

Einfluss der Protein Arginin Methyltransferase 6 auf die Adipogenese

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart

zur Erlangung der Würde eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Mirjam Gerstner

aus Karlsruhe

Hauptberichter: Prof. Dr. Jörn Lausen

Mitberichterin: Prof. Dr. Angelika Haußer

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 2024

Institut für Biomedizinische Genetik der Universität Stuttgart

2024

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2019 bis Juni 2024 am Institut für Biomedizinische Genetik an der Universität Stuttgart unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörn Lausen angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Adipogenese	1
1.2 Fett oder Knochen? Gegenseitige Regulierung von PPAR γ 2 und RUNX2	3
1.3 Transkriptionsfaktoren in der Adipogenese.....	6
1.3.1 C/EBPs.....	6
1.3.2 PPAR γ	7
1.3.3 Adipokine.....	11
1.4 Die Rolle von PPAR γ im Fettgewebe	12
1.4.1 Die Rolle von PPAR γ in weißem Fettgewebe	12
1.4.2 Die Rolle von PPAR γ in braunem Fettgewebe.....	13
1.4.3 Beige Adipozyten.....	14
1.5 Protein Arginin Methyltransferasen.....	16
1.5.1 PRMT6	16
1.5.2 Epigenetische Funktionen von PRMT6.....	17
1.5.3 Die Rolle von PRMT6 bei Krankheiten.....	18
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Materialien.....	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Computerprogramme.....	21
2.1.3 Medien	22
2.1.4 Bakterienstämme.....	23
2.1.5 Vektoren	23
2.1.6 Zelllinien	24

2.1.7	Verwendete Kits	25
2.1.8	Oligonukleotide.....	25
2.1.9	Antikörper	26
2.2	Proteinbiochemische Methoden	27
2.2.1	Herstellung von Zellextrakten	27
2.2.2	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	29
2.2.3	Immunoblotting / Western Blot.....	29
2.2.4	GST-Pulldown	30
2.2.5	Co-Immunopräzipitation (CoIP)	30
2.2.6	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	31
2.2.7	Sequenzielle ChIP (ChIP-ReChIP)	32
2.3	Molekularbiologische Methoden	32
2.3.1	Klonierung	32
2.3.2	Plasmidpräparation.....	35
2.3.3	Sequenzierung	35
2.3.4	Reverse Transkription - Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR).....	36
2.4	Zellbiologische Methoden	37
2.4.1	Kultivierung von Zelllinien	37
2.4.2	Immunofluoreszenz Mikroskopie	37
2.4.3	Adipogene Differenzierung und Oil-Red-O Färbung	38
2.4.4	Erzeugung der Lentiviren.....	38
2.4.5	Transduktion der Zellen	38
2.5	Nomenklatur	39
2.6	Statistik/Auswertung	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Expression von PRMT6 in der Adipogenese	40
3.2	PRMT6 hemmt die Adipogenese	45
3.3	Interaktion von PPAR γ mit PRMT6.....	47
3.4	Verlust von PRMT6 fördert die Adipogenese.....	50
3.5	Cofaktoraustausch am <i>C/EBPα</i> Promotor.....	53

3.6	Der Knockout von Ppar γ verhindert die adipogene Identität	55
3.7	PRMT6 beeinflusst die Adipogenese nicht allein	57
3.8	Interaktion von PRMT6 und RUNX2	60
4	Diskussion	61
4.1	PRMT6 ist in MSCs vorhanden und nimmt während der Adipogenese ab	61
4.2	Einfluss von PRMT6 auf die Adipogenese	63
4.3	Interaktion von PPAR γ und PRMT6	65
4.4	Die Aktivität von PRMT6 hält C/EBP α in einem aktivierbaren Zustand	66
4.5	Knockout von PPAR γ führt zum Verlust der adipogenen Identität	68
4.6	Interaktion von PRMT6 und RUNX2	69
5	Kurzzusammenfassung	71
6	Summary	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Anhang	96
8.1	Adipogenese in ST2 Zellen	96
8.2	Adipogenese in M2 Zellen	97
8.3	Inhibierung von PRMT6 reduziert H3R2me2a in M2 Zellen	98
8.4	Cofaktoraustausch am C/EBP α Promotor in M2 Zellen	99
8.5	Cofaktoraustausch am PPAR γ Promotor in ST2 Zellen	100
8.6	Verwendete Puffer	101
	Publikationen und Posterpräsentationen	103
	Danksagung	104
	Eigenständigkeitserklärung	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wellen der Adipogenese	3
Abbildung 2: Adipogene und osteogene Differenzierungswege in MSCs	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Isoformen von PPAR γ	8
Abbildung 4: Einzelzell-mRNA-Sequenzierung von PRMT6.....	40
Abbildung 5: Genexpression während der Adipozyten Differenzierung	41
Abbildung 6: Färbung des eingelagerten Fetts in den Zellen.....	42
Abbildung 7: Immunofluoreszenzfärbung von Prmt6	43
Abbildung 8: Prmt6 während der Adipogenese	44
Abbildung 9: Prmt6 unterliegt nicht der proteasomalen Degradierung.....	45
Abbildung 10: Prmt6 hemmt die Adipogenese	46
Abbildung 11: Interaktion von PPAR γ und PRMT6 auf Proteinebene.....	48
Abbildung 12: Interaktion von Prmt6 und Ppar γ auf Chromatinebene	49
Abbildung 13: Prmt6 Knockout verstärkt die Adipogenese	51
Abbildung 14: Inhibierung von Prmt6 fördert die Adipogenese	52
Abbildung 15: Cofaktoraustausch am <i>C/ebpα</i> Promotor.....	54
Abbildung 16: Knockout von Ppar γ verhindert die Adipogenese	56
Abbildung 17: Einfluss des Ppar γ Knockouts auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren am <i>C/ebpα</i> Promotor	58
Abbildung 18: Einfluss des Ppar γ Knockouts auf die Histonmodifikationen am <i>C/ebpα</i> Promotor.....	59
Abbildung 19: Interaktion von Prmt6 und Runx2	60
Abbildung 20: Schematische Darstellung von Prmt6 innerhalb der Ppar γ - <i>C/ebpα</i> Vorwärtsschleife	66
Abbildung 21: Prmt6 ist Teil eines Corepressorkomplexes.....	69
Abbildung A 1: Genexpression in ST2 Zellen während der Adipozyten Differenzierung	96
Abbildung A 2: Genexpression in M2 Zellen während der Adipogenese	97
Abbildung A 3: Differenzierungskapazität von M2 Zellen	97
Abbildung A 4: Inhibierung von Prmt6 reduziert H3R2me2a in M2 Zellen	98
Abbildung A 5: Cofaktoraustausch am <i>C/ebpα</i> Promotor in M2 Zellen	99
Abbildung A 6: Cofaktoraustausch am <i>Pparγ</i> Promotor in ST2 Zellen.....	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	21
Tabelle 2: Computerprogramme	21
Tabelle 3: Nährmedien für die Bakterienkultur	22
Tabelle 4: Zellkulturmedien	22
Tabelle 5: Mediumzusätze im Adipozyten Differenzierungsmedium	23
Tabelle 6: Verwendete Vektoren	23
Tabelle 7: Klonierungsprimer	24
Tabelle 8: Verwendete Kits	25
Tabelle 9: Real-time PCR Primer	25
Tabelle 10: Real-time PCR TaqMan Assays	25
Tabelle 11: ChIP Primer	26
Tabelle 12: Primärantikörper für die Immunofluoreszenz	26
Tabelle 13: Antikörper für die ChIP	26
Tabelle 14: Primärantikörper im Western Blot	27
Tabelle 15: Sekundärantikörper im Western Blot	27
Tabelle 16: Zusammensetzung des NEB-Puffers	28
Tabelle 17: ChIP Lysepuffer	31
Tabelle 18: ChIP Waschpuffer	31
Tabelle 19: ChIP Wasch- & Elutionspuffer	31
Tabelle 20: Beispielhafte Reaktionsansätze bei der ChIP-reChIP	32
Tabelle 21: PCR-Reaktionsansätze für die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	33
Tabelle 22: PCR-Bedingungen	33
Tabelle 23: Ansetzen eines Restriktionsverdaus	34
Tabelle 24: Ligationsansatz	34
Tabelle 25: Zusammensetzung der qRT-PCR-Ansätze	36
Tabelle 26: PRMTs, deren Rolle bei der Adipogenese untersucht wurden	63
Tabelle 27: Zusammensetzung 10x SDS-Laufpuffer	101
Tabelle 28: Zusammensetzung 5x SDS-PAGE Auftragspuffer	101
Tabelle 29: Zusammensetzung 10x Towbin Puffer	101
Tabelle 30: Zusammensetzung 1x Towbin Puffer	101
Tabelle 31: Zusammensetzung 10x TBS	101
Tabelle 32: Zusammensetzung 1x TBS-T	102

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Amp	Ampicillin
Adipoq	Murines Adiponektin
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin, auch SAM
ASC	Fettstammzellen
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAT	Braunes Fettgewebe
B2m	β-2-Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Carm1	Coaktivator-assoziierte Arginin-Methyltransferase 1
CBP	CREB-bindendes Protein
C/ebpα	CCAAT/enhancer-bindendes Protein α
C/ebpβ	CCAAT/enhancer-bindendes Protein β
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIP-reChIP	Sequenzielle Chromatin-Immunopräzipitation
CoIP	Co-Immunopräzipitation
CREB	cAMP-Regulatorelement bindendes Protein
Ct	Zyklus-Schwellenwert (qRT-PCR)
CTRL	Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> Bakterien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verbessertes grünfluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Fapb4	Murines Fettsäuren bindendes Protein 4

FABP4	Humanes Fettsäuren-bindendes Protein 4
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
g	<i>Gramm</i>
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H3R2me2a	asymmetrische Dimethylierung am Arginin 2 des Histons H3
H3K4me3	Trimethylierung am Lysin 4 des Histons H3
HRP	Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGEPAL	Octylphenoxy-poly(ethyleneoxy)ethanol
IgG	Immunglobulin G
kDA	Kilodalton
l	Liter
LSM	Laser Scanning Mikroskop
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitrogenaktivierte Proteinkinase
mBMSC	Stromazellen aus dem Knochenmark einer Maus
mg	Milligramm
miRNA	Kurze, nicht kodierende RNA
min	Minuten
ml	Milliliter
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
mRNA	Boten-RNA
ms	Maus
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
noRT	Ohne Reverse Transkriptase
OD	Optische Dichte
p	P-Wert beim Testen der Signifikanz
pAb	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Magnesium, ohne Calcium
PBS ^{+/+}	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Magnesium, mit Calcium
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin

PI	Proteinase-Inhibitor
Ppar γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ
Ppar γ 1	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ 1
Ppar γ 2	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ 2
PPRE	PPAR-Response-Elemente
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase
Prmt6	Murine Protein Arginin-Methyltransferase 6
PRMT6	Humane Protein Arginin Methyltransferase 6
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Reverse Transkriptase quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
rb	Hase
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	5-Carboxy-Rhodamin-X
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Raumtemperatur
RUNX1	Humaner Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 1
RUNX2	Humaner Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2
Runx2	Muriner Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 1
RXR α	Humaner Retinoid-X-Rezeptor alpha
Rxr α	Muriner Retinoid-X-Rezeptor alpha
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBP/Tbp	TATA bindendes Protein
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Octoxinol 9, <i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol
U	Units
UCP1	Thermogenin (entkoppelndes Protein 1)
V	Volt
WAT	Weißes Fettgewebe

1 Einleitung

1.1 Adipogenese

Fettgewebe speichert überschüssige Energie und sezerniert verschiedene Adipokine und Lipidmetaboliten, um die systemische Energiehomöostase zu regulieren [1, 2]. Reife Adipozyten enthalten einen einzelnen großen Fetttropfen, der von einem dünnen Rand aus Zytoplasma umgeben ist. Ausgelöst durch lipolytische Hormone, wandern Lipasen an die Oberfläche des Fetttropfens, wo die Lipolyse von Triglyceriden stattfindet. Zusätzlich sind Hilfsproteine wie Perilipin an die Oberfläche des Fetttropfens gebunden, die den Prozess erleichtern. So werden Fettsäuren aus Triglyceriden in den Blutstrom freigesetzt, um periphere Gewebe zu versorgen. In Zeiten einer übermäßigen Kalorienzufuhr synthetisieren lipogene Enzyme Triglyceride, die in die Fetttröpfchen eingelagert werden [3–6].

