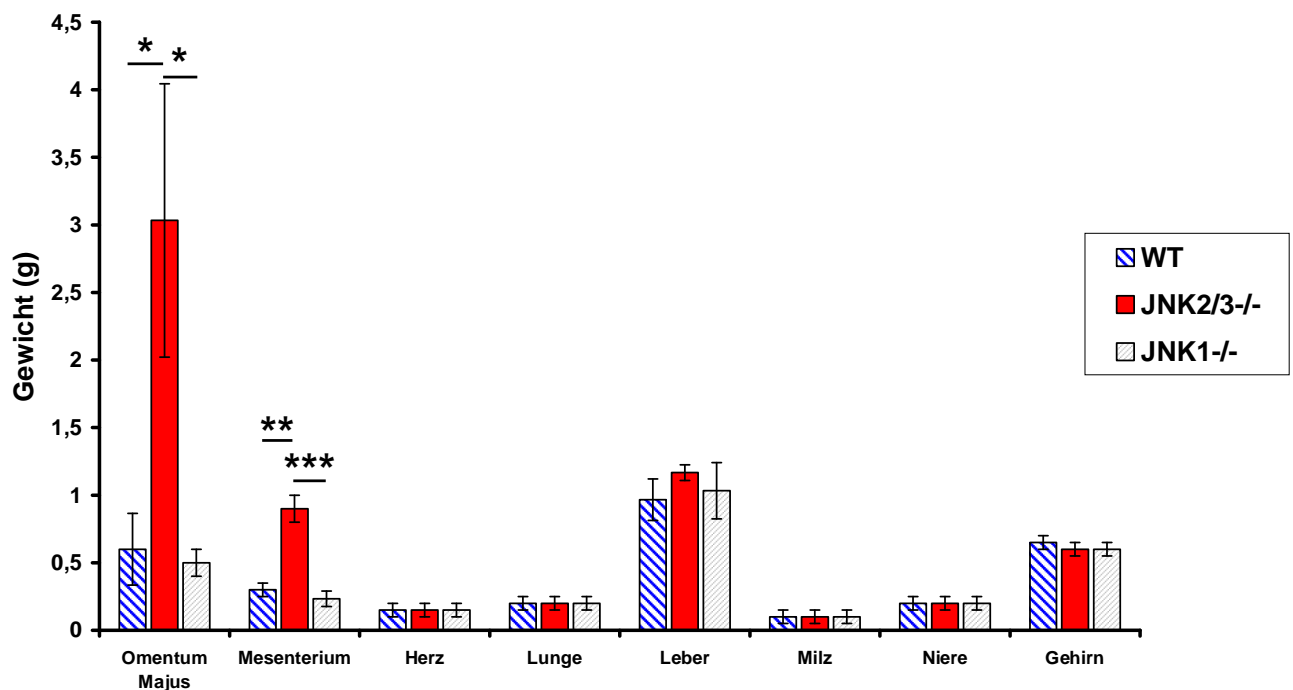


Abb. 14 Organgewichte

Mittelwerte \pm SD der Gewichte der Organe bei den WT, JNK2/3^{-/-} und JNK1^{-/-} (je n=3), * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,005$.

3.3.2 Fettleber

Histologische Untersuchungen zeigen eine ausgeprägte grobtropfige Verfettung des Leberparenchyms bei den JNK2/3^{-/-} Tieren (Abb. 15). Die Leberzellen zeigen eine gemischtropfige Verfettung (Abb. 16). Diese Veränderung sind charakteristisch für das Vorliegen einer Adipositas und Diabetes mellitus (Riede et al., 2004).

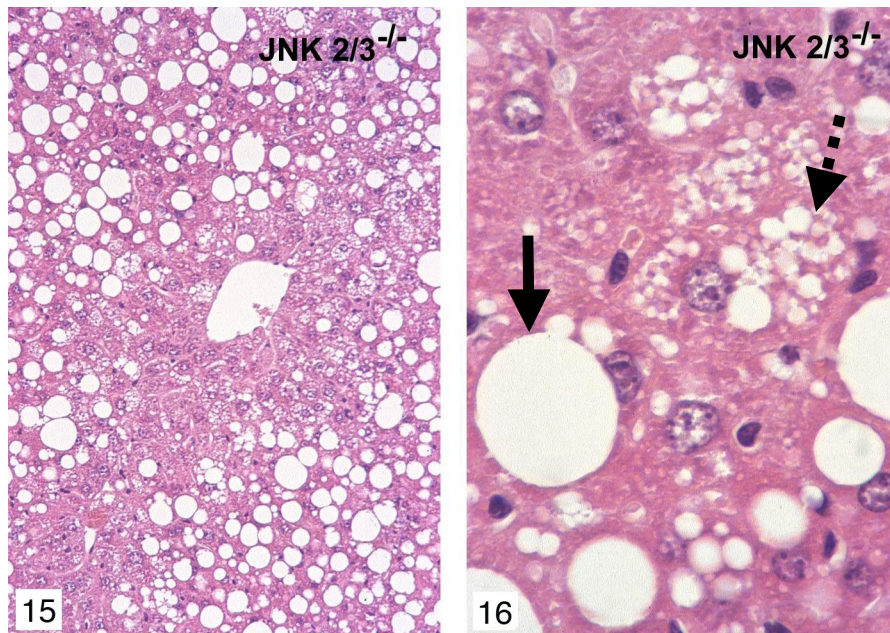


Abb. 15 Leberverfettung

Mikroskopische Ansicht der Leberzellen der JNK2/3^{-/-} Mäuse: zu sehen ist eine Vielzahl von großen Zytoplasmavakuolen, die in vivo mit Fetttropfchen gefüllt waren, HE, 40-fache Vergrößerung.

Abb. 16 Leberzellverfettung

Gemischtropfige Verfettung der Hepatozyten der JNK2/3^{-/-} Mäuse: zu sehen sind sowohl große als auch kleine Zytoplasmavakuolen als Residuen von großen (schwarzer Pfeil) und kleinen (gestrichelter Pfeil) Fetttropfen, HE, 400-fache Vergrößerung.

3.3.3 Atherosklerose

Bei der histologischen Untersuchung der $JNK2/3^{-/-}$ Tiere wurden atherosklerotische Veränderungen in den Gefäßen nachgewiesen. Abb. 17 zeigt Atherome und Schaumzellen (mit Cholesterinestern beladene Makrophagen) in der Gefäßintima. Dies spricht für das Vorliegen eines atherosklerotischen Prozesses in den Blutgefäßen der $JNK2/3^{-/-}$ Mäuse (Riede et al., 2004).

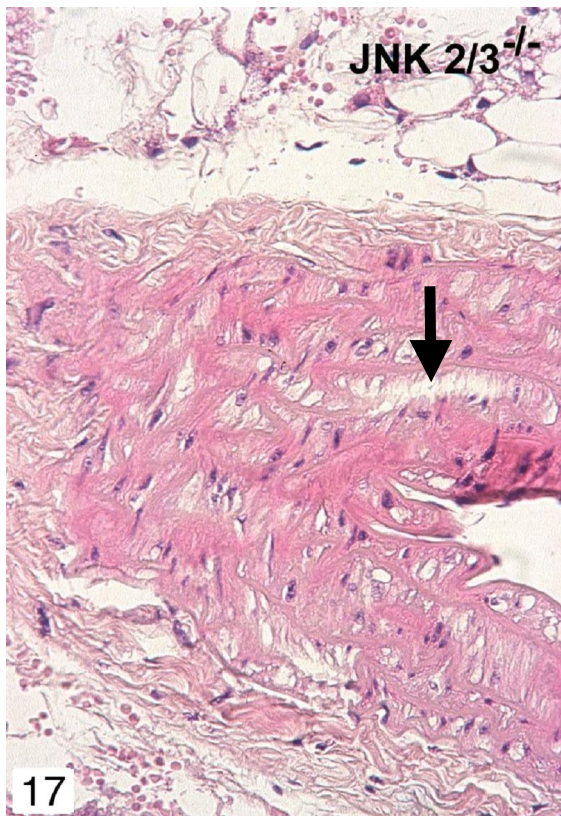


Abb. 17 Atherosklerotisches Gefäß

Atherosklerotisch verändertes Gefäß einer $JNK2/3^{-/-}$ Maus mit Atherom und Schaumzellen (Pfeil), HE-Färbung, 100-Fache Vergrößerung.

4 Diskussion

4.1 Primärdaten

Blutentnahme

Sicherlich hätte eine Blutzuckerbestimmung weitere interessante Hinweise auf das Vorliegen von Stoffwechselveränderungen durch den JNK2/3 Knockout geliefert. Um jedoch eine verlässliche Aussage über das Blutzuckerverhalten zu bekommen, hätte ein und dieselbe Maus mehrmals auf ihren Blutzuckerspiegel hin untersucht werden müssen. Da aber eine Maus aufgrund ihrer bescheidenen Gesamtblutmenge nur einen geringen Blutverlust toleriert, wäre die kontinuierliche Blutzuckermessung mit einer nicht unerheblichen Mortalitätsrate verbunden bzw. wäre sehr aufwändig gewesen. So wären z. B. auch Glukosetoleranztests denkbar gewesen (Hirosumi et al., 2002; Kaneto et al., 2004; Stebbins et al., 2008). In diesen Tests werden durch Schnitte in den Schwanz kontinuierlich Blutproben zur Analyse gewonnen. Da allerdings die Fettleibigkeit der Tiere im Focus dieser Arbeit stand und nicht primär der Blutzuckerspiegel, wurde ebenfalls darauf verzichtet.