Fettgewebe werden anatomisch gesehen in zwei große Fettdepots eingeteilt, das viszerale und das subkutane Fettgewebe. Schon die Fettstammzellen (ASCs) unterscheiden sich funktionell in der Lipolyse, dem adipogenen Potenzial und der thermogenen Aktivität. Bei Adipositas sind die ASC-Proliferation und die *de novo* Adipogenese erhöht [1, 7].

Unter Adipogenese versteht man die Umwandlung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in Präadipozyten, die sich zu Adipozyten differenzieren. MSCs, die aus dem vaskulären Stroma des Fettgewebes rekrutiert werden, stellen einen unbegrenzten Vorrat an Adipozytenvorläufern zur Verfügung [3, 8].

Die aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen (ASCs) sind eine Untergruppe der mesenchymalen Stammzellen, die leicht aus Fettgewebe gewonnen werden können und viele der gleichen regenerativen Eigenschaften wie andere MSCs besitzen [8–10]. ASCs expandieren *in vitro* und haben die Fähigkeit, in mehrere Zelllinien zu differenzieren, was die Möglichkeit bietet, verschiedene Gewebe zu reparieren, zu erhalten oder zu verbessern. Da menschliches Fettgewebe mit einem minimalinvasiven Verfahren leicht in großen Mengen gewonnen werden kann, ist die Verwendung körpereigener ASCs sowohl für die regenerative Medizin als auch für Organe, die durch Verletzungen und Krankheiten geschädigt wurden, vielversprechend [8, 10].

ASCs werden bei der Behandlung von schweren Symptomen bei Atrophie, Fibrose, Retraktion und Geschwüren, die durch Strahlentherapie verursacht werden, eingesetzt. Zudem werden sie bei der pathologischen Wundheilung eingesetzt. Die positive Wundheilungswirkung basiert darauf, dass ASCs die Angiogenese und/oder die

Vaskularisierung fördern, die Immunantwort modulieren und die Epithelbildung begünstigen. ASC können den Wundheilungsprozess höchstwahrscheinlich verbessern, indem sie die Angiogenese und/oder Vaskularisierung fördern, die Immunantwort modulieren und die Epithelisierung der Wunde einleiten [8, 9]. Darüber hinaus finden ASCs weitere Anwendungsbereiche bei der akuten Graft-Versus-Host Disease, sowie hämatologischen und immunologischen Erkrankungen wie der Erythrozytenaplasie [8].

Die Differenzierung von MSCs in spezielle Zelllinien wie Adipozyten oder Osteozyten wird durch die zeitlich abgestimmte Expression von zelltyp-spezifischen Genen erreicht. Die Kenntnis über die fundamentalen Prozesse der MSC-Differenzierung ist essenziell um Krankheiten wie Adipositas, Osteoporose, Knochenerkrankungen, Diabetes oder Krebs zu verstehen. Der verstärkte Gebrauch von MSCs in therapeutischen Anwendungen basiert auf detailliertem Wissen der MSC-Biologie. Die Adipogenese wird durch zelltyp-spezifische Transkriptionsfaktoren wie C/EBP β , PPAR γ und C/EBP α bestimmt. Diese regulieren sich gegenseitig und rekrutieren epigenetische Cofaktoren zu ihren Zielgenen, um deren Genexpression zu aktivieren oder zu unterdrücken. Epigenetische Cofaktoren spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung und Unterdrückung der zelltyp-spezifischen Genexpression. Diese haben die Fähigkeit Histone oder die DNA zu modifizieren, wodurch die Chromatinstruktur verändert wird, sodass die Errichtung von Genexpressionsprogrammen erreicht werden kann [3, 11–14]. Durch die dynamische 3D-Struktur des Genoms werden Chromatininteraktionen zwischen Enhancern und Promotoren verhindert oder erst möglich, so dass über die Chromatinzugänglichkeit die Genregulation gesteuert werden kann [15, 16]. Auch Long non-coding RNAs (lncRNAs) spielen bei der Adipogenese eine Rolle [17–20]. Einige lncRNAs sind am Wnt/ β -Catenin Signalweg beteiligt, welcher die Adipogenese hemmt [19], wiederum andere verhindern die Umgestaltung des Zytoskeletts, ein Schlüsselereignis zur Entwicklung der reifen Adipozyten [18]. Neben den lncRNAs haben auch miRNAs (miRNAs) einen regulatorischen Einfluss auf die Adipogenese [21–27]. MiR-26a und MiR-26b wurden als Schlüsselregulatoren für die Differenzierung weißer und beiger Adipozyten beim Menschen identifiziert und stellen positive Regulatoren der braunen Adipogenese dar. Die MiR-26-Familie besteht aus drei Mitgliedern (MiR-26a1, MiR-26a2 und MiR-26b), die in der frühen Adipogenese hochreguliert werden und deren Hemmung die Lipidakkumulation verhindert [21, 25, 27].

Die terminale Differenzierung von Adipozyten ist durch drastische Transkriptionsveränderungen, die Bildung von Lipidtröpfchen (Fetttröpfchen) und die Expression adipozytärer Markergene gekennzeichnet. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch das CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) und den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma (PPAR γ) reguliert. PPAR γ und C/EBP α regulieren

sich gegenseitig über positive Rückkopplungsschleifen und transaktivieren nachgeschaltete Zielgene wie das Fettsäure-bindende Protein 4 (FABP4), Adiponektin (ADIPOQ), Lipoproteinlipase (LPL) und Solute Carrier Family 2 Member 4 (SLC2A4) [15, 28–31]. Sie sind wesentlich für die Initiierung des adipogenen Genexpressionsmusters und gelten daher als Masterregulatoren der Adipogenese [12, 32, 33].

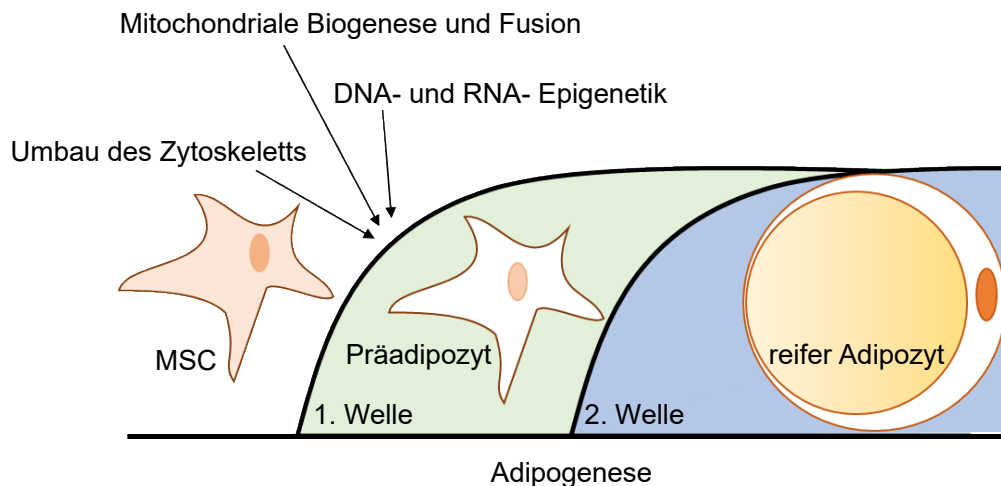


Abbildung 1: Wellen der Adipogenese

Schematische Darstellung der Adipogenese und wichtiger Mechanismen, die an der Bildung von reifen Adipozyten beteiligt sind. In der ersten Welle der Adipogenese reagieren MSCs auf spezifische chemische und physikalische Reize. In der zweiten Welle bauen weiße Präadipozyten Lipide als Energiespeicher auf und exprimieren Adipokine. Dies wird hauptsächlich durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, die zeitabhängig aufeinander abgestimmt sind, reguliert. Abbildung verändert nach [34].

1.2 Fett oder Knochen? Gegenseitige Regulierung von PPAR γ 2 und RUNX2

Die Differenzierung von MSCs in Adipozyten und Osteoblasten wird durch Differenzierungsregulatoren gegensätzlich reguliert [35–37], siehe Abbildung 2.

Für welche Differenzierungslinie sich die Zelle entscheidet, kann durch Umweltreize ausgelöst werden, die bei Osteoblasten aus BMP- und Wnt-Signalen und bei Adipozyten aus Fettsäuren und hormoneller Stimulation bestehen. Diese Reize führen dann zu einer transkriptionellen Hochregulierung von zwei Schlüsselproteinen: PPAR γ 2 oder RUNX2. Die wechselseitige Regulierung dieser beiden Transkriptionsfaktoren umfasst die Aktivität des Wnt-Signalwegs, die RUNX2 hochreguliert und PPAR γ 2 unterdrückt, sowie die unterdrückende Wirkung von PPAR γ 2 auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs und die Expression von RUNX2 [37, 38].

Ein weiterer Mechanismus, der auf der Ebene der Aktivität beider Proteine wirkt, ist der transkriptionelle Coaktivator mit PDZ-bindendem Motiv (TAZ), der die RUNX2-abhängige Transkription coaktiviert und die der PPAR γ -abhängigen Gentranskription unterdrückt [38, 39].

Die Aktivierung von PPAR γ erfolgt durch die Bindung eines spezifischen Liganden und eines weiteren Rezeptors, RXR α . Thiazolidindione wirken als Agonisten von PPAR γ , was die Adipogenese fördert und die Osteogenese irreversibel unterdrückt. Die Induktion der Adipogenese durch TZDs resultiert in einer sofortigen Hochregulierung der PPAR γ -abhängigen Gentranskription und in einer sofortigen Herunterregulierung der RUNX2-abhängigen Transkription. Dieser Effekt tritt sogar auf, bevor Veränderungen in der Expression dieser Faktoren beobachtet werden. Eine solche schnelle Regulierung wird auf Ebene der posttranslationalen Modifikationen erreicht [37, 38, 40].

Die Transkriptionsaktivitäten von PPAR γ 2 und RUNX2 werden durch ähnliche posttranslationale Modifikationen reguliert, jedoch mit entgegengesetztem Ergebnis. Dieselbe p38 MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) vermittelt die Serin-Phosphorylierung, die zur Aktivierung von RUNX2 und zur Inaktivierung von PPAR γ 2 führt. Die Proteinphosphorylierung wird durch einen Prozess der Dephosphorylierung ausgeglichen. Beide Proteine werden durch die Protein-Phosphatase 5 gleichzeitig dephosphoryliert, was zur Aktivierung von PPAR γ 2 und zur Inaktivierung von RUNX2 führt. Dieser Mechanismus wirkt auf die Transkription von Osteocalcin, eines späten Markers der Osteblastenentwicklung [38, 41].

Darüber hinaus beeinflussen weitere Regulationsnetzwerke das Gleichgewicht zwischen Adipogenese und Osteogenese. Ein Mangel des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in osteoblastischen Vorläuferzellen führt zur Entwicklung eines Osteoporose-ähnlichen Phänotyps und zu erhöhtem Knochenmarkfett [42]. Das Homeobox-Protein MSX-2 hemmt zudem sowohl die Expression als auch die Transkriptionsaktivität von PPAR γ und blockiert die adipozytäre Differenzierung von MSCs [36, 43]. Die Osteogenese wird durch viele der wichtigsten Entwicklungssignalwege reguliert, darunter der BMP-, der Wnt- und der RUNX2-Signalweg [44].

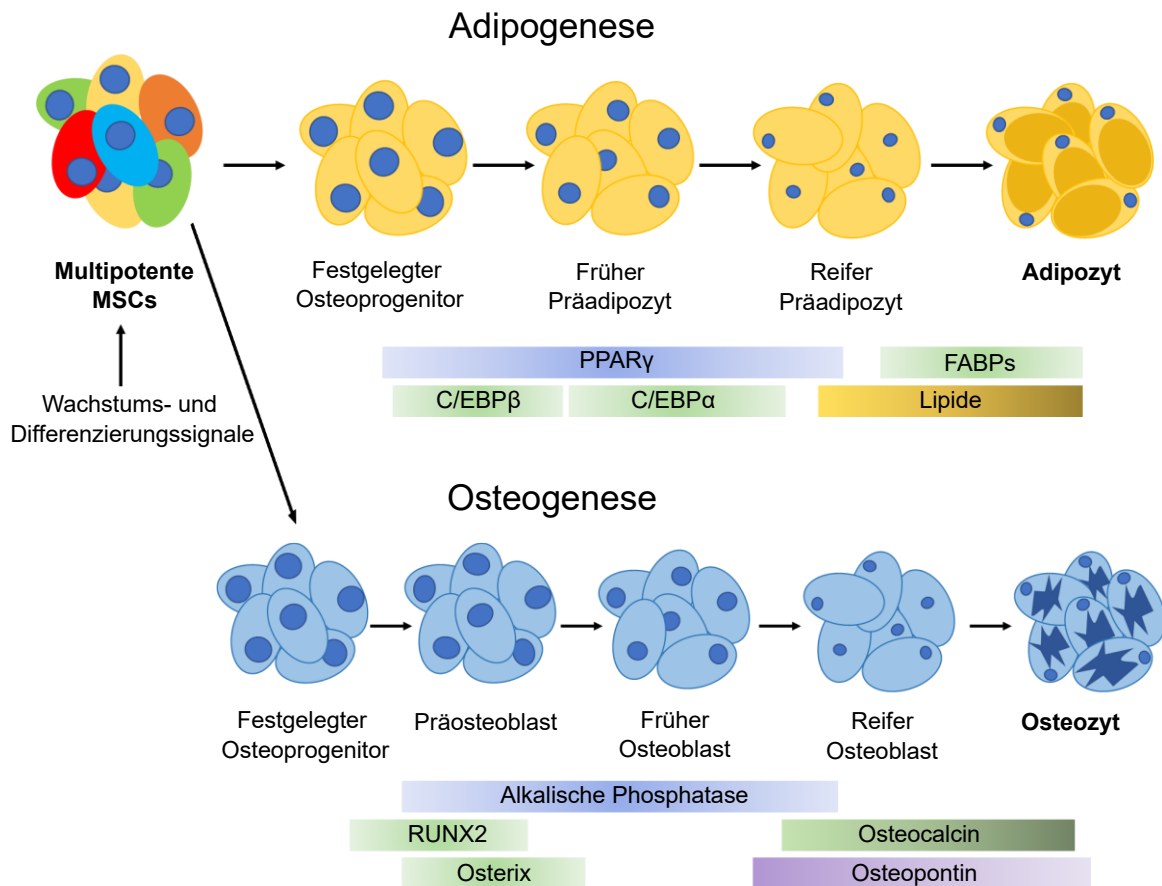


Abbildung 2: Adipogene und osteogene Differenzierungswege in MSCs

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind multipotente Vorläuferzellen, die durch Stimulation mit unterschiedlichen Wachstums- und Differenzierungsreizen in verschiedene Linien differenzieren können. Die linienspezifische Differenzierung ist ein mehrstufiger Prozess, der von Hauptregulatoren wie PPAR γ und C/EBPs für die Adipogenese, sowie RUNX2 und Osterix für die Osteogenese gesteuert wird. Die Osteogenese kann durch Bestimmung der alkalischen Phosphatase als frühen Marker sowie von Osteocalcin und Osteopontin als späte Marker festgestellt werden. Bei der Adipogenese stellen die Expression von FABPs und die Produktion von Lipiden Indikatoren für die terminale Differenzierung dar. Abbildung verändert nach [37].

1.3 Transkriptionsfaktoren in der Adipogenese

1.3.1 C/EBPs

Weiße und braune Adipozyten haben beide einen mesodermalen Ursprung, die Fettzellen gehen jedoch aus unterschiedlichen mesenchymalen Stammzelllinien hervor. Trotz dieses Unterschieds in der präadipozytären Determination ist ihre anschließende adipogene Differenzierung über eine gemeinsame Transkriptionskaskade reguliert, an der hauptsächlich der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) γ und CCAAT/Enhancer-bindende Proteine (C/EBPs) beteiligt sind [45–47].

PPAR γ ist für die Entwicklung aller Arten von Fettzellen unerlässlich [48, 49]. C/EBP α hält die PPAR γ -Expression aufrecht und gemeinsam regulieren sie die Transkription, um den differenzierten Zustand der Adipozyten zu fördern und aufrechtzuerhalten (d. h. Lipidstoffwechsel, Glukosestoffwechsel und Insulinsensitivität) [28, 45]. Das Fehlen von C/EBP α in Mäusen verhindert die Entwicklung weißer, aber nicht brauner Fettdepots, was darauf hindeutet, dass ein Mangel an C/EBP α bei der Entwicklung von braunem Fett wahrscheinlich über C/EBP β kompensiert werden kann [45, 50, 51].

Die Genregulationsnetzwerke im Zusammenhang mit braunem (BAT) und weißem Fettgewebe (WAT) konnten weitgehend erforscht werden. Zu den beteiligten Faktoren gehören PR domain-containing protein-16 (PRDM16) [52] und Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ Coaktivator 1 α (PGC-1 α) [53, 54]. PRDM16 verleiht den braunen Fettzellen ihre Identität [52, 55]. PRDM16 bindet und coreguliert C/EBP β , PPAR γ , PPAR α und PGC1 α , um die für braunes Fett spezifische Geninduktion zu fördern [52, 56, 57]. PGC1 α , dass auch PPAR γ und PPAR α coaktiviert, ist an der Regulierung der mitochondrialen Biogenese, des oxidativen Stoffwechsels und der Thermogenese beteiligt [45, 53, 58].

Interessanterweise wirken die meisten Faktoren, die das Browning-Programm (siehe Abschnitt 1.4.3), auslösen oder unterdrücken, durch Änderung der PGC1 α -Aktivität. Obwohl die meisten Transkriptionsfaktoren, die die Adipogenese fördern (z. B. PPAR γ), sowohl bei der Differenzierung von braunen als auch von weißen Adipozyten beteiligt sind, sind zahlreiche PPAR γ -Bindungsstellen entweder für BAT oder WAT spezifisch [45, 59]. Die Grundlage für die selektive Bindung von PPAR γ an Zielgene in verschiedenen Fettgeweben scheint daher erst durch die Interaktion mit Coregulatoren reguliert zu sein [45, 52, 60, 61].

1.3.2 PPAR γ

PPAR γ wurde Anfang der 1990er Jahre durch Tontonoz et al. [62] entdeckt. Seitdem gilt der nukleare Rezeptor PPAR γ , der beim Menschen durch das PPAR γ -Gen auf Chromosom 3p25.2 [63, 64] kodiert wird, als Hauptregulator der Biologie des Fettgewebes. Das menschliche PPARG-Gen, das neun Exons umfasst, erzeugt vier PPARG-Spleißvarianten (PPARG1-4), die vorrangig für zwei Protein-Isoformen, durch unterschiedliche Nutzung von Promotoren und alternatives Spleißen, kodieren [65].

Die mRNAs PPARG1, PPARG3, PPARG4, PPARG5 und PPARG7 bilden durch alternatives Splicen alle die Isoform PPAR γ 1 [64]. Das PPAR γ 1-Protein besteht aus 477 Aminosäuren und wird im Fettgewebe, in der Leber, im Dickdarm, im Herzen, in verschiedenen Epithelzelltypen und in der Skelettmuskulatur in relativ hohen Mengen exprimiert. Zudem wird PPAR γ 1 in zahlreichen Zellen des Immunsystems exprimiert, darunter Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und T-Lymphozyten. Das mRNA-Transkript von PPARG2 wird in die Isoform PPAR γ 2 übersetzt. Diese Isoform enthält 28 zusätzliche Aminosäuren in seinem N-Terminus und wird fast ausschließlich im Fettgewebe exprimiert. Zudem wird PPAR γ 2 auch in Urothelzellen exprimiert, bei denen es sich um hochspezialisierte Übergangsepithelzellen handelt, die die Organe des Harnsystems, einschließlich der Blase, auskleiden [64, 66, 67]. Darüber hinaus wird PPAR γ 2 auch in regulatorischen T-Zellen und anderen T-Zellpopulationen exprimiert, auch wenn dort die PPAR γ -Gesamtexpression gering ist [64, 68].

Ergänzend wurde vor nicht allzu langer Zeit über eine dritte und vierte PPAR γ Isoform berichtet, die als PPAR γ 1 Δ 5 bzw. PPAR γ 2 Δ 5 bezeichnet werden. PPAR γ 2 Δ 5 wird endogen im Fettgewebe exprimiert, wobei dieser Isoform durch Überspringen von Exon 5 die gesamte Ligandenbindungsdomäne (LBD) fehlt. Eine Überexpression von PPAR γ Δ 5 verändert das Transkriptionsnetzwerk und beeinträchtigt die Differenzierungsfähigkeit von Adipozytenvorläuferzellen erheblich. Durch Liganden-vermittelte PPAR γ -Aktivierung wird das Überspringen von Exon 5 in einer negativen Rückkopplungsschleife induziert. Dies lässt auf alternatives Spleißen als Mechanismus zur Regulierung der PPAR γ -Aktivität schließen [69].

Zudem korreliert die endogene Expression von PPAR γ Δ 5 positiv mit dem Body-Mass-Index bei übergewichtigen oder fettleibigen Patienten und Typ-2-Diabetikern. Die natürlich vorkommenden PPAR γ Δ 5-Isoformen beeinträchtigen das adipogene Potenzial von Adipozytenvorläuferzellen durch dominant-negative Hemmung von PPAR γ , was möglicherweise zur Dysfunktion des Fettgewebes bei Adipositas beiträgt [64, 69].

PPAR γ ist ein Mitglied der Superfamilie der nuklearen Rezeptoren, von denen bis heute 48 beim Menschen identifiziert wurden. Nukleare Rezeptoren regulieren verschiedene kritische Aspekte der Entwicklung, Physiologie, Reproduktion und Homöostase. Sie sind Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren mit mehreren Domänen, die in unterschiedlichem Ausmaß eine strukturelle Homologie aufweisen [64, 70].