Alternativ hätte nach der BE eine simple Blutzuckeranalyse mittels handelsüblichem Glukometer durchgeführt werden können (Abbasi et al., 2007). Die Ergebnisse dieser einmaligen Messung hätten weitere Anhaltspunkte bezüglich der Stoffwechsellage geliefert, wengleich es sich nur um Momentaufnahmen gehandelt hätte. Eine größere Aussagekraft hätte diese einmalige Blutzuckermessung bei vorherigem, zeitlich definiertem Futterentzug gehabt. Gegen eine solche Messung sprach allerdings die geringe Menge an Mäuseblut, welche selbst nach transkardialer Entnahme selten einen Milliliter übertraf. Priorität hatten in diesem Falle die untersuchten, ebenfalls aussagekräftigen Parameter. Auch eine Aufteilung der Blutproben für diesen Zweck wäre denkbar gewesen, ist aber nicht erfolgt, weil dies eine Verringerung der Blutprobenzahl für die Analyse der anderen Parameter bedeutet hätte.

4.2 Morphometrie

Fettzellgröße

An anderer Stelle dienten zur Darstellung der Fettzellgrößen lediglich Abbildungen von histologischen Fettgewebsschnitten bei identischer Vergrößerung (Hirosumi et al., 2002). Meine Absicht war es aber, die Fettzellgrößen zu quantifizieren. Die direkte

Größenbestimmung der dreidimensionalen Fettzellen ist in einem zweidimensionalen Schnittbild allerdings nicht durchzuführen. Entsprechend des Schnittes durch die Zelle ergeben sich verschiedene Schnittbilder. Trifft man eine Zelle nur tangential, so ergibt sich ein kleinerer Durchmesser als der maximal mögliche (äquatoriale). Deshalb musste die Größenbestimmung der Fettzellen über Umwege erfolgen.

Die Anzahl von großen Zellen in einem definierten Raum ist geringer als die von kleineren. Da dieses Verhältnis anhand eines Schnittes wiedergegeben werden kann, habe ich die Fettzellen pro Gesichtsfeld ausgezählt. Zusätzlich wurde deren Durchmesser mit einem Rasterokular bestimmt. Diese Methode wurde als verlässlich nachgewiesen (Smith et al., 1972). Aus diesen Ergebnissen habe ich auf die Fettzellgröße zurückgeschlossen. Nun könnten die Fettzellen generell eine andere Größenverteilung haben, z. B. am Rande der Fettgewebsschicht oder an Grenzschichten verschiedener Gewebe. Dagegen habe ich immer Gesichtsfelder aus dem Zentrum der Fettschicht gewählt.

4.3 Gewichtsentwicklung und Fettgewebe

Der simultane Knockout von JNK2 und JNK3 in einer C57BL/6 Maus führt zu signifikanter Fettleibigkeit. Weitere Mitspieler des Metabolischen Syndroms sind ebenfalls nachgewiesen worden. Die JNK2/3^{-/-} Mäuse entwickeln eine signifikante Hyperlipidämie und Hyperinsulinämie. Im Fettgewebe wie auch im Leberparenchym traten Stoffwechselveränderungen auf, die eine diabetische Stoffwechsellage und das Vorliegen eines Metabolischen Syndroms belegen (siehe Anhang). Ebenfalls sind bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen Hinweise auf eine Verfettung der Leber und Atherosklerose in Form von Schaumzellen gefunden worden.

Die JNK2/3^{-/-} Mäuse sind signifikant schwerer, verfügen über größere viszerale als auch subkutane Fettmengen und weisen vergrößerte Fettzellen auf. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die JNK1 Isoform mit der Entwicklung von Adipositas in Verbindung steht (Hirosumi et al., 2002 und andere). Zumal durch den JNK2/3 Knockout nur noch die JNK1 Isoform exprimiert werden kann und folglich diese für die aufgetretenen Veränderungen verantwortlich ist. Bezüglich der JNK2 Isoform decken sich die Ergebnisse meiner Arbeit nicht mit denen der Arbeitsgruppe um Hirosumi et al. (2002). Diese sah in Experimenten mit JNK2^{-/-} Mäusen keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung, der Fettzellgröße sowie bei den Blutwerten im Vergleich zu den Kontrolltieren. All diese Parameter sind aber bei den von mir untersuchten JNK2/3^{-/-} Mäusen signifikant verändert.

Fraglich ist nun, ob die Defizienz der hauptsächlich im ZNS auftretenden JNK3 Isoform direkt dafür verantwortlich ist oder ob die Adipositas durch eine Verhaltensveränderung der Mäuse aufgrund zentraler JNK3 Insuffizienz entsteht. Es könnte auch in Betracht gezogen werden, dass JNK aufgrund einer Insulindefizienz mit einer gesteigerten Futteraufnahme, z.B. durch die Störung der Neuropeptid Y-Achse, in Zusammenhang steht (Pedrazzini et al., 2003). Die Expression des orexigen wirkenden Neuropeptid Y war in den JNK2/3^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT und JNK1^{-/-} Mäusen verringert (Stahmer 2007). Bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen konnten keine anatomischen oder strukturellen Veränderungen im Gehirn nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde im Hypothalamus kein Unterschied bezüglich Expression und Aktivierung der JNK-Substrate ATF2 und c-Jun im Vergleich zum JNK1^{-/-} und WT bemerkt (Stahmer 2007).

Auch die übrigen, Adipositas beweisenden Parameter könnten durch ein gestörtes Fressverhalten bedingt sein. Da allerdings keine Verhaltensuntersuchungen durchgeführt wurden, kann hierzu keine Aussage getroffen werden.

4.4 Fettzellvergrößerung: JNK2/3^{-/-} oder Adipositas vermittelt?

JNK1 Insuffizienz führt zu verkleinerten Fettzellen, eine JNK2 Insuffizienz hat keinen Einfluss auf die Größe von Adipozyten (Hirosumi et al., 2002). Die Frage, ob die Vergrößerung der Fettzellen bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen direkt auf den JNK2/3 Knockout zurückzuführen ist, durch ein knockoutbedingtes Ungleichgewicht der JNK Isoformen bedingt ist oder ob es sich um eine Begleiterscheinung der ausgeprägten Adipositas handelt (Carlson et al., 2003; Guo et al., 2004), kann hier nicht geklärt werden.

4.5 Leberzellverfettung und Fettleibigkeit

Das Metabolische Syndrom und seine Komponenten (sowohl Adipositas als auch Diabetes mellitus Typ 2) sind mit Leberverfettung assoziiert (Riede et al., 2004; Yeh & Brunt, 2007). Fettleibigkeit ist einer der Hauptrisikofaktoren der Leberzellverfettung (Wantanabe et al., 2008). Die bisherigen Ergebnisse und die nachgewiesene Verfettung der Leberzellen der JNK2/3^{-/-} Mäuse unterstützt die Vermutung, dass der Knockout von JNK2 und 3 in den Versuchstieren zu einer Manifestation des Metabolischen Syndroms führt.

4.6 Kein Schutz vor Atherosklerose durch JNK2/3^{-/-} Genotyp

Übergewicht und Typ 2 Diabetes sind mit Atherosklerose vergesellschaftet (Boden et al., 2008; Esteghamati et al., 2008).

JNK2 ist maßgeblich an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt. JNK2^{-/-}Mäuse sind vor Schaumzellenformation geschützt und entwickeln demnach keine Atherosklerose (Ricci et al., 2004; Sumara et al., 2005). Im Rahmen meiner Arbeit habe ich allerdings Schaumzellen bei den JNK2/3^{-/-}Mäusen nachweisen können. Somit muss man annehmen, dass neben JNK2 noch andere Stimuli zur Entwicklung von Schaumzellen führen und JNK2 Insuffizienz nicht unbedingt vor Atherosklerose schützt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Dass ein JNK2/3 Knockout zu Fettleibigkeit führt, ist anhand der Ergebnisse dieser Arbeit belegt. Ferner wurden weitere Komponenten des Metabolischen Syndroms wie Fettleber, Atherosklerose, Hyperlipidämie, Hyperinsulinämie und Anzeichen einer diabetischen Stoffwechsellage bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen nachgewiesen. Tabelle 2 vergleicht die in dieser Arbeit erhobenen Befunde mit Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas. Fraglich ist nun, ob ein JNK2/3 Knockout direkt für die Adipositas der JNK2/3^{-/-} Mäuse verantwortlich ist oder ob diese durch eine Verhaltensveränderung der Mäuse aufgrund zentraler JNK3 Insuffizienz besteht. Auch die übrigen Befunde könnten sowohl primär durch den JNK2/3 Knockout bedingt sein als auch direkt durch ein gestörtes Essverhalten. Da allerdings keine Verhaltensuntersuchungen durchgeführt wurden, kann hierzu keine Aussage getroffen werden. Ferner ist keine genaue Aussage zu treffen, ob die JNK2/3 Insuffizienz bedingte Adipositas zu einem Diabetes mellitus Typ 2 führt (siehe Anhang).