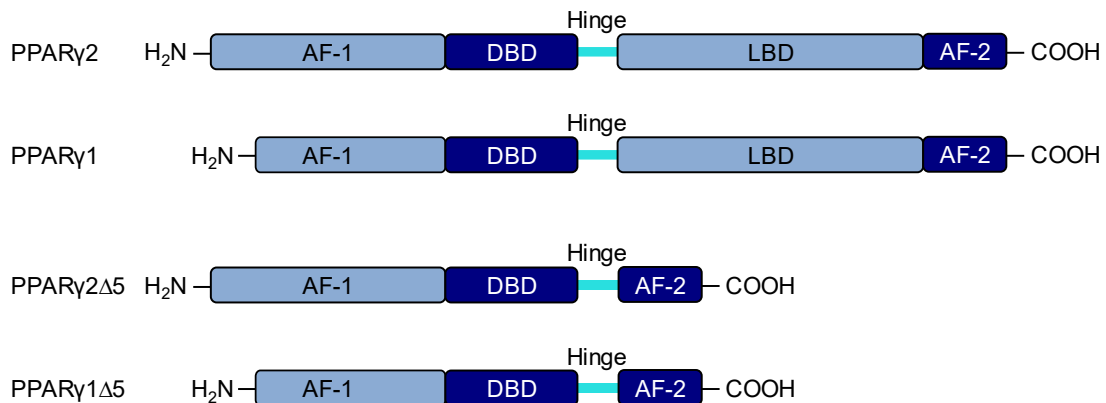


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Isoformen von PPAR γ

PPAR γ 1 und PPAR γ 2 entstehen durch die Nutzung zweier unterschiedlicher Promotoren. Dadurch weist PPAR γ 2 28 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus auf. Dadurch hat PPAR γ 2 eine Größe von 505 Aminosäuren, während PPAR γ 1 mit 477 Aminosäuren kleiner ist. Am N-Terminus befindet sich die autonome Transaktivierungsdomäne (AF-1) zur Liganden-unabhängigen Aktivierung von Zielgenen. Direkt im Anschluss folgt die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Über die Hinge-Region ist die DBD mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) verbunden. Am C-Terminus befindet sich die zweite Transaktivierungsdomäne (AF-2). Des Weiteren entstehen durch Überspringen von Exon 5 weitere dominant-negative Isoformen, PPAR γ Δ 5 genannt. Ihnen fehlt dadurch die LBD. Die verkürzten Isoformen PPAR γ 1 Δ 5 und PPAR γ 2 Δ 5 haben eine Größe von 283 und 311 Aminosäuren. Abbildung verändert nach [64].

Wie andere nukleare Rezeptoren enthält auch PPAR γ eine autonome Transaktivierungsdomäne 1 (AF-1) im unstrukturierten N-Terminus. Die AF-1-Domäne ist an der konstitutiven, Liganden-unabhängigen Aktivierung von PPAR γ -Zielgenen beteiligt. An die AF-1-Domäne schließt sich die DNA-Bindungsdomäne (DBD) an, die zwei Zinkfinger enthält, die für die DNA-Bindung erforderlich sind. Die DBD ist über die flexible Hinge-Region mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) verbunden. Im Fall von PPAR γ interagiert dieser Gelenkbereich physisch mit der DNA [64, 71].

Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) befindet sich am C-Terminus und ist eine komplizierte Struktur, die in einem konservierten dreischichtigen helikalen Sandwich mit 12 α -Helices und 4 β -Strang-Elementen angeordnet ist. Sie überschneidet sich mit der Liganden-abhängigen Transaktivierungsdomäne 2 (AF-2). Diese Stelle ist die Schlüsseldomäne für die Transaktivierung von PPAR γ -Zielgenen, da sie an der Ligandenbindung, der

Heterodimerisierung mit dem Bindungspartner Retinoid-X-Rezeptor alpha (RXR α) und der Interaktion mit transkriptionellen Coregulatoren beteiligt ist [64, 70].

Das genregulatorische Wirkprinzip von PPAR γ basiert auf Transaktivierung und Transrepression. Die Transaktivierung erfolgt über einen Mechanismus, bei dem PPAR γ als Heterodimerkomplex mit RXR an PPAR-Response-Elemente (PPREs) bindet [64, 72]. PPREs bestehen aus einer hexameren Wiederholung „AGGTCA“ mit einem oder zwei Nukleotiden Abstand (als DR1- und DR2-Elemente bezeichnet) [64, 73], die sich in Promotor- und Enhancer-Regionen von PPAR γ -Zielgenen befinden [64, 74].

Enhancer haben die Fähigkeit die Transkription ihrer Zielgene durch Ausbildung von Schleifen zu Promotoren in ihrer Nähe als auch in größerer genomischer Entfernung zu erhöhen. In der Vergangenheit wurden genomweite Bindungsprofile von PPAR γ in verschiedenen Zelltypen kartiert. Diese Bindungsprofile zeigten Tausende Bindungsstellen von PPAR γ im Genom, von denen sehr viele weit von proximalen Promotoren entfernt liegen. Zudem wurde festgestellt, dass die PPAR γ -Bindung in hohem Maße kontextabhängig ist, da sich die Bindungsstellen zwischen Zelltypen und sogar zwischen Adipozyten aus verschiedenen anatomischen Regionen unterscheiden [59, 64, 75–78]. Die festgestellte Kontextabhängigkeit der PPAR γ -Bindung wird zumindest teilweise durch eine kooperative Bindung an das Chromatin mit anderen adipogenen Transkriptionsfaktoren wie C/EBP α vermittelt, gefolgt von einer gemeinschaftlichen Rekrutierung von Coaktivatoren [64, 76]. Die transkriptionelle Kontrolle der Zielgene durch PPAR γ hängt außerdem von Multiprotein-Coregulationskomplexen ab, die an die PPREs rekrutiert werden [64, 79].

Unter basalen Bedingungen, d. h. in Abwesenheit von Liganden, begünstigt PPAR γ /RXR α stabile Interaktionen mit Corepressorkomplexen, die NCoR oder SMRT enthalten, die Chromatin-modifizierende Enzyme wie Histon-Deacetylasen rekrutieren, die das Chromatin für die Bindung von Transkriptionsfaktoren unzugänglich oder resistent gegen deren Wirkung machen und dadurch die Transkription aktiv unterdrücken. Nach der Ligandenbindung erfährt das PPAR γ /RXR α -Heterodimer eine Konformationsänderung, die die Freisetzung des Corepressors und die Rekrutierung von Coaktivatoren wie des CREB-bindenden Proteins (CBP) fördert. Coaktivatoren verstärken die PPAR γ -Transaktivierung, indem sie die Acetylierung der Histonschwänze, die das Chromatin weniger restriktiv macht, und den Aufbau der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie erleichtern [64, 67, 80].

Neben dem oben beschriebenen Transaktivierungsmechanismus kann PPAR γ die Genexpression auch negativ regulieren. Dies wird als ligandenabhängige Transrepression bezeichnet. Dieser Mechanismus beinhaltet die Antagonisierung der proinflammatorischen Signalwege NF- κ B und AP-1 und wurde hauptsächlich in Immunzellen beschrieben [64, 81–84]. In diesem Fall agiert PPAR γ als Monomer, das heißt unabhängig von RXR α . Der

zugrunde liegende Wirkungsmechanismus basiert auf der Hemmung des proteasomalen Abbaus von Corepressorkomplexen [64, 84–88].

Interessanterweise beinhaltet der Transrepressionsmechanismus eine spezifische posttranslationale Modifikation, die SUMOylierung von Lysin 365. Um externe Signale adäquat zu verarbeiten und sich an relevante Genexpressionsprogramme anzupassen, wird die PPAR γ -Aktivität durch mehrere, wahrscheinlich miteinander verbundene posttranslationale Modifikationen reguliert, darunter Phosphorylierung, Acetylierung und die oben erwähnte SUMOylierung [64, 89]. Je nach zellulärem Kontext und den beteiligten Kinasen kann die Phosphorylierung von PPAR γ am Serin 112 die PPAR γ -Aktivität entweder hemmen oder erhöhen [90]. Die Phosphorylierung von PPAR γ am Serin 273 durch CDK5 wirkt sich nicht auf seine adipogene Kapazität aus, beeinflusst aber viele PPAR γ -Zielgene, die nachweislich bei Fettleibigkeit dysreguliert sind [91]. Darüber hinaus korreliert die Acetylierung von K268 und K293 mit dem Phosphorylierungsstatus von Serin 273 und begünstigt die Lipidspeicherung und Zellproliferation [92]. Die selektive Deletion der Deacetylase SIRT1 in Adipozyten, die PPAR γ am Lysin 268 und 293 deacetyliert, führt zu einer Dephosphorylierung von Serin 273 und verbessert die Stoffwechselfunktionen [93].

Wie andere nukleare Rezeptoren steuert PPAR γ nährstoff- und hormonvermittelte Reaktionen. Trotz intensiver Forschung ist nicht klar, ob PPAR γ *in vivo* durch einen spezifischen, hochaffinen und endogenen Liganden aktiviert wird. Kristallstrukturen der PPAR γ -LBD zeigen eine große Ligandenbindungstasche (LBP), die nicht nur eine vielseitige Bindung von Liganden mit geringerer Affinität ermöglicht, sondern auch, dass Liganden die kanonische LBP in verschiedenen Konformationen besetzen können [94].

Die Aktivität von PPAR γ kann durch eine Vielzahl natürlicher Verbindungen moduliert werden, darunter mehrfach ungesättigte Fettsäuren [95], Eicosanoide [96, 97] und oxidierte Lipidkomponenten [98], was darauf hindeutet, dass PPAR γ als allgemeiner Lipid- oder Nährstoffsensor fungiert [95]. Endogene Liganden binden nicht nur mit geringer Affinität an PPAR γ , auch die physiologischen Konzentrationen in Säugetierzellen reichen oft nicht aus, um als physiologischer Ligand zu wirken [99]. Alternativ könnte die physiologische Aktivierung von PPAR γ das Ergebnis der kombinierten Wirkung mehrerer Liganden sein, die sich gleichzeitig mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene Unterregionen im LBP binden und dadurch unterschiedliche PPAR γ -Konformationen mit potenziell unterschiedlichen biologischen Wirkungen hervorrufen [100].

PPAR γ ist der kognitive Rezeptor für Thiazolidindione (TZDs), eine Klasse von Antihyperglykämika, zu denen Rosiglitazon und Pioglitazon gehören [101]. TZDs stimulieren die Adipogenese [101] und bewirken eine metabolisch vorteilhafte Verschiebung der Lipidverteilung von der Speicherung in viszeralen zu subkutanen

Fettgewebedepots sowie von der ektopischen Speicherung in Nicht-Fettgebebsorganen (z. B. Leber, Muskel) zu Fettgewebe [102–104]. TZDs und endogene Liganden haben überlappende Bindungsstellen im LBP, was möglicherweise einen Bindungswettbewerb um dieselbe Stelle ermöglicht. TZDs besetzen den kanonischen LBP von PPAR γ und stabilisieren durch Interaktion mit Resten in den Helices 3, 5, 6 und 7 und dem β -Sheet die Dynamik von Helix 12 und der AF2-Oberfläche [105, 106].

1.3.3 Adipokine

Fettgewebe hat nicht nur die Funktion des Energiespeichers, sondern es spielt auch eine große Rolle als endokrines Organ [107]. Die Kommunikation zwischen stromovaskulären Zellen (Perizyten) und reifen Adipozyten ist notwendig, um das Wachstum und die Differenzierung neuer Adipozyten zu regulieren [108, 109]. Zur Kommunikation produzieren Adipozyten Hormone, die als Adipokine bezeichnet werden. Diese von den Adipozyten ausgeschiedenen Faktoren dienen außerdem der Kommunikation mit wichtigen Organen wie Bauchspeicheldrüse, Herz und Leber [107]. Sie beeinflussen zudem die Nahrungsaufnahme, die Insulinsensitivität/-resistenz im Organismus, die Fortpflanzung, die Osteogenese, die Inflammation, immunologische Prozesse und den Fettsäuremetabolismus [108–110]. Durch die Regulation der Reifung von Adipozyten kann der Bedarf eng an den Energiespeicher angepasst werden [109]. Die Expression der Adipokine erfolgt zeitlich versetzt zu PPAR γ und C/EBP α . Sie treiben die Adipogenese weiter voran [109, 111].

Das Fettsäure bindende Protein 4 (FABP4) spielt eine Rolle im Glukosestoffwechsel und der Lipolyse der Adipozyten. Die Expression von FABP4 wird während der Adipogenese stark induziert, wobei die Transkription von PPAR γ -Agonisten, Fettsäuren, Insulin und kortisonähnlichen Medikamenten wie Dexamethason reguliert wird. Binden aktivierende Liganden, wie beispielsweise Linolensäure oder Retinolsäure, transloziert FABP4 mit dem Liganden aus dem Zytosol in den Zellkern hin zum Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ . Darüber hinaus induziert FABP4 die Transkription von PPAR γ , löst aber auch dessen Ubiquitinierung und den anschließenden proteasomalen Abbau aus. Eine weitere wichtige Funktion von FABP4 ist die Unterstützung der Anhäufung überschüssiger Fettsäuren in Lipidtröpfchen in Adipozyten [107, 112–114].