JNK 2/3^{-/-}	Diabetes mellitus Typ 2	Adipositas
Erhöhtes Gewicht	✓ Carlson et al., 2003	✓ Esteghamati et al., 2008
Fettzellen vergrößert	✓ Carlson et al., 2003	✓ Guo et al., 2004
Atherosklerose	✓ Fujiwara et al., 2003	✓ Boden et al., 2008
Leberzellverfettung	✓ Yeh & Brund, 2007	✓ Wantanabe et al., 2008

Tabelle 2: Vergleich von Befunden bei JNK2/3 Insuffizienz, Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas im Nagetier und Mensch. Ein grünes Häkchen spricht für eine Übereinstimmung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass die JNK an der Pathologie des Metabolischen Syndroms beteiligt sind. Eine spezifische Inhibierung der JNK wird bereits als Therapieoption von Komponenten des Metabolischen Syndroms diskutiert (Kaneto et al., 2004; Zhao et al., 2006; Stebbins et al., 2008).

6 Anhang

Die Analyse der von mir entnommenen Organproben von Fettgewebe und Leber sowie das Serum wurden in Potsdam im Institut für Ernährung unter der Leitung von Frau Prof. Annette Schürmann durchgeführt. Hier, im Anhang, präsentiere ich die Ergebnisse und deren Diskussion.

6.1 Ergebnisse der Analyse von Fettgewebe, Leberparenchym und Serum

Die Real-time-PCR wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Annette Schürmanns Doktorandin Jana Buchmann am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE), Abteilung Pharmakologie durchgeführt und mir zur Verfügung gestellt.

6.1.1 Expressionsmuster des weißen Fettgewebes

6.1.1.1 Glukosetransporter 4 (Glut4)

Bei den JNK2/3^{-/-} Tieren ist im Vergleich zu den Wildtypen hoch signifikant verminderte Glut4 mRNA Expression festgestellt worden (relative Werte: $0,26 \pm 0,05$ vs. $1,11 \pm 0,19$, $p < 0,005$, Abb. 18).

6.1.1.2 Adiponektin

Die relative Expression von Adiponektin mRNA ist im Fettgewebe der JNK2/3^{-/-} Tiere mit $p < 0,05$ signifikant erniedrigt ($0,42 \pm 0,08$ vs. $1,43 \pm 0,42$ bei den WT, Abb. 18).

6.1.1.3 Fettsäuresynthese (FAS)

Die JNK2/3^{-/-} Mäuse verfügen im Gegensatz zu den Kontrolltieren über eine hoch signifikant erniedrigte Fettsäuresynthese im weißen Fettgewebe. Hier stehen die relativen Expressionsmuster der FAS mRNA mit $0,08 \pm 0,01$ bei den JNK2/3^{-/-} Tieren gegen $1,21 \pm 0,2$ bei den Kontrolltieren ($p < 0,005$, Abb. 18).

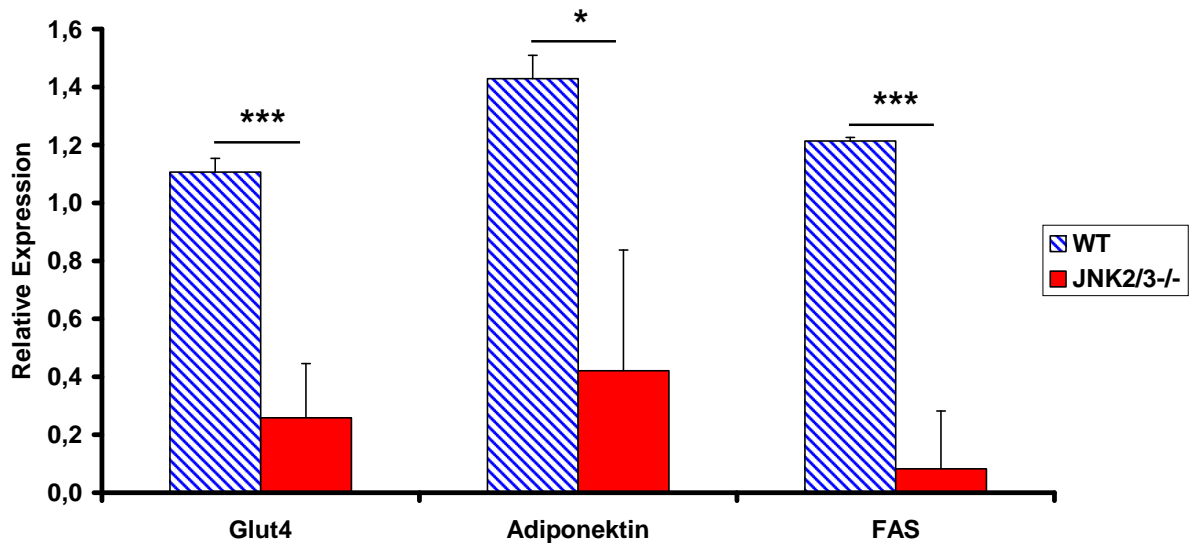


Abb. 18 Expressionsmuster des Fettgewebes I

Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA Expression von Glukosetransporter 4 (Glut4), Adiponektin und Fettsäuresynthese (FAS) im weißen Fettgewebe der WT und JNK2/3^{-/-}, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,005$, $n = 18$ (JNK2/3^{-/-}) bzw. 19 (WT).

6.1.1.4 Adipose Triglyceride-Lipase (ATGL)

Im Fettgewebe der JNK2/3^{-/-} Mäuse ist eine nicht signifikante Verminderung der Expression der ATGL mRNA gegenüber den WT zu verzeichnen (relative Werte: $0,39 \pm 0,06$ vs. $1,31 \pm 0,41$, $p = 0,093$, Abb. 19).

6.1.1.5 Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor Gamma (PPAR γ)

Die Analyse ergab eine signifikante Reduktion der relative PPAR γ -mRNA-Expression in den JNK2/3^{-/-} Maus Adipozyten im Vergleich zu den WT (rel. Werte $0,38 \pm 0,05$ vs. $1,07 \pm 0,15$, $p < 0,005$, Abb. 19).

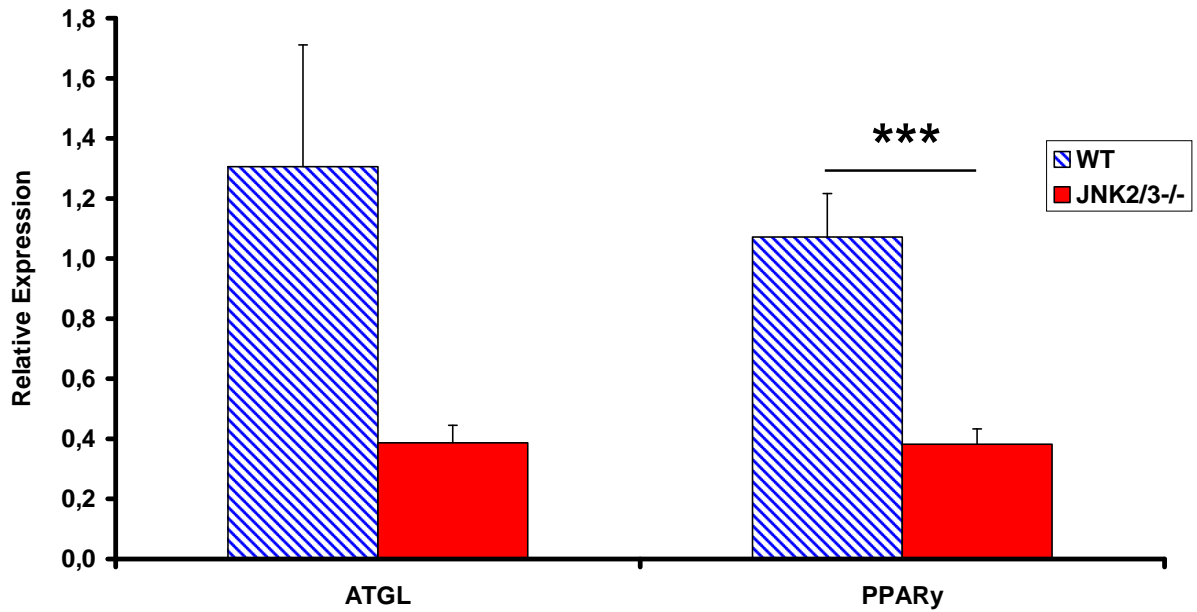


Abb. 19 Expressionsmuster des Fettgewebes II

Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA Expression von Adipose Triglyceride-Lipase (ATGL) und Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptor Gamma (PPAR γ) im weißen Fettgewebe der WT und JNK2/3^{-/-}, *** = $p < 0,005$, $n = 18$ (JNK2/3^{-/-}) bzw. 19 (WT).

6.1.2 Expressionsmuster der Leber

6.1.2.1 Kohlenhydratstoffwechsel der Leber

Die Glukokinase und die Pyruvatkinase, zwei Enzyme der Glykolyse, sind in der Leber der JNK2/3^{-/-} Mäuse nicht signifikant verändert. Ebenfalls nicht signifikant verändert ist die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, ein Enzym der Glukoneogenese (Abb. 20).

6.1.2.2 Fettstoffwechsel der Leber

Die Enzyme der Lipidsynthese (Fettsäuresynthese und Stearoyl-CoA Desaturase-1) und der Fettsäureoxidation (Langkettige Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase) sind in der Leber der JNK2/3^{-/-} Mäuse ebenfalls nicht signifikant verändert (Abb. 20).

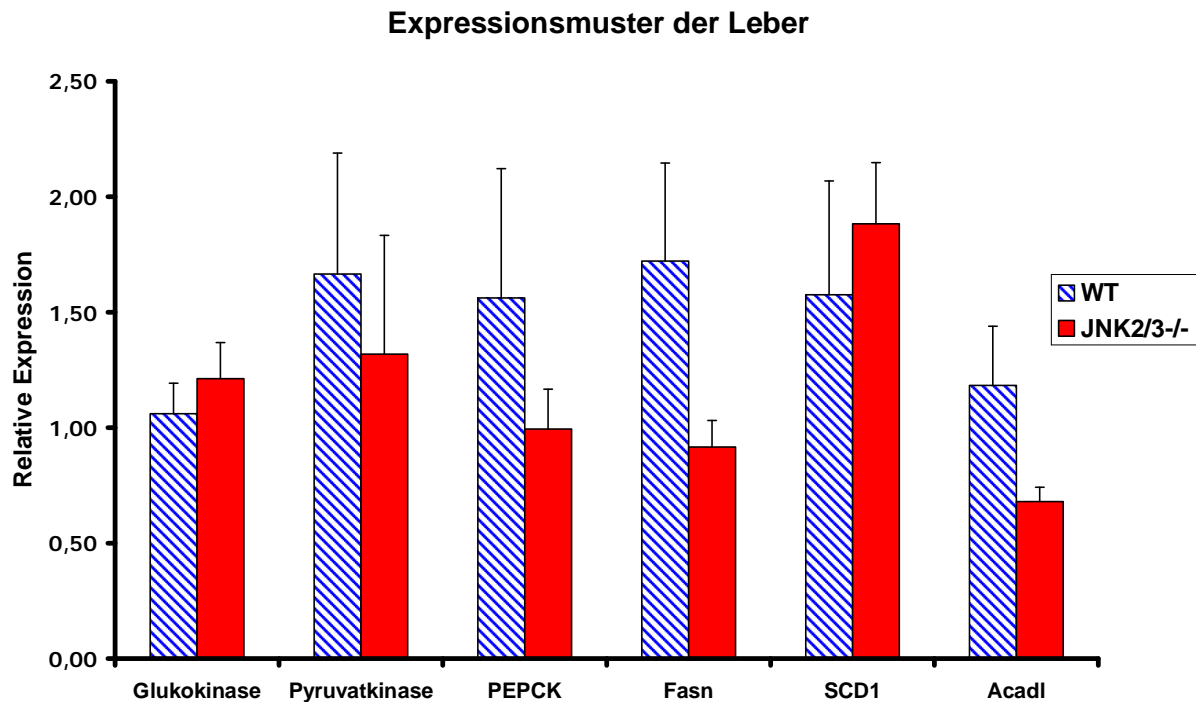


Abb. 20 Expressionsmuster der Leber

Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA Expression von Glukokinase, Pyruvatkinase, Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), Fettsäuresynthese (Fasn), Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) und Langkettige Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase (Acadl) in Hepatozyten der WT und JNK2/3^{-/-}, n= 18(JNK2/3^{-/-}) bzw. 19 (WT).

6.1.3 Blutanalyse

6.1.3.1 Insulin

Die Analyse des Serums aus dem Blut der Versuchstiere ergab, dass bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen eine signifikante Hyperinsulinämie ($2,0 \pm 0,4 \mu\text{g/l}$ vs. $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/l}$, $p < 0,05$) vorlag (Abb. 21).

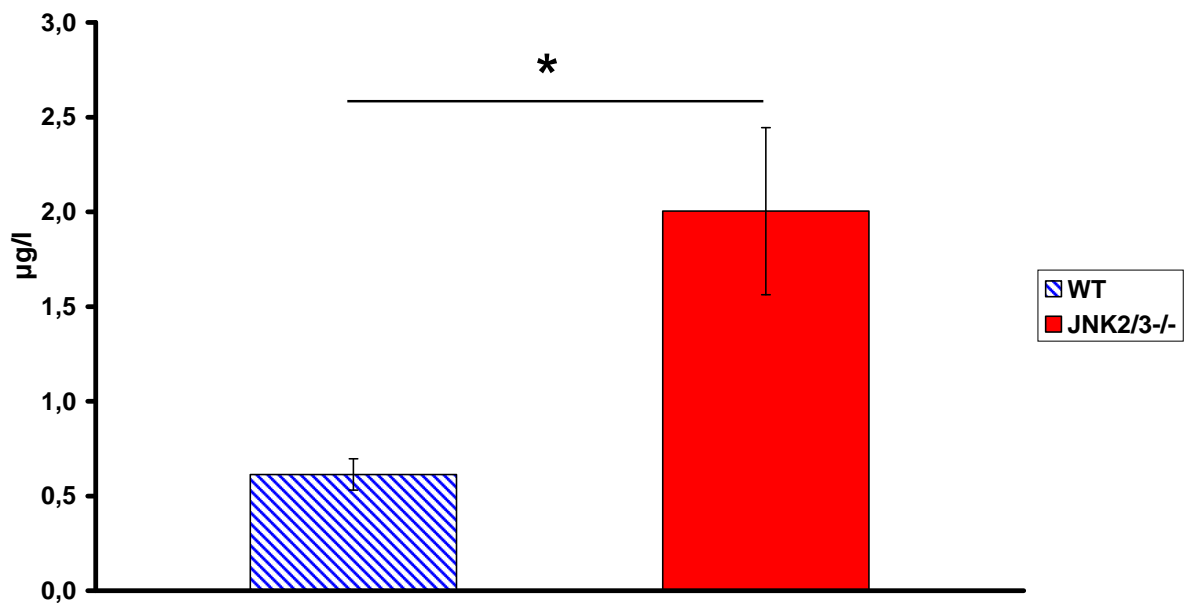


Abb. 21 Insulinspiegel

Mittelwerte \pm SEM der Seruminsulinspiegel in $\mu\text{g/l}$ bei den WT und JNK2/3^{-/-}, $n=17$, * = $p < 0,05$.

6.1.3.2 Triglyzeride und freie Fettsäuren

Die Triglyzeride waren im Serum der JNK2/3^{-/-} Mäuse ein wenig erhöht ($414,7 \pm 76,8 \mu\text{g/ml}$ vs. $356,3 \pm 60,5 \mu\text{g/ml}$, $p=0,626$), die freien Fettsäuren bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen waren signifikant erhöht ($0,42 \pm 0,1 \text{ nM}$ vs. $0,25 \pm 0,01 \text{ nM}$, $p<0,005$; Abb. 22 bzw. Abb. 23).

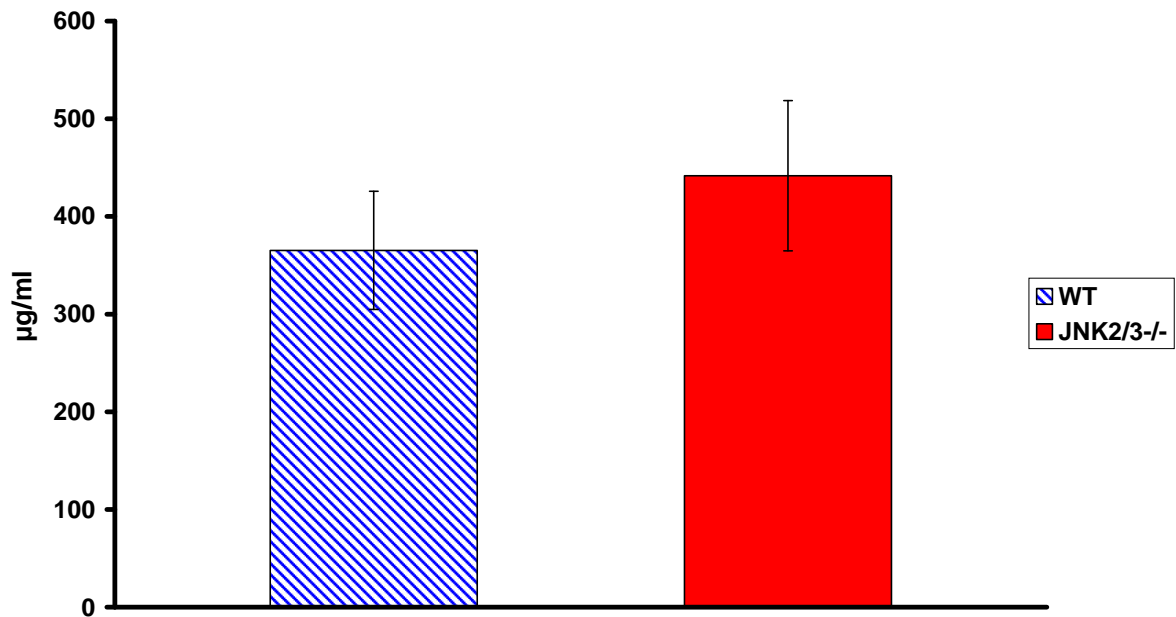


Abb. 22 Triglyzeridspiegel

Mittelwerte \pm SEM der Triglyzeridspiegel im Serum der JNK2/3^{-/-} Mäuse und WT in $\mu\text{g/ml}$, $n=18$ bzw. 19 , $p=0,626$.