Adiponektin (AdipoQ), das vorwiegend von Fettzellen produziert wird, wurde als Schlüsselfaktor bei der Regulierung des Glukose- und Fettstoffwechsels identifiziert [115, 116]. Im Vergleich zu anderen Peptidhormonen zirkuliert es in hohen Spiegeln im Blutkreislauf [107]. Niedrige Adiponektinspiegel wurden mit Insulinresistenz und Prädiabetes in Verbindung gebracht [115, 117, 118].

Adipsin ist eine Serinprotease und gehört zum alternativen Komplementweg. Es fördert die Funktion der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse und ist in Mausmodellen zu Fettleibigkeit und Diabetes signifikant verringert [107].

1.4 Die Rolle von PPAR γ im Fettgewebe

Bei Säugetieren wurden weiße, beige, braune und rosa Adipozyten identifiziert. Obwohl diese Arten von Adipozyten aus verschiedenen Vorläufern hervorgehen und sich in ihrer Morphologie und Funktion erheblich unterscheiden, durchlaufen alle Zellen einen gut organisierten Differenzierungsprozess, um reif und voll funktionsfähig zu werden [2, 64, 119–121].

1.4.1 Die Rolle von PPAR γ in weißem Fettgewebe

Von allen Fettgeweben ist das weiße Fettgewebe (WAT) das am häufigsten vorkommende Fettgewebe im menschlichen Körper [122]. Das WAT kann nochmal in verschiedene Fettgewebetypen unterteilt werden, zu denen das subkutane WAT, das viszerale WAT, das epikardiale WAT und das perivaskuläre WAT gehören. Diese Typen repräsentieren die unterschiedlichen funktionelle und anatomischen Zustände der weißen Fettzellen [121].

Reife weiße Fettzellen sind unilokuläre Zellen, die aus einem großen Lipidtropfen bestehen, der fast das gesamte Zellvolumen einnimmt. Im gering vorhandenen Cytoplasma sind wenige Mitochondrien und ein kleines glattes Endoplasmatisches Retikulum. Je nach Größe des Lipidtropfens schwankt die Zellgröße zwischen 20 und 200 μ M [121, 123]. Die Regulierung der Adipozytenentwicklung *in vivo*, einschließlich der Entwicklung von Stammzellen zu weißen Adipozyten, ist nur unzureichend bekannt. Adipozyten-Stammbaumuntersuchungen, die bisher nur bei Mäusen durchgeführt werden können, deuten darauf hin, dass weiße Adipozyten sowohl aus MYF5- als auch aus MYF5+-Vorläuferzellen entstehen können. Die Verteilung der MYF5-Linien im Fettgewebe ist dynamisch und kann durch Alterung und Ernährung beeinflusst werden. Die MYF5- und MYF5+-weißen Fettzellen können sich während der Entwicklung gegenseitig kompensieren, was die Plastizität des Fettgewebes widerspiegelt [124].

Nach der Festlegung der Stammzellen auf die weiße Adipozytenlinie ist die Expression und Aktivierung von PPAR γ sowohl ausreichend als auch entscheidend, um das adipogene Differenzierungsprogramm zu initiieren und den Phänotyp, die Integrität und die Funktion der Adipozyten aufrechtzuerhalten [28]. PPAR γ reguliert in erster Linie die Expression von Genen, die an der Differenzierung von Adipozyten deren Aufrechterhaltung beteiligt sind. Darüber hinaus steuert PPAR γ die Expression von Genen, die an verschiedenen Prozessen des Lipid- und Glukosestoffwechsels beteiligt sind, darunter die Lipogenese, der

Fettsäuretransports (z. B. FABP4) und die Gluconeogenese (Hernandez-Quiles, Broekema, and Kalkhoven 2021). Dabei scheint die vorherrschende Wirkungsweise die Transaktivierung zu sein, denn die meisten Gene, die von PPAR γ in weißen Adipozyten reguliert werden, beruhen auf direkter DNA-Bindung [80].

Darüber hinaus wurde der frauenspezifische Zelltyp, der so genannte rosa Adipozyt, beschrieben. Dieser entsteht während der Schwangerschaft durch Transdifferenzierung aus subkutanen weißen Adipozyten und dient der Produktion und Absonderung von Milch. Rosa Adipozyten sind milchproduzierende Alveolardrüsen, die sich nach dem Abstillen wieder in weiße Adipozyten umwandeln [120, 125–128]. Die funktionelle Reaktion des Fettgewebes auf verschiedenste Stoffwechsel- und Umweltherausforderungen verdeutlicht seine außerordentliche Plastizität.

1.4.2 Die Rolle von PPAR γ in braunem Fettgewebe

Das BAT ermöglicht die Aufrechterhaltung einer Körpertemperatur, die höher ist als die Umgebungstemperatur, indem es unabhängig von Zittern und Bewegungsaktivität Wärme produziert. Dieser Prozess wird auch als nicht-zitternde Thermogenese bezeichnet [129, 130]. Beim Menschen ist braunes Fettgewebe bei der Geburt vor allem in der interskapulären Region und im Erwachsenenalter in der supraklavikulären Region zu finden [131]. BAT ist reichlich innerviert, vaskularisiert und besteht aus braunen Adipozyten (15 - 60 μ M groß), die viele multilokuläre Lipidtröpfchen und eine große Anzahl von Mitochondrien enthalten [123, 130]. Braune Adipozyten aus dem paraxialen Mesoderm, einem embryonalen Gewebe, das das Neuralrohr flankiert [131]. Stammbaumanalysen in der Maus zeigten, dass das interskapuläre braune Fett aus PAX3, MEK1 und MYF5 exprimierenden dermomyotomen Zellen im Embryo entsteht [131]. Aus PAX3⁺ dermomyotomen Zellen entstehen während der Entwicklung multipotente Vorläuferzellen, die ENGRAILED1 und PAX7 exprimieren. Aus diesen Zellen entstehen Hautzellen, Skelettmuskeln und braune Adipozyten [131]. Die Expression von PRDM16 steuert das Zellschicksal zwischen Skelettmuskelzellen und braunen Adipozyten [55, 121]. Darüber hinaus wurde mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung ein vorübergehendes Entwicklungsstadium der braunen Adipozyten identifiziert, welches durch die selektive Expression des Transkriptionsfaktors GATA6 gekennzeichnet ist [131].

Ihre braune Farbe verdanken die braunen Adipozyten der auffälligen eisenhaltigen Mitochondrienmasse. Braunes Fettgewebe exprimiert in einzigartiger Weise das Gen *UCP1*, das für das Entkopplungsprotein 1 (UCP1) kodiert, dass sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet. Wenn es aktiviert ist, vermittelt UCP1 eine nicht-zitternde Thermogenese, indem es die oxidative Phosphorylierung von der ATP-Synthese abkoppelt und dadurch die Freisetzung von chemischer Energie in Form von Wärme und ein hohes

Maß an Fettsäureoxidation anregt [132, 133]. Diese Aktivierung wird durch die sympathische β -adrenerge Innervation der BAT ausgelöst [130]. Da Lipide und Glukose den „Hauptbrennstoff“ für die BAT-Thermogenese darstellen, spielt die Aktivität des braunen Fettgewebes eine wichtige Rolle in der Regulierung des gesamten Energiestoffwechsels [134]. Aufgrund dieses Beitrags zum Energieverbrauch wird die BAT-Aktivität intensiv auf ihr Potenzial zur Bekämpfung von Fettleibigkeit und den damit verbundenen Stoffwechselkrankheiten wie Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes, Dyslipidämie und Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht. Tatsächlich nimmt der BAT-Gehalt mit zunehmendem Alter und steigendem Körpergewicht sowohl bei Menschen als auch bei Nagetieren ab, weshalb Mittel zur Steigerung seiner Aktivität attraktive Therapieziele darstellen [121, 130, 133, 135, 136]. Eine langfristige Aktivierung des BATs könnte zur Behandlung von Fettleibigkeit und zur Wiederherstellung eines gesunden Stoffwechselgleichgewichts beitragen [134]. Die BAT-vermittelte Thermogenese kann durch Kälteeinwirkung aktiviert werden und nimmt daraufhin erneut zu [121, 137–139]. Dieser Prozess wird auch als BAT-Rekrutierung bezeichnet. Je nach Größe des braunen Fettgewebsdepots kann die Thermogenese bis zu etwa 15 % des gesamten täglichen Energieverbrauchs ausmachen [140].

Bei der Differenzierung brauner Adipozyten ist dieselbe Transkriptionskaskade involviert, die auch bei weißen Adipozyten aktiviert wird. Zusätzlich zu PPAR γ und C/EBPs sind spezifische genregulatorische Netzwerke am Wachstum der BAT beteiligt. Zu den beteiligten Faktoren gehören PRDM16 und PGC1 α . PRDM16 ist spezifisch für braunes Fett. PRDM16 bindet an C/EBP β . PPAR γ , PPAR α und PGC1 α und koreguliert diese, um die für braunes Fett spezifische Geninduktion zu fördern [134].

1.4.3 Beige Adipozyten

Säugetiere besitzen eine zweite Art von thermogenen Adipozyten: beigefarbene Adipozyten, die auch als brite (braun in weiß) bezeichnet werden [141]. Im Gegensatz zu braunen Adipozyten entstehen die beigen Adipozyten postnatal aus weißem Fettgewebe [134]. Beige Adipozyten sind induzierbare thermogene Zellen, die sporadisch in weißen Fettgewebedepots zu finden sind [141]. Beige Adipozyten teilen viele morphologische und biochemische Merkmale mit braunen Adipozyten [123, 132]. Wie braune Adipozyten enthalten auch beige Adipozyten mehrere kleine Lipidtröpfchen und eine große Anzahl von Mitochondrien, die UCP1 exprimieren. Die Rekrutierung beiger Fettzellen, die als browning oder beigeing des weißen Fettgewebes bezeichnet wird, wird als Reaktion auf Umweltbedingungen wie chronische Kälteexposition, körperliche Betätigung, Langzeitbehandlung mit PPAR γ -Agonisten oder β 3-Adrenorezeptor-Agonisten, Krebskachexie und Gewebeverletzungen induziert [121, 141].

Gerade in sehr warmen Gegenden gestaltet sich eine längere Kälteexposition als schwierig. Ein alternativer Ansatz zur Aktivierung von browning besteht in einer veränderten Ernährung. Durch gezielte Änderung der Essgewohnheiten, wie z. B. intermittierendes Fasten, Kalorienrestriktion oder eine ketogene Diät, kann braunes und beiges Fett produziert und aktiviert werden, um den Gewichtsverlust zu fördern und seine therapeutischen Vorteile zu nutzen [121].

Obwohl der genaue Mechanismus, durch den PPAR γ -Agonisten die Bräunung der weißen Adipozyten auslösen, nicht genau bekannt ist, benötigen PPAR γ -Agonisten einen vollständigen Agonismus, um das Programm der Fettbräunung zu aktivieren. Die Wirkung wird zumindest teilweise durch PRDM16 vermittelt, einem Faktor, der für die Entwicklung des klassischen braunen Fettes wesentlich ist. Überraschenderweise beruht diese Wirkung, unabhängig von mRNA-Spiegel, auf der Stabilisierung und der Anhäufung des Proteins PRDM16 [142].

Die molekularen Mechanismen, die der Differenzierung von braunen und beigen Adipozyten aus Vorläuferzellen zugrunde liegen, sowie das Phänomen der Bräunung von WAT durch sind nach wie vor unvollständig bekannt. Daher ist weitere Forschung nötig, um die transkriptionellen und epigenetischen Faktoren, die diese Prozesse regulieren, aufzuklären [121].