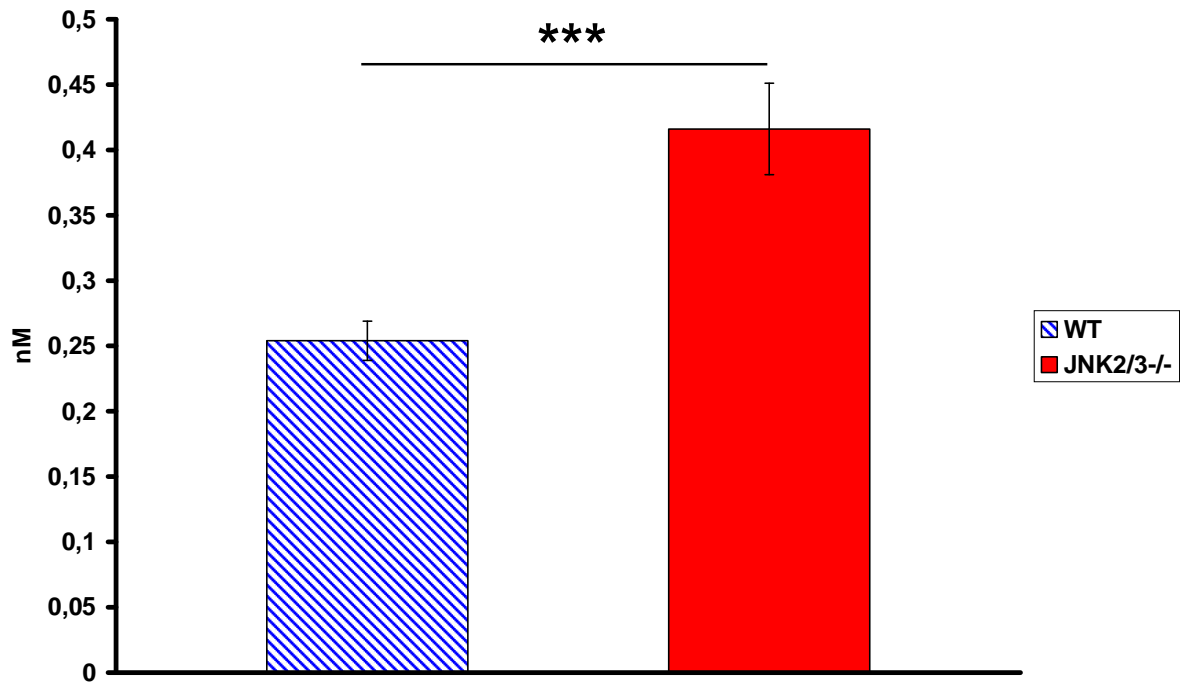


Abb. 23 Freie Fettsäuren

Mittelwerte \pm SEM der Spiegel der freien Fettsäuren in nM im Serum der JNK2/3^{-/-} Mäuse und WT, n=18 bzw. 19, *** = $p < 0,005$.

6.1.3.3 Gesamtcholesterin

Ebenfalls hoch signifikant ist der Unterschied des Gesamtcholesterins, welches im Serum der JNK2/3^{-/-} Tiere im Vergleich zu den WT erhöht war (145,3 ± 8,6 mg/dl vs. 81,0 ± 4,7 mg/dl, p<0,005, Abb. 24)

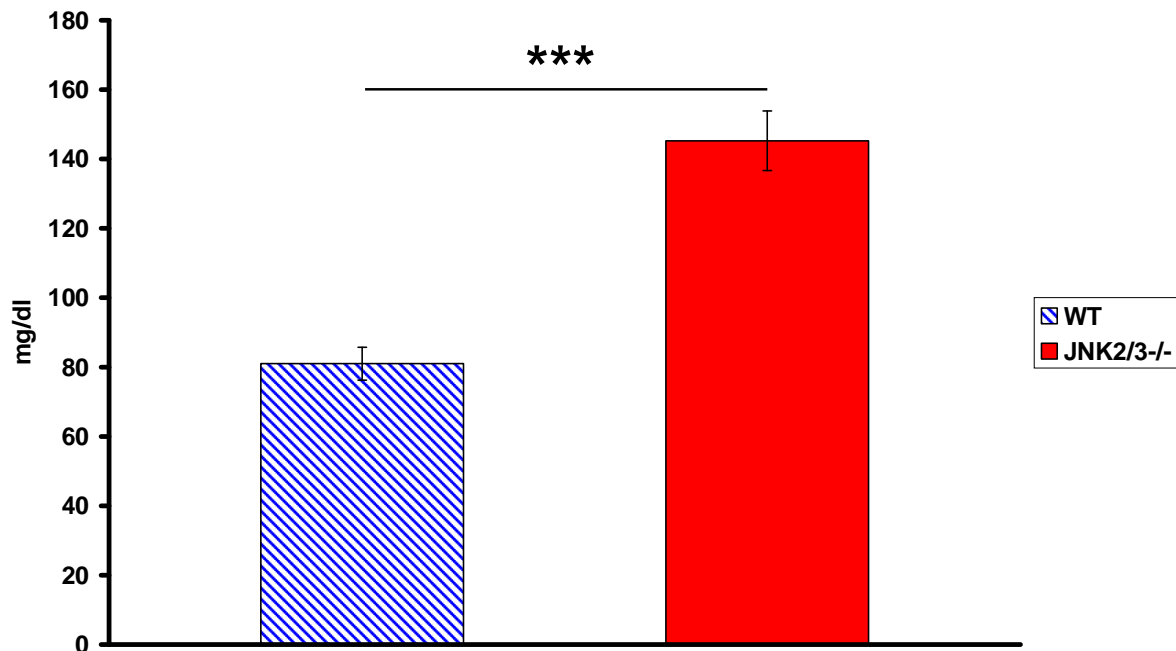


Abb. 24 Gesamtcholesterin

Mittelwerte ± SEM der Serumcholesterinspiegel bei den WT und JNK2/3^{-/-} in mg/dl, n=19 bzw. 18, *** = p<0,005.

6.2 Diskussion der Ergebnisse vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIFE)

Bei der Diskussion der in Potsdam erhobenen Daten der von mir gewonnen Gewebeproben beschränke ich mich hier lediglich auf den Zusammenhang mit der Literatur, um die Stoffwechsellage der JNK2/3^{-/-} Mäuse einordnen zu können. Da die Expressionsunterschiede des Lebergewebes ausnahmslos nicht signifikant sind, sind die dortigen Ergebnisse lediglich als Tendenzen anzusehen und zu werten.

6.2.1 Insulinresistenz des Fettgewebes

Im Fall einer diabetischen Stoffwechsellaage und Fettleibigkeit ist im Fettgewebe die Expression von **Glut4** vermindert (Carlson et al. 2003). Bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen ist dieser Parameter hoch signifikant vermindert, was für eine Insulinresistenz spricht.

Geringe **Adiponektinspiegel** sind Zeichen von verringerter Körper-Insulinsensitivität, vergrößerten Fettzellen, Adipositas und IR (Hotta et al., 2000; Skurk et al., 2007; Chandalia et al., 2007; Weyer et al., 2001). Die verminderte Adiponektinexpression in den Fettzellen der JNK2/3^{-/-} Mäuse spiegelt damit die Fettleibigkeit der JNK2/3^{-/-} Mäuse wieder und verstärkt die Hinweise auf das Vorliegen einer Insulinresistenz.

Insulin induziert die Expression von Adiponektin in Nagetieren (Scherer et al., 1995; Hu et al., 1996). Bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen ist jedoch trotz der Hyperinsulinämie die Adiponektin Expression vermindert. Dies wäre durch das Vorliegen einer IR zu erklären.

Wie bereits erwähnt, führt eine Aktivierung von JNK via JNK1 zu einer Hemmung, eine JNK1 Defizienz zu einer Erhöhung der Adiponektinproduktion in Adipozyten (Kim KY et al., 2005; Hirosumi et al., 2002). Eine weitere Ursache für die reduzierte Adiponektin Expression könnte demnach eine direkte Hemmung durch JNK1 sein, bzw. in der Fettleibigkeit zu sehen sein, welche ebenfalls mit einer Suppression von Adiponektin einhergeht (Weyer et al., 2001).

Die adipose triglyceride lipase (**ATGL**) und der Peroxysomenproliferator aktivierte Rezeptor γ (**PPAR γ**), welcher durch JNK1 supprimiert wird (Yang R et al., 2007), sind im weißen Fettgewebe der JNK2/3^{-/-} Mäuse signifikant vermindert. Dies spricht sowohl für eine Fettleibigkeit als auch für Diabetes mellitus Typ 2 (Memon et al., 2000; Villena et al., 2004).

Bei Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 ist die **FAS** mRNA-Expression deutlich erhöht (Berndt et al., 2007). Bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen dagegen zeigen die Analysen eine signifikante Minderung der Fettsäuresynthese, was gegen das Vorliegen von Diabetes und Adipositas bei den JNK2/3^{-/-} Tieren sprechen würde und im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen steht.

Zusammenfassend spricht das Expressionsmuster des weißen Fettgewebes (mit Ausnahme der FAS) für das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellaage und Adipositas bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen.

6.2.2 Fragliche Insulinresistenz in der Leber

Nicht ganz so eindeutig ist die Situation bei der Leber. Es gibt keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich einer Insulinresistenz oder Diabetes.

Die hepatische **Glukokinase**, welche bei Diabetes vermindert ist (Matschinsky et al., 2006), zeigt bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen eine nicht signifikante Erhöhung. Dies spricht gegen eine IR der Leber. Ebenso steht die nicht signifikant verminderte Expression der **PEPCK** im Widerspruch zu einer diabetischen Stoffwechsellage. Eine für Diabetes mellitus Typ 2 typische PEPCK Erhöhung (Matschinsky et al., 2006) kann im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden

Die **Fettsäuresynthese** ist im Fettgewebe und in der Leber der JNK2/3^{-/-} Mäuse verringert. Dies steht im Widerspruch zu dem typischen Expressionsmuster bei Diabetes (Kazumi et al., 1997; Ouadda et al., 2008).

Es gibt jedoch auch dezente Hinweise auf eine Insulinresistenz der JNK2/3^{-/-} Leber, wengleich diese nicht an das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ heranreichen.

Die nicht signifikant verminderte Fettsäureoxidation, ausgedrückt durch geringere **Acadl** mRNA Expression in den JNK2/3^{-/-} Maushepatozyten, spricht tendenziell für eine Insulinresistenz (Zhang et al., 2007). Ebenso verhält es sich bezüglich der leicht verringerten **Pyruvatkinase** der JNK2/3^{-/-} Mäuse. Bei Diabetes ist diese typischerweise vermindert (Weber et al., 1965; Chang & Schneider, 1971; Johnson & Venezia, 1980).

Die **SCD1** ist im Falle von Diabetes mellitus Typ 2 erhöht (Kazumi et al., 1997; Ouadda et al., 2008). In der Leber der JNK2/3^{-/-} Mäuse ist dieser Parameter nicht signifikant erhöht und kann damit eine diabetische Stoffwechsellage nicht beweisen.

Sowohl Fettsäuresynthese als auch SCD1 sind Schlüsselenzyme der Lipogenese. Bemerkenswert ist, dass diese beiden Parameter bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen eine gegensinnige Veränderung aufweisen. Da die FAS im Fettgewebe ebenfalls einer dort nachgewiesene diabetische Stoffwechsellage widerspricht, weist dies auf eine JNK2/3 Knockout spezifische Beteiligung hin.

6.2.3 Blutwerte

Hyperlipidämie bei den JNK2/3^{-/-} Mäusen

Die Erhöhung der **Triglyzeride**, **freien Fettsäuren** und des **Gesamtcholesterins** im Blut der JNK2/3^{-/-} Mäuse ist charakteristisch sowohl für Adipositas als auch für das Vorliegen von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 (Kim C et al., 2006; Boden & Laakso, 2004; Hotta et al., 2000; Ouadda et al., 2008; Uddin & Miah 1995; Broussard & Magnus 2008). Sowohl normalgewichtige JNK1^{-/-} und JNK2^{-/-} Mäuse weisen bezüglich dieser Blutwerte

keine Veränderungen auf. Bei adipösen $JNK2^{-/-}$ Mäusen zeigte sich im Gegensatz zu meinen Ergebnissen ein signifikant reduzierter Blutspiegel des Cholesterins (Tuncman et al., 2006). Dementsprechend ist bei den $JNK2/3^{-/-}$ Mäusen die $JNK3$ Insuffizienz und nicht die Adipositas für die Veränderung der Blutparameter ausschlaggebend.

Hyperinsulinämie bei den $JNK2/3^{-/-}$ Mäusen

Die signifikant erhöhten Insulinspiegel sprechen für eine Insulinresistenz, wie sie auch im Vorfeld von Typ 2 Diabetes auftritt. Somit gibt die Analyse des Blutes der $JNK2/3^{-/-}$ Mäuse Hinweise für das Vorliegen von Adipositas und Insulinresistenz.

Adipöse $JNK2^{-/-}$ Mäuse weisen keine erhöhten Insulinwerte auf (Tuncman et al., 2006). Dieses Erkenntnis deckt sich ebenfalls nicht mit den Ergebnissen meiner Arbeit. Wieder ist anzunehmen, dass diesbezüglich der zusätzliche $JNK3$ Knockout ausschlaggebend ist, wenngleich der Mechanismus hierfür nicht offensichtlich ist und es zur Klärung weitere Experimente bedarf.

Die Tabelle 3 gibt noch einmal Zusammenfassend die Befunde der $JNK2/3^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas wieder.

	JNK 2/3^{-/-}	Diabetes mellitus Typ 2	Adipositas
Blut	Hyperlipidämie	✓ Kim C et al., 2006	✓ Kim C et al., 2006 Roden et al., 2004
	Hypercholesterinämie	✓ Kim C et al., 2006	✓ Kim C et al., 2006
	Hyperinsulinämie	∅	✓ Gao et al., 2004
Fettgewebe	Adiponektin ↓	✓ Hotta et al., 2000 Kim KY et al., 2005	✓ Weyer et al., 2001 Kim KY et al., 2005
	Glut 4 ↓	✓ Carlson et al., 2003	✓ Carlson et al., 2003
	Fettsäuresynthese ↓	X Berndt et al., 2007	X Berndt et al., 2007
	ATGL ↓ (nicht signifikant)	✓ Villena et al., 2004	✓ Jocken et al., 2007
	PPARγ ↓	✓ Memon et al., 2000	✓ Memon et al., 2000
Leber	Glykolyse GK ↓ (nicht signifikant)	✓ Matschinsky et al., 2006	∅
	Glykolyse Pyruvatkinase ↓ (nicht signifikant)	✓ Weber et al., 1965	∅
	Lipidsynthese Fasn ↓ (nicht signifikant)	X Ouadda et al., 2008	∅
	Lipidsynthese SCD1 ↑ (nicht signifikant)	✓ Ouadda et al., 2008	✓ Jones et al., 1996
	Mitochondriale Fettsäureoxidation Acadl ↓ (nicht signifikant)	✓ Zhang et al., 2007	∅

Tabelle 3: Zusammenfassung und Einordnung der Untersuchungen der JNK2/3^{-/-} Mäuse im Bezug auf Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas. Ein grünes Häkchen spricht für, ein rotes X spricht gegen eine Übereinstimmung, ∅ = keine Informationen verfügbar.

7 Literaturverzeichnis

Abbasi M, Nakhjavani M, Hamidi S, Tarafdari AM, Esteghamati A (2007) Constant magnetic field of 50 mT does not affect weight gain and blood glucose level in BALB/c mice. *Med Sci Monit* 13:151-154.

Adler V, Schaffer A, Kim J, Dolan L, Ronai Z (1995) UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J Biol Chem* 270:26071–26077.

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF (2000) The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem* 275:9047–9054.

Bachar O, Adner M, Uddman R, Cardell LO (2004) Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways. *Eur J Immunol* 34:1196–1207.

Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Klötting N, Fasshauer M, Schön MR, Körner A, Stumvoll M, Blüher M (2007) Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50:1472-1480.

Boden G (2001) Free fatty acids: the link between obesity and insulin resistance. *Endocrinol Pract* 7:44–51.

Boden G, Laakso M (2004) Lipids and glucose in type 2 diabetes: what is the cause and effect? *Diabetes Care* 27:2253-2259.

Boden G, Song W, Pashko L, Kresge K (2008) In vivo effects of insulin and free fatty acids on matrix metalloproteinases in rat aorta. *Diabetes* 57:476-483.

Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH (1995) Cellular stresses differentially activate the c-Jun N-terminal protein kinases and the extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 270:29710–29717.