1.5 Protein Arginin Methyltransferasen

Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) sind eine Familie von Enzymen, die Argininreste von Substratproteinen methylieren. Sie regulieren eine Vielzahl von zellulären Vorgängen, darunter sind die Transkription, das Spleißen, die Translation, sowie die DNA-Schadensantwort. Je nach Art des von ihnen gebildeten Methylarginins werden Protein Arginin Methyltransferasen in drei Typen eingeteilt. PRMTs vom Typ I und Typ II bilden zusätzlich zum Monomethylarginin asymmetrisches Dimethylarginin, beziehungsweise symmetrisches Dimethylarginin. Zu den Typ I Enzymen zählen PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6 und PRMT8. PRMT5 und PRMT9 gehören dem Typ II an. PRMT7 als Enzym vom Typ III erzeugt ausschließlich Monomethylarginin in Proteinen [143–145].

1.5.1 PRMT6

Die Protein Arginin Methyltransferase 6 beeinflusst viele zelluläre Vorgänge. Sie ist an der epigenetischen Regulierung der Genexpression, dem alternativen Spleißen [146, 147], der Entwicklung und Differenzierung [148–153], der DNA-Reparatur [154], Zellproliferation und Seneszenz, DNA-Methylierung [155], Mitose [156, 157], Entzündung, angeborene antivirale Immunität [158], Spermatogenese [159], Transaktivierung von Kernrezeptoren und Zellkommunikation beteiligt. Neben diesen physiologischen Funktionen wird eine Dysregulation von PRMT6 bei Viruserkrankungen, Herzhypertrophie und Krebs vermutet [143, 145, 160, 161].

Das menschliche *PRMT6*-Gen befindet sich auf Chromosom 1 und kodiert das 41,9 kDa große PRMT6-Enzym. Während andere PRMTs sowohl im Zellkern als auch im Zytosol vorkommen, ist PRMT6 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. PRMT6 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, verstärkt in Nieren und Hoden [162]. Durch einen erleichterten proteasomalen Abbau regulieren die F-Box-Proteine FBXO24 und FBXW17 die Proteinmenge von PRMT6 [143, 163, 164].

Durch das Setzen von Histonmodifikationen, der asymmetrischen Dimethylierung von Histon 3 an Arginin 2 (H3R2me2a), Arginin 17 (H3R17me2a) und Arginin 42 (H3R42me2a) sowie von Histon H2A an Arginin 26 (H2AR26me2a), ist PRMT6 an der epigenetischen Regulation der Genexpression beteiligt. Darüber hinaus methyliert PRMT6 eine Vielzahl an Nicht-Histon-Proteinen. Dadurch ist PRMT6 an der Regulation unterschiedlichster biologischer Funktionen im Organismus [143, 165–170].

Neben der Methylierung seiner Substrate unterliegt PRMT6 einer Automethylierung an Arginin 35. Die Rolle dieser post-translationalen Modifikation beeinträchtigt seine Stabilität und ist für seine antiretrovirale Aktivität unverzichtbar [162, 171].

Kinetische Untersuchungen von PRMT6 ergaben, dass es prozessiv asymmetrische Dimethylarginine erzeugt. PRMT6 folgt dabei einem sequenziellen Katalysemechanismus, bei dem zunächst das S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) an das Enzym bindet, gefolgt von der Bindung des Substratpeptids, was zur Bildung eines ternären Komplexes führt. Infolge des Methylgruppentransfers dissoziiert das methylierte Substratpeptid zuerst vom Enzym, gefolgt von S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH). Interessanterweise ist die katalytische Effizienz bei monomethylarginin-haltigen Substratpeptiden viel höher als bei Substratpeptiden mit unmethyliertem Arginin [143].

In vitro Experimente zeigten, dass PRMT6 ein unspezifisches Enzym ist, da es die meisten Aminosäureaustausche toleriert. Dennoch gibt es eine Präferenz für positiv geladene und sperrigere Aminosäuren um das Ziel-Arginin [172].

1.5.2 Epigenetische Funktionen von PRMT6

Post-translationale Modifikationen von Histonschwänzen regulieren die Chromatinstruktur und kontrollieren diverse Chromatin-abhängige Prozesse, darunter die Genexpression. PRMT6 ist das wichtigste Enzym, das *in vivo* eine asymmetrische Dimethylierung an Arginin 2 von Histon 3 (H3R2me2a) erzeugt und die globalen H3R2me2a-Level reguliert [143, 166–168, 173]. PRMT6-vermittelte H3R2me2a-Modifikationen sind innerhalb von Genen und Promotorregionen von inaktiven Genen angereichert. Sie korrelieren invers mit aktiven H3K4me3-Modifikationen (Trimethylierung von Histon 3 an Lysin 4) an den Promotorregionen. Die H3R2me2a Modifikation wird als repressive Markierung angesehen, da ihr Vorhandensein an den Promotoren zu geringen Transkriptionsmengen der zugehörigen Gene führt [143, 168, 173]. Die H3K4me3 Markierung hemmt die PRMT6-Aktivität an den Histon 3 Peptiden [143, 167, 168].

Die Enzyme der SET1/MLL-Familie, die als Proteinkomplex agieren, katalysieren die Bildung der aktiven Histonmodifikation H3K4me3 [143, 174–177]. Der MLL-Komplex zeigt keine Aktivität an den H3-Peptiden mit H3R2me2a-Modifikationen [166, 168]. Diese Erkenntnisse erklären die Gegenkorrelation zwischen H3K4me3 und H3R2me2a und den entsprechenden Rollen der Methyltransferasen an den Promotorregionen [143].

Die Mehrheit der Reader-Proteine, die die H3K4me3-Modifikation erkennen, zeigen eine reduzierte oder nicht nachweisbare Bindung mit den H3-Peptiden, die sowohl die H3R2me2a- als auch die H3K4me3-Modifikation aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die H3R2me2a-Modifikation die Erkennung der H3K4me3-Modifikation durch die Reader Proteine hemmt [143, 167].

PRMT6-vermittelte H3R2me2a Modifikationen treten in der Regel gemeinsam mit H3K27me3 in einer Untergruppe von stillen Genpromotoren auf [150, 152, 178]. PRMT6

interagiert mit den repressiven Polycomb-Komplexen und unterdrückt die Transkription [179].

1.5.3 Die Rolle von PRMT6 bei Krankheiten

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören derzeit weltweit zu den größten Bedrohungen für das Leben und die Gesundheit der Menschen. Ihre Morbidität und Mortalität übertreffen die von Tumorerkrankungen und stehen an erster Stelle. Zu den häufigsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören Bluthochdruck, Atherosklerose, Herzinsuffizienz, Hyperlipidämie und koronare Herzkrankheiten. Um die Inzidenz dieser Krankheiten zu reduzieren, ist die Aufklärung der Wirkungsprinzipien von PRMT6 in diesem Kontext essenziell. Insbesondere wurde dabei die verstärkte Expression bei Herzhypertrophie in den ventrikulären Myozyten festgestellt. Gleichzeitig geht damit die signifikante Zunahme von H3R2me2a und eine Verringerung von H3K4me3 einher. Diese Ergebnisse wurden im Menschen, der Maus und der Ratte bestätigt [180, 181].

PRMT6 steht ebenfalls in Verbindung mit Progression von Krebs. In vielen verschiedenen Krebsarten wurde eine erhöhte PRMT6-Konzentration festgestellt [161].

Zellen verfügen über mehrere Zellzykluskontrollpunkte, die den Zellzyklus anhalten oder die Apoptose einleiten, wenn die genomische Integrität bedroht ist, um die Übertragung von Mutationen auf nachfolgende Zellgenerationen zu verhindern. Der Zellzyklus wird durch CDKs und CDK-Inhibitoren streng reguliert [182].

Durch Transfektion von siRNAs von PRMT6 in Lungen- und Blasenzelllinien konnte die Proliferation der Krebszellen gehemmt werden [161]. PRMT6 beeinflusst dabei den Übergang von der G₁ zur S-Phase in Krebszellen [161, 183].

Dies ist nicht sonderlich verwunderlich, wenn man die regulatorischen DNA-Regionen wichtiger Zellzyklusregulatoren wie CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A und p53 betrachtet. An diesen Regionen wirkt PRMT6 als Transkriptionshemmer [145, 184]. Auch weitere Tumorsuppressorgene werden durch PRMT6 beeinflusst. Ein Knockdown von PRMT6 führt zu einer stärkeren Expression der Tumorsuppressorgene p21 und p27 [145].

Die Methylierung von p21 durch PRMT6 hat die zytoplasmatische Lokalisierung von p21 zur Folge, was wiederum zu einer stärkeren Resistenz von Krebszellen gegen zytotoxische Medikamente führt [182]. Dies, sowie die fördernde Wirkung des Zellwachstums und das Verhindern der Seneszenz macht den Protein Arginin Methyltransferase 6 zu einem therapeutischen Ziel für verschiedene Krebsarten [145].

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Heutzutage leiden immer mehr Menschen an Übergewicht und Adipositas. Nach Angaben der *World Obesity Federation* werden im Jahr 2035 voraussichtlich mehr als 4 Milliarden Menschen weltweit übergewichtig oder fettleibig sein, was mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ausmacht [185]. Fettgewebe ist zwar zur Aufrechterhaltung des Energiehaushalts in Hungerszeiten notwendig, jedoch steht in weiten Teilen der Welt ausreichend Nahrung zur Verfügung, sodass die überschüssig aufgenommene Energie in Form von Fettgewebe eingelagert wird [186–188]. Fettleibigkeit hat ihren Preis, denn durch sie werden andere Krankheiten begünstigt. Zusätzliche Gesundheitsprobleme, die mit Adipositas einher gehen, sind Insulinresistenz, Typ2-Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, degenerative Erkrankungen und Krebs [111, 185, 189]. Fettleibigkeit geht zudem häufig mit chronischen Entzündungen durch übermäßige Sekretion von Zytokinen einher. Die Entzündungsreaktion kann wiederum die Differenzierung und Verteilung des Fettgewebes beeinträchtigen, was zu einer übermäßigen Ansammlung von Fett im Körper führt. Daher stellen Krankheiten, die mit Adipositas zusammenhängen, heute und in Zukunft eine ernsthafte Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar [185].

Derzeit erfolgt die Behandlung solcher Krankheiten in der Regel über die langfristige Einnahme zahlreicher Medikamente, was zu einer Abhängigkeit der Patienten und medikamentösen Nebenwirkungen führen kann. Dadurch wurde die Suche nach neuen Methoden zur Diagnose und Behandlung des metabolischen Syndroms zu einer dringenden Fragestellung in der medizinischen Forschung [185].

Lipide sind wichtige Bestandteile der Zellen und an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Jedoch ist das Gleichgewicht des Lipidstoffwechsels für die Aufrechterhaltung der Gesundheit von entscheidender Bedeutung. Fettzellen sind wichtige Orte für die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, und die Sekretion von Entzündungsfaktoren durch das Fettgewebe ist Grundlage für die metabolische Entzündungsreaktion [185].

Zur Bekämpfung von Adipositas oder der Erforschung neuer Behandlungsansätze gibt es unterschiedliche Ansatzpunkte. Ziel dieser Arbeit ist es die Liniendifferenzierung hin zum Adipozyten besser nachvollziehen zu können. Während der Zelldifferenzierung werden durch epigenetische Regulation stammzellspezifische Gene ab- und zelllinienspezifische Gene angeschaltet. Eine Möglichkeit der epigenetischen Regulation stellt die post-translationale Methylierung von Histonen und anderen Proteinen dar. Diese Modifikation wird bei der Methylierung von Argininen durch Protein Arginin Methyltransferasen katalysiert. Über den Einfluss von verschiedenen Protein Arginin Methyltransferasen auf

die Adipogenese gibt es bereits viele Studien. Über den Einfluss von PRMT6 auf die adipogene Differenzierung ist dagegen weniger bekannt.

PRMT6 wird in der Literatur als Transkriptionsregulator beschrieben [149, 151, 168, 183, 184]. In der Osteogenese konnte eine erhöhte Expression im Differenzierungsverlauf festgestellt werden [148]. Da die Osteogenese sehr eng mit der Adipogenese verbunden ist und sich diese beiden Liniendifferenzierungen gegenseitig blockieren, ist die Einflussnahme von Prmt6 auf die Adipogenese wahrscheinlich [190, 191].

Die Verbindung zwischen Knochen und Fettgewebe ist hoch komplex. Beide Gewebe sind hochgradig stoffwechselaktiv und stehen durch Adipokine, Östrogene und aus dem Knochen stammende Stoffwechselfaktoren in Wechselwirkung. Der Knochenumbau und die Adipogenese sind über Rückkopplungsmechanismen verbunden [192]. Generierte Forschungsergebnisse sind möglicherweise nicht nur für neue medizinische Ansätze zur Behandlung von Adipositas relevant, sondern auch für die Behandlung der Osteoporose.

Im Kontext der Adipogenese sollte zunächst eine Expressionsänderung von PRMT6 im Differenzierungsverlauf untersucht werden. Ein Fokus lag dabei auch auf einer potenziellen Lokalisationsänderung durch die Differenzierung vom Nukleus in das Cytoplasma. Daraufhin wurde die Veränderung der Differenzierungskapazität der Zellen durch den Einsatz eines spezifischen PRMT6 Inhibitors, der Überexpression PRMT6, sowie eines Knockouts erforscht. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Interaktion von PRMT6 und PPAR γ . Hierbei wurden sowohl Protein-Protein- als auch Protein-Chromatin-Interaktionen betrachtet. Die Promotorregion des PPAR γ -Zielgens *C/EBP α* stand dabei in besonderem Fokus, denn dort wurden Unterschiede der Transkriptionsfaktorbindungen und Histonmodifikationen vor und nach der Induktion der Adipogenese untersucht. PRMT6 ist durch die Katalyse der Histonmodifikation H3R2me2a als repressiver Transkriptionsfaktor bekannt. Zuletzt war die Aufklärung des Corepressorkomplexes, an dem PRMT6 gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren beteiligt ist, von besonderem Interesse, um weitere Rückschlüsse auf den Mechanismus der Regulation von PRMT6 an PPAR γ -Zielgenen in Vorläuferzellen ziehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt.

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Die Tabelle führt die verwendeten Geräte auf, die zusätzlich zu den Standardlaborgeräten für diese Arbeit genutzt wurden.

Gerät	Hersteller	Verwendungszweck
LSM710	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH	Aufnahme von immunhistochemischer Färbung
Spark®	Tecan Trading AG	Photometrische Messung
Azure c600	Azure Biosystems Inc.	Aufnahme von Agarosegelen und PVDF- Membranen nach Western Blot
Odyssey® M	LI-COR	Aufnahme von PVDF- Membranen nach Western Blot
Phosphorimager	Molecular Dynamics	Detektion von ^{35}S
Kassette	Molecular Dynamics	Detektion von ^{35}S

2.1.2 Computerprogramme

Tabelle 2: Computerprogramme

In dieser Tabelle sind, die zur Datenerhebung und -Analyse verwendeten, Computerprogramme aufgelistet.

Programm	Verwendungszweck
Clone Manager 8	Erstellung von Vektorkarten, Überprüfung von Sequenzierungen
Excel 365	Auswertung erhobener Daten
Image J	Einfügen von Größenmaßstäben, Analyse der Bandenstärke von Proteinbanden
Inkscape 1.3	Erstellung von Vektorgrafiken
GraphPad Prism	Statistische Auswertung der Daten, Erstellung von Abbildungen

2.1.3 Medien

Tabelle 3: Nährmedien für die Bakterienkultur

Nährmedien	Zusammensetzung	Konzentration
LB ₀ -Medium pH 7,2	NaCl	1 %
	Trypton	1 %
	Hefeextrakt	1 %
LB ₀ -Agar pH 7,2 *bei Ampicillin-Resistenz wurde Ampicillin frisch als Selektionsmarker hinzugegeben	NaCl	1 %
	Trypton	1 %
	Hefeextrakt	1 %
	Agar-Agar	1,6 %
	Ggf. Ampicillin	100 µg/ml

Tabelle 4: Zellkulturmedien

Zellkulturmedien	Zusammensetzung	Konzentration
293T Medium	DMEM GlutaMAX	
	FCS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
ST2 Medium	RPMI 1640 GlutaMAX	
	FCS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
M2 Medium	αMEM	
	FCS	15 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
Adipozyten Differenzierungsmedium	DMEM GlutaMAX	
	FCS	9 %
	Dexamethason	250 nM
	IBMX	450 nM
	Rosiglitazon	1 µM
	Insulin	5 µg/ml

Tabelle 5: Mediumzusätze im Adipozyten Differenzierungsmedium

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Dexamethason	D4902	Sigma-Aldrich
IBMX	sc-201188	Santa Cruz Biotechnology
Rosiglitazon	R2408	Sigma-Aldrich
Insulin, human rekombinant, Zinklösung	12585014	Gibco

2.1.4 Bakterienstämme

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte mit den chemisch kompetenten *E.coli* Stämmen JM109 und Stbl3 oder dem elektrokompenten Stamm DH5 α .

2.1.5 Vektoren

Tabelle 6: Verwendete Vektoren

Vektor	Anwendung
LeGOiG2	Überexpression von Prmt6, GFP als Selektionsmarker
lentiCRISPRv2 puro	Knockout von Prmt6 und Ppar γ durch gRNA's, Puromycin als Selektionsmarker
pcDNA3	Säugetierexpressionsvektor
pcDNA3.1	Säugetierexpressionsvektor
pcDNA3(2HA)	Säugetierexpressionsvektor mit zwei HA-Tags
pcDNA3-Flag	Säugetierexpressionsvektor mit Flag-Tag
pCMVdelta8.91	Verpackungsplamid zur Herstellung lentiviraler Partikel
pMD2.G	Verpackungsplamid zur Herstellung lentiviraler Partikel

Tabelle 7: Klonierungsprimer

Die unterstrichenen Abschnitte sind die gRNA-Sequenzen.

Name	Vorwärts & rückwärts Sequenz 5'→3'	Anwendung
mPrmt6_EcoRI_ HA-Tag	AAAGAATTCATGTACCCATACGAT GTTCCAGATTACGCTGCATCGCTG AGCAAGAAAAGA	Klonierung von mPRMT6 mit HA-Tag in LeGOiG2 unter
	AAAGCGGCCGCTCAGTCCTCCATG GCAAAGTC	Anbringung einer EcoRI Restriktions- schnittstelle
hPPAR γ 1-505aa	GCAGCGGCCGCGAGGTGAAACTCTG GGAGAT	Klonierung von hPPAR γ in pcDNA3 (2HA)
	TGCTCTAGACTAGTACAAGTCCTTG TAGATC	
gRNA non targeting	CACCGAGATTGATACTGCGGTCA	Klonierung der Guide RNA in lentiCRISPRv2
	AAACTGACCGCAGTATCGAATCTC	
gRNA mPrmt6 #1	CACCGTTTCAAGTGACCTTTCCCGG	
	AAACCCGGGAAAGGTCACCTTGAAAC	
gRNA mPrmt6 #2	CACCGCACCGGCTCGTTCAAGTAG	
	AAACCTACTTGAACGAGCCGGTGC	
gRNA mPpary #1	CACCGAGTTAGAAGGTTCTTCATG	
	AAACCATGAAGAACCTTCTAACTC	
gRNA mPpary #2	CACCGCCATTGAGTGCCGAGTCTG	
	AAACCAGACTCGGCACTCAATGGC	

2.1.6 Zelllinien

Zellkulturversuche in humaner Zellkultur wurden in HEK293T Zellen (ACC 635) [193] durchgeführt. Murine Zellkultur wurden in ST2 Zellen (ACC 333) [194] und M2 Zellen [195] durchgeführt.

2.1.7 Verwendete Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
ChIP DNA Clean & Concentrator Kit	Zymo Research
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel
Quick-RNA Miniprep Kit	Zymo Research
TNT T7 Quick coupled transcription/translation system	Promega

2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 9: Real-time PCR Primer

Name	Vorwärts Sequenz 5'→3'	Rückwärts Sequenz 5'→3'
Adipoq	TGACGACACCAAAAGGGCTC	CACAAGTTCCTTGGGTGGA
Adipsin	CCTACATGGCTTCCGTGCAA	CACCTGCACAGAGTCGTCAT
C/ebpα	CCGTGGTGGTTTCTCCTTGA	TTTTTGCTCCCCCTACTCGG
Fabp4	TCATAACCCTAGATGGCGGG	GCCTTTCATAACACATTCCACC
Pparγ total	TGTGAGACCAACAGCCTGAC	TCAGTGGTTCACCGCTTCTT
Pparγ1	CGAGTGTGACGACAAGGTGA	ACCGCTTCTTTCAAATCTTGTCTG
Pparγ2	TTCGCTGATGCACTGCCTAT	GGAATGCGAGTGGTCTTCCA
Prmt6	AAACCTCTGGTGCTGTCCAC	CCGGCTCGTTCAAGTAGAGG
Runx2	GCTTCATTGCCTCACAAAC	TTAAACGCCAGAGCCTTCTTG
Tbp	AGCTCTGGAATTGTACCGCA	TGACTGCAGCAAATCGCTTG

Tabelle 10: Real-time PCR TaqMan Assays

Name	Assay ID	Hersteller
Aipoq	Mm00456425_m1	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
C/ebpα	Mm00514283_s1	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
C/ebpβ	Mm00843434_s1	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
Fabp4	Mm00445878_m1	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
Pparγ	Mm01184322_m1	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
Prmt6	Mm00619134_m1	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
Tbp	Mm00446973_m1	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific

Tabelle 11: ChIP Primer

Name	Vorwärts Sequenz 5'→3'	Rückwärts Sequenz 5'→3'
<i>Pparγ</i> Promotor	CATGGACATCGGTCTGAGGG	CCGCCTTGCTCCTCACAG
<i>Pparγ</i> Kontrollregion	TACAGAGAACACAGTAGTG AGGTA	GCACTCTACTGACTGACTTACCC
<i>C/ebpα</i> Promotor	CTCACCGCCTTGGAAAGTCA	TGTCCAAACGGGTCTCGGAT
<i>C/ebpα</i> Kontrollregion	CGAAGTGGTGTGTAACCCGT	AGAGTTCTTGCCTGACGACTT

2.1.9 Antikörper

Tabelle 12: Primärantikörper für die Immunofluoreszenz

Name	Nummer	Hersteller	Verdünnung
Phalloidin-iFluor 555	ab176756	Abcam	1:2000
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochlorid)	D8417	Sigma-Aldrich	1:5000
PRMT6	720142	Invitrogen	1:250
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 488	A32731	Invitrogen	1:1000

Tabelle 13: Antikörper für die ChIP

Name	Nummer	Hersteller	ChIP
PRMT6	720142	Invitrogen	Mix
PRMT6 (Middle Region)	ABIN2778658	antikörper-online.de	2 µg + 2 µg
Rabbit IgG Isotype Control	02-6102	Invitrogen	2 µg – 4 µg
RXRα (D6H10)	3085	Cell Signaling	8 µl
Runx2 (D1L7F)	12556	Cell Signaling	1:100
PPARγ (81B8)	2443	Cell Signaling	1:100
CBP	PA5-27369	Invitrogen	2,5 µg
HDAC1	PA1-860	Invitrogen	2,5 µg
Histone H3	PA5-49579	Invitrogen	2 µg
H3K9ac	ab177177	Abcam	2 µg
H3R2me2a	ab175007	Abcam	2 µg
H3K4me3	ab8580	Abcam	2 µg

Tabelle 14: Primärantikörper im Western Blot

Name	Nummer	Hersteller	Verdünnung
β-Actin (8H10D10)	3700	Cell Signaling	1:1500
β2-microglobulin	59035	Cell Signaling	1:1000
C/EBPα (D56F10)	8178	Cell Signaling	1:1000
FABP4	2120	Cell Signaling	1:1000
Flag	F7425	Sigma-Aldrich	1:1000
GAPDH loading Control	MA5-15738	Invitrogen	1:1000
HA.11 Clone 16B12	901502	BioLegend	1:1000
PPARγ (81B8)	2443	Cell Signaling	1:1000
PRMT6 (D5A2N)	14641	Cell Signaling	1:1000
TATA binding Protein	ab63766	Abcam	1:1000

Tabelle 15: Sekundärantikörper im Western Blot

Name	Nummer	Hersteller	Verdünnung
anti-mouse IgG H&L (HRP)	ab97040	Abcam	1:10000
anti-rabbit IgG H&L (HRP)	ab97080	Abcam	1:10000
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	926-32211	Li-Cor	1:10000
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H+L)	926-32210	Li-Cor	1:10000
IRDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG	926-68071	Li-Cor	1:10000
IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG	926-68070	Li-Cor	1:10000

2.2 Proteinbiochemische Methoden

Im Folgenden werden proteinbiochemische Methoden beschrieben, die zur Anfertigung dieser Arbeit genutzt wurden.