Bogoyevitch MA (2006) The Isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *BioEssays* 28:923-934.

Bogoyevitch MA, Kobe B (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:1061-1095.

Bollheimer LC, Skelly RH, Chester MW, McGarry JD, Rhodes CJ (1998) Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *J Clin Invest* 101:1094-1101.

Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willesen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan C Y, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell R. A, Davis R J, Herdegen T (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur J Neurosci* 21:363-377.

Broussard DL, Magnus JH (2008) Influence of cardiovascular disease risk factors on the relationship between low bone mineral density and type 2 diabetes mellitus in a multiethnic US population of women and men: A cross-sectional study. *Gender Medicine* 5:229-238.

Camp HS, Tafuri SR, Leff T (1999) c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* 140:392-397.

Carlson CJ, Koterski S, Sciotti RJ, Pocard GB, Rondinone CM (2003) Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes, potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 52:634-644.

Chandalia M, Lin P, Seenivasan T, Livingston EH, Snell PG, Grundy SM, Abate N (2007) Insulin resistance and body fat distribution in south asian men compared to caucasian men. *PLoS ONE* 2:e812.

Chang AY, Schneider DI (2001) Hepatic enzyme activities in streptozotocin-diabetic rats before and after insulin treatment. *Diabetes* 20:71-77.

Chen N, Nomura M, She QB, Ma WY, Bode AM, Wang L, Flavell RA, Dong Z (2001) Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH₂-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res* 61:3908-3912.

David JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF (2002) JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* 115:4317-4325.

Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239-252.

Dérjard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025-1037.

Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA (1998) Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282:2092-2095.

Dong C, Davis RJ and Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55–72.

Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* 23:4802–4812.

Esteghamati A, Khalilzadeh O, Anvari M, Ahadi MS, Abbasi M, Rashidiet A (2008) Metabolic syndrome and insulin resistance significantly correlate with body mass index. *Archives of Medical Research* 39:803-808.

Fujiwara S, Emoto M, Komatsu M, Motoyama K, Morioka T, Koyama H, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y (2003) Arterial wall thickness is associated with insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 10:246-252.

Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D (2004) Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 306:271–275.

Gao Z, Zhang XY, Zuberi A, Hwang D, Quon M J, Lefevre M, Ye J (2004) Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* 18:2024–2034.

Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B (1997) Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 272:30261-30269.

Guo KY, Halo P, Leibel RL und Zhang Y (2004) Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 287:112-119.

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh A J, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* 15:2760-2770.

Han Z, Chang L, Yamanishi Y, Karin M, Firestein GS (2002) Joint damage and inflammation in c-Jun N-terminal kinase 2 knockout mice with passive murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46:818-823.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595–1599.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 18:10697–10703.

Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:665–670.

Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205–219.

Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V (2000) Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 49:532–536.

Jaeschke A, Rincon M, Doran B, Reilly J, Neuberg D, Greiner DL, Shultz LD, Rossini AA, Flavell RA, Davis RJ (2005) Disruption of the JNK2 (Mapk9) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type 1 diabetes. *PNAS* 102:6931–6935.

Jocken JW, Langin D, Smit E, Saris WH, Valle C, Hul GB, Holm C, Arner P, Blaak EE (2007) Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2292–2299.

Johnson ML, Venezia CM (1980) Hormonal regulation of liver pyruvate kinase concentration and activity. *Biochemistry* 19:2191–2195.

Jones BH, Maher MA, Banz WJ, Zemel MB, Whelan J, Smith PJ, Moustaid N (1996) Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *Am J Physiol* 271:44–49.

Kaiser RA, Liang Q, Bueno O, Huang Y, Lackey T, Klevitsky R, Hewett Te, Molkenin JD, (2005) Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *J Biol Chem* 280:32602–32608.

Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC (2002) Involvement of c-Jun N-terminal Kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 277:30010-30018.

Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuika T, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M (2004) Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nature Medicine* 10:1128-1132.

Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuika T, Matsuhisa M, Yamasaki Y, (2005) Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:1595-1608.

Kazumi T, Odaka H, Hozumi T, Ishida Y, Amano N, Yoshino G (1997) Effects of dietary fructose or glucose on triglyceride production and lipogenic enzyme activities in the liver of Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM. *Endocr J* 44:239-245.

Keramaris E, Vanderluit JL, Bahadori M, Mousavi K, Davis RJ, Flavell R, Slack RS, Park DS (2005) c-Jun N-terminal kinase 3 deficiency protects neurons from axotomy-induced death in vivo through mechanisms independent of c-Jun phosphorylation. *J Biol Chem* 280:1132-1141.

Kim C, Park J, Park J, Kang E, Ahn C, Cha B, Lim S, Kim K, Lee H (2006) Comparison of body fat composition and serum adiponectin levels in diabetic obesity and non-diabetic obesity. *Obesity* 14:1164-1171.

Kim KY, Kim JK, Jeon JH, Yoon SR, Choi I, Yang Y (2005) c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327:460-446.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.

Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, Han Y, Taub R, Grimsby J (2006) The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55:1-12.

Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR (2000) Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- α) and PPAR- γ messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: Troglitazone induces expression of PPAR- γ -responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 141: 4021-4031.

Nguyen MTA., Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JJ, Zalevski J, Dahiyat BI, Chi NW, Olefsky JM (2005) JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280:3361-3371.

Ouadda ABJ, Levy E, Ziv E, Lalonde G, Sané AT, Delvin E, Elchebly M (2008) Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and type 2 diabetes is associated to AMPK signaling pathway upregulation in *Psammomys obesus*. *Bioscience Reports Immediate Publication*. Veröffentlicht am 08. Okt 2008.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress linked obesity, insulin activation, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461.

Pedrazzini T, Pralong F, Grouzmann E (2003) Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol Life Sci* 60:350-377.

Postic C, Dentin R, Girard J (2004) Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 30:398-408.

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353:670–673.

Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38:899–914.

Ricci R, Sumara G, Sumara I, Rozenberg I, Kurrer M, Akhmedov A, Hersberger M, Eriksson U, Eberli F, Becher B, Bore'n J, Chen M, Cybulsky MI, Moore KJ, Freeman MW, Wagner EF, Matter CM, Lüscher TF (2004) Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science* 306:1558–1561.

Riede UN, Werner M, Schäfer HE. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Auflage, Thieme 2004, Stuttgart.

Roden M (2004) How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci* 9:92-96.

Rogatsky I, Logan SK, Garabedian MJ (1998) Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2050-2055.

Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA (2007) TNF- α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—Effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 28:1050–1058.

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF (1999) Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 89:115-124.

Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ (2006) JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 43:163-172.

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* 270:26746–26749.

Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH (1998) Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2498-2502.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H (2007) Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metabol* 92:1023-1033.

Smith U, Sjöström L, Björntorp P (1972) Comparison of two methods for determining human adipose cell size. *Journal of Lipid Research* 13:822-824

Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M (2006) Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *PNAS* 103:16454-16459.

Srinivas H, Juroske DM, Kalyankrishna S, Cody DD, Price RE, Xu XC, Narayanan R, Weigel NL, Kurie JM (2005) c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signalling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol Cell Biol* 25:1054–1069.

Stahmer Caroline (2007) Die Rolle von JNK-Stresskinasen für die Fresskontrolle und den Energiehaushalt adulter Mäuse. Pharmakologische Diplomarbeit, Kiel.

Stebbins JL, De SK, Machleidt T, Becattini B, Vazquez J, Kuntzen C, Chen LH, Cellitti JF, Riel-Mehan M, Emdadi A, Solinas G, Karin M, Pellecchia M (2008) Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16809-16813.

Sumara G, Belwal M, Ricci R (2005) “Jnking” atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 6:2487–2494.

Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol* 170:295–304.

Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* 23:1889–1899.

Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS (2006) Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10741–10746.

Uddin F, Miah AK (1995) Lipid profile and its relation to fasting insulin level in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Bangladesh Med Res Counc Bull* 21:64-72.

Unger, R. H. (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesitydependent NIDDM: Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44:863–870.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287:664–666.

Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS (2004) Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279:47066-47075.

Watson, RT, Pessin, JE (2001) Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res* 271:75-83.

Wantanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki AA (2008) Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* 43:509–518.

Weber G, Stamm NB, Fisher EA (1965) Insulin: Inducer of Pyruvate Kinase. *Science* 149:65-67.

Weiss C, Schneider S, Wagner EF, Zhang X, Seto E, Bohmann D (2003) JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J* 22:3686–3695.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, and Tataranni PA, (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin

resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:1930-1936.

Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280:1378-1383.

Xie X, Gu Y, Fox T, Coll JT, Fleming MA, Markland W, Caron PR, Wilson KP, Su MS, (1998) Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure* 6:983–991.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* 389:865–870.

Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincón M, Flavell RA (1998) Differentiation of CD4⁺ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 9:575-585.

Yang R, Wilcox DM, Haasch DL, Jung PM, Nguyen PT, Voorbach MJ, Doktor S, Brodjian S, Bush EN, Lin E, Jacobson PB, Collins CA, Landschulz KT, Trevillyan JM, Rondinone CM, Surowy TK (2007) Liver-specific knockdown of JNK1 up-regulates proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β and increases plasma triglyceride despite reduced glucose and insulin levels in diet-induced obese mice. *J Biol Chem* 282:22765-22774.

Yeh MM, Brunt EM (2007) Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 128:837-847.

Yoshida H, Hastie CJ, McLauchlan H, Cohen P, Goedert M (2004) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* 90:352–358.

Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y (2005) JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature Cell Biol* 7:278–285.

Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, Hoshii Y, Tanaka N, Ricci R, Ishihara T, Esato K, Hamano K, Matsuzaki M (2005) Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med* 11:1330-1338.

Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F (2004) JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13:329–340.

Zhang D, Liu ZX, Choi CS, Tian L, Kibbey R, Dong J, Cline GW, Wood PA, Shulman GI (2007) Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic Steatosis and hepatic insulin resistance. *PNAS* 104:17075–17080.

Zhao H, Serby MD, Xin Z, Szczepankiewicz BG, Liu M, Kosogof C, Liu B, Nelson L, Johnson EF, Wang S, Pederson T, Gum RJ, Camplit JE, Haasch DL, Abad-Zapatero C, Fry EH, Randinone C, Trevillian JM, Sham HL, Liu G (2006) Discovery of potent, highly selective, and orally bioavailable pyridine carboxamide c-Jun NH₂-terminal kinase inhibitors. *J Med Chem* 49:4455-4458.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abl:	Abl tyrosin Kinase
Acadl:	Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase
Akt:	Serin/Threonin Protein Kinase
AP1	Transkriptionsfaktor AP-1
apM1:	adiponectin precursor
ASK:	Apoptosesignal regulierende Kinase
ATF2:	activating transcription factor 2
ATGL:	adipose triglyceride-lipase
Bad:	BCL2-associated agonist of cell death
Bax:	BCL2-associated X protein
BE:	Blutentnahme
Bim:	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BMI:	body mass index
db/db Mäuse:	Mäuse mit genetisch induziertem Diabetes
ER:	Endoplasmatische Retikulum
FAS:	Fettsäuresynthese im Fettgewebe
Fasn:	Fettsäuresynthese der Leber
FOXO4:	forkhead box protein O4
GF:	Gesichtsfeld
Glut4:	Glukosetransporter 4
HE:	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HPK:	hematopoietic progenitor kinase
IR:	Insulinresistenz
IRS1:	Insulin Rezeptor Substrat 1
IRE:	ER-Stress-Transmembran-Sensorproteinkinase
Itch:	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog
JNK:	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
JNK1/2/3 ^{-/-} :	JNK1/2/3 Knockout
JunD:	jun D proto-oncogene
LW:	Lebenswoche
MAPK:	mitogen activated protein kinase

MEKK:	mitogen activated protein kinase kinase
MKK:	gen-activated kinase
MLK:	mixed-lineage kinase
NPY:	Neuropetid Y
PBS:	phosphate buffered saline
PDX-1:	pancreatic and duodenal homebox factor-1
PEPCK:	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PFA:	Paraformaldehyd
PKC:	Proteinkinase C
PPAR γ :	Peroxisomenproliferator aktivierter Rezeptor γ
SAPK:	stress-activated MAP kinase
SCD1:	Stearoyl-CoA Desaturase-1
SD:	Standardabweichung
SEM:	standard error of the mean
TAK:	transforming growth factor β -activated kinase
TRAF2:	TNF Rezeptor Assoziierter Faktor 2
WT:	Wildtyp

9 **Abbildungsverzeichnis**

	Seite
Abb. 1: JNK Struktur	1
Abb. 2: Darstellung des JNK Signalwegs	3
Abb. 3: Körpergewicht	17
Abb. 4: JNK2/3 ^{-/-} Maus und Kontrolltier (WT) in der Aufsicht	18
Abb. 5: Körpergrößen	18
Abb. 6: Gewichtsverteilung	19
Abb. 7: Maussitus	20
Abb. 8: Nierenpaket	20
Abb. 9: Subkutanes Fettgewebe	21
Abb. 10: Fettzellen JNK2/3 ^{-/-}	22
Abb. 11: Fettzellen WT	22
Abb. 12: Fettzelldurchmesser	23

Abb. 13: Fettzellen pro Gesichtsfeld	23
Abb. 14: Organgewichte	24
Abb. 15: Leberverfettung	25
Abb. 16: Leberzellverfettung	25
Abb. 17: Atherosklerotisches Gefäß	26
Abb. 18: Expressionsmuster des Fettgewebes I	34
Abb. 19: Expressionsmuster des Fettgewebes II	35
Abb. 20: Expressionsmuster der Leber	36
Abb. 21: Insulinspiegel	37
Abb. 22: Triglyzeridspiegel	38
Abb. 23: Freie Fettsäuren	39
Abb. 24: Gesamtcholesterin	40

10 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: JNK Funktionen in vivo	5
Tabelle 2: Vergleich von Befunden bei JNK2/3 Insuffizienz, Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas	31
Tabelle 3: Zusammenfassung und Einordnung der Untersuchungen der JNK2/3 ^{-/-} Mäuse	44

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Thomas Herdegen danken. Durch seine packende und enthusiastische Art hat er mein Interesse für diese Arbeit geweckt und mich in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt. Er war stets bereit Fragen zu beantworten und ich fühlte mich rund um gut und kompetent betreut.

Er zeigte mir, dass sich wissenschaftliche Professionalität durchaus mit persönlicher Herzlichkeit kombinieren lässt, was mich hoffnungsvoll und fröhlich auf meine berufliche Zukunft blicken lässt.

Weiteren Dank auch an Lutz Römer, Ruwen Böhm, den weiteren Mitarbeitern der AG Herdegen und dem Personal des Tierstalls, die mir bei der Betreuung der Mäuse und Durchführung der Untersuchung geholfen haben.

Ein besonderes Dankeschön ist auch an Privat Dozent Dr. med. Martin Anlauf und dem pathologischen Institut der CAU Kiel unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Klöppel gerichtet. Herr Anlauf stand mir bei den makroskopischen und mikroskopischen Teilen der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite. Zudem hat er sich viel Zeit genommen um mir bei der wissenschaftlichen Gestaltung der Ergebnisse zu helfen.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei den Mitarbeitern der Pathologie für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Auch Frau Professorin Dr. Annette Schürmann und deren Doktorandin Jana Buchmann möchte ich hiermit ebenfalls danken. Sie führten die biochemische Analyse des Blutes und der Gewebe am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke durch und überließen mir die Daten zur Diskussion und Präsentation.

Ein wichtiges und herzliches Dankeschön besonders an meine Eltern, ohne deren finanzielle Unterstützung, Ermutigung und Anerkennung mein Medizinstudium und die Dissertation nicht in dieser Form zustande gekommen wären: *Vielen lieben Dank Mama und Papa!*

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tim Frederick Haß
 Geburtsdatum: 04.06.1981
 Geburtsort: Donauwörth

Schulbildung:

1987-1989 Grund- und Hauptschule Schlutup
 1989-1991 Kalanderschule Lübeck
 1991-1998 Geschwister-Prenski-Schule Lübeck
 1998-1999 Iowa City High School, Iowa, USA
 1999-2001 Geschwister-Prenski-Schule Lübeck
 2001 Abitur an der Geschwister-Prenski-Schule Lübeck
 (Note 2,0)

Zivildienst:

September 2001 – Juni 2002 Betreutes Wohnen der Brücke Lübeck gGmbH

Medizinstudium:

September 2002 – September 2006 Christian-Albrechts-Universität Kiel
 August 2004 Physikum (Note 2,6)
 September 2006 – April 2007 Universidad de La Laguna, Teneriffa, Spanien
 Seit April 2007 Christian-Albrechts-Universität Kiel
 Februar 2008 – Januar 2009 Praktisches Jahr:
 Urologie CAU Kiel
 Chirurgie Städtisches Krankenhaus Kiel
 Innere Medizin Kreiskrankenhaus Eckernförde

Famulaturen:

Juli – August 2005	Pathologie CAU Kiel
Februar - März 2006	Chirurgie Whangarei Hospital, Neuseeland
August 2006	Anästhesie Parkklinik Kiel
Oktober 2006	Nephrologie Hospital Universitario Canarias, Spanien
November 2006	Radiologie Servicio Canario de Saludo Santa Cruz, Spanien
Februar 2007	Urologische Praxis Santa Cruz, Spanien
Februar - März 2007	Allgemeinmedizinische Praxis Coralejo, Spanien
August 2007	Dermatologie CAU Kiel

Promotion:

Juni 2005 – Januar 2009	Experimentelle Arbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. med. Thomas Herdegen am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der CAU Kiel
Thema:	Defizienz der c-Jun N-terminalen Kinase und das Metabolische Syndrom

Arbeitstätigkeit:

Seit Juli 2005	Mitarbeiter der Kieler Arztnotrufzentrale der KV SH
----------------	---

Kiel, Januar 2009