2.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Aus den Zellen wurden gemäß [196] Zellkern- oder Cytoplasma Proteinlysate extrahiert.

Für die Histonextraktion wurden die ST2 und M2 Zellen bei einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml in Triton Extraction Puffer (TEB: PBS enthält 0,5 % Triton X 100 (v/v), 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,02 % (w/v) NaN_3) resuspendiert. Unter leichtem Rühren wurden die Zellen 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellkerne bei

650 x g für 10 min bei 4 °C herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellkerne wurden nun im halben Volumen TEB zum Waschen resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 0,2 M HCl bei einer Konzentration von 4×10^7 Zellkernen pro Milliliter resuspendiert. Die Histone extrahieren über Nacht bei 4 °C. Die Proben wurden dann wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugegefäß überführt und die HCl mit 1/10 Volumen des Überstands 2 M NaOH neutralisiert.

Gesamtproteinlysate wurden mit 1 % NEB-Puffer (Tabelle 16) hergestellt. Für die Lyse von adhärennten Zellen wurde das Medium abgesaugt und kaltes PBS zum Waschen dazugeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des PBS wurde das Zellpellet in NEB-Puffer resuspendiert (150 µl für ein 6-Well mit ST2 Zellen) und für 10 min auf Eis inkubiert. Das Gesamtproteinlysate wurde nach der Zentrifugation bei 15.000 rpm für 10 min bei 4 °C in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Für die Co-Immunopräzipitation wurde der 1 %-ige Puffer mit dem 0 %-igen auf 0,1 % verdünnt.

Mittels Bradford-Assay wurde dann die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Standardgerade wurde der *Protein Assay Standard II* (Bio-Rad, #5000007) verwendet in den Konzentrationen 0 µg/ml, 0,025 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml verwendet. Anschließend wurde das Bradford Reagenz *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, #5000006) zugegeben und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Plattenlesegerät ermittelt.

Tabelle 16: Zusammensetzung des NEB-Puffers

NEB-Puffer	1 %	0 %
50 mM Tris pH 7,5	50 mM	50 mM
150 mM NaCl	150 mM	150 mM
10 mM NaF	10 mM	10 mM
EDTA	1 mM	1 mM
β-Glycerophosphat	20 mM	20 mM
IGEPAL® CA-630	1 %	0 %
Frisch dazu		
Na ₃ VO ₄	1 mM	
Proteaseinhibitor-Cocktail	1:100	

2.2.2 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Durch die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Relation zu standardmäßigen Ladekontrollen ist der Vergleich von Proteinmengen möglich. Die hergestellten Proteinextrakte wurden mit 6x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min aufgekocht. Danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert und auf die Polyacrylamid Gele aufgetragen. Zudem wurde als Größenstandard der PageRuler Prestained Protein Ladder (Invitrogen) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteinlysate im Gel erfolgte für circa eine Stunde bei 200 V. Als Laufpuffer wurde 1x SDS Laufpuffer (siehe Anhang Tabelle 27) verwendet.

2.2.3 Immunoblotting / Western Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben wurden mit einem Wet-Blot-System (Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) bei 250 mA für 1h15min auf eine PVDF-Membran übertragen. Die für den Blot verwendete Membran wurde zuvor in Methanol konditioniert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die PVDF-Membran, wenn sie mit APS detektiert wurde, für 1 h in 4 % Milchpulver in TBS-T inkubiert. Bei der Detektion mit sekundären Fluoreszenzantikörpern wurde die Blocking Lösung von Roche (#11096176001) verwendet. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 14) in 4 % Milchpulver in TBS-T oder Blocking Lösung mit 0,2 % Tween 20 eingeschweißt. Die Membran wurde so unter ständigem Kippen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran 3x für 10 min mit TBS-T gewaschen wurde, wurde sie in die Sekundärantikörperlösung (Tabelle 15) überführt. Wie auch für die Primärantikörper gab es Unterschiede im Ansetzen der Sekundärantikörper für die Detektion mit APS oder Fluoreszenz. Sekundärantikörper mit HRP wurden im Verhältnis 1:10.000 in 4 % Milchpulver in TBS-T inkubiert. Sekundärantikörper für die Fluoreszenz-Detektion wurden im Verhältnis 1:20.000 in Roche Blocking Lösung mit 0,2 % Tween 20 und 0,1 % SDS eingesetzt. Die Membran wurde dann in der Sekundärantikörperlösung eine Stunde bei Raumtemperatur unter Kippen inkubiert und 3x mit TBS-T, sowie mit TBS gewaschen. Für die Detektion mit HRP wurden die Reagenzien A (0,036 % H_2O_2 und 0,1 M Tris pH 8,5) in dH_2O und B (2,5 mM Luminol, 396 μM Cumarsäure und 0,1 M Tris (pH 8,5) in dH_2O) direkt auf der Membran gemischt, für 1 Minute inkubiert und anschließend detektiert. Die Dokumentation der Membranen erfolgte mit dem Azure c600 oder dem Odyssey[®] M.

Zur Bestimmung der relativen Expression wurde die Intensität der einzelnen detektierten Banden mittels ImageJ bestimmt. Anschließend wurde die Intensität des zu untersuchenden Gens auf die Intensität des Referenzgens GAPDH oder TBP normalisiert.

2.2.4 GST-Pulldown

500 ng Plasmid-DNA von PPAR γ 2-pcDNA3(2HA) wurde im TNT T7 Quick coupled transcription/translation system (Promega GmbH: Walldorf, Germany) eingesetzt und mit ^{35}S -Methionine (10mCi/ml, 1000Ci/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig) versetzt. 10 μl der *in vitro* Translation wurde dann entweder mit GST oder GST-PRMT6 Beads für 3h bei 4 °C auf einem rotierenden Rad inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 2300 rpm für 1 min wurde das Pellet lysiert, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 4 °C auf einem rotierenden Rad. Dies wurde zwei Mal wiederholt. Die Proben wurden anschließend bei 95 °C in 1,5 x Laemmli Puffer denaturiert. Die Proteine wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie-Blau 45 Minuten lang gefärbt, nach der Entfärbung getrocknet und am nächsten Tag im Phosphorimager analysiert.

2.2.5 Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Für die Co-Immunopräzipitation (CoIP) wurden 1×10^6 293T Zellen insgesamt mit 6 μg DNA in einer 6-cm Schale transfiziert. Hierbei wurden folgende Plasmide genutzt: Flag-PRMT6-pcDNA3.1, PPAR γ 1-pcDNA3, PPAR γ 2-pcDNA3, pcDNA3 Leervektor. Die Plasmide PPAR γ 1-pcDNA3 und PPAR γ 2-pcDNA3 wurden freundlicherweise von Prof. Thomas Kufer, Universität Hohenheim, zur Verfügung gestellt. Mit dem Leervektor wurde die DNA-Menge in den verschiedenen Ansätzen angeglichen. 24 h nach der Transfektion wurden Gesamtzellextrakte mit dem Lysepuffer 500 μl [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM Natriumchlorid, 10 mM Natriumfluorid, 20 mM β -Glycerophosphat, 0,1 % IGEPAL und 1 mM EDTA, frisch ergänzt mit Proteaseinhibitor-Cocktail (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 100 mM Natriumorthovanadat] hergestellt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden 7,5 mM Magnesiumchlorid und 50 U Benzonase zugegeben. Das Lysat wurde dann 2 Stunden lang bei 4 °C auf einem rotierenden Rad inkubiert und anschließend 10 Minuten lang bei 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay (Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) bestimmt. Pro IP wurden 600 μg Gesamtzellextrakt und 50 μl Pierce™ Anti-DYKDDDDK magnetische Agarose-Beads (Thermo Fisher Scientific: Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Reaktionen wurden 2 Stunden lang auf einem rotierenden Rad bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden zweimal mit Lysepuffer gewaschen und anschließend 5 Minuten lang in 2x Laemmli-Puffer gekocht. Der Überstand wurde auf eine 10%ige SDS-PAGE aufgetragen und durch Immunoblotting analysiert.

2.2.6 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Chromatin-Immunpräzipitationstests (ChIP) gemäß dem X-ChIP-Protokoll [197] von Abcam durchgeführt. ST2 sowie M2 Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^6 in 15-cm Schalen ausgesät und kultiviert. Bei Konfluenz wurde das Medium erneuert und die Zellen für 8 min gecrosslinked. Die Zellen wurden mit 2 ml Lysepuffer I pro 15-cm Schale und 300 μ l Lysepuffer II pro 15-cm Schale lysiert. 50 μ l sonifiziertes Chromatin wurde je Immunopräzipitation eingesetzt. Die genutzten Antikörper und deren Konzentrationen sind in Tabelle 13 angegeben. Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem ChIP DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland). Die Proben wurden mittels ChIP qPCR analysiert. Die Oligonukleotide hierfür sind in Tabelle 11 aufgelistet. Alle Experimente wurden mit mindestens zwei verschiedenen Chromatinpräparationen durchgeführt.

Tabelle 17: ChIP Lysepuffer

Lysepuffer I	Lysepuffer II (0,4 % SDS)	Lysepuffer II (0 % SDS)
5 mM PIPES pH 8,0	10 mM Tris-HCl pH 7,5	10 mM Tris-HCl pH 7,5
85 mM KCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
0,5 % IGEPAL	1 % IGEPAL	1 % (v/v) IGEPAL
	1 % Natriumdeoxycholat	1 % Natriumdeoxycholat
	1 mM EDTA	1 mM EDTA
	0,4 % SDS	

Tabelle 18: ChIP Waschpuffer

Waschpuffer I	Waschpuffer II	Waschpuffer III
20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	10 mM Tris pH 8,0
150 mM NaCl	500 mM NaCl	250 mM LiCl
2 mM EDTA	2 mM EDTA	1 mM EDTA
0,1 % SDS (w/v)	0,1 % SDS (w/v)	1 % IGEPAL (v/v)
1 % Triton X 100	1 % Triton X 100	1 % Natriumdeoxycholat

Tabelle 19: ChIP Wasch- & Elutionspuffer

TE	Elutionspuffer (frisch)
10 mM Tris pH 8,0	1 % SDS
1 mM EDTA	100 mM NaHCO ₃

2.2.7 Sequenzielle ChIP (ChIP-ReChIP)

Die Sequenzielle ChIP gleicht der ChIP bis zum ersten Elutionsschritt. Die Beads werden vier Mal mit Waschpuffer I gewaschen und eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 50 µl Elutionspuffer (50 mM Tris pH 7,5, 0,5 % SDS, 15 mM DTT) eluiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände der beiden gleichen Ansätze aus der ersten ChIP (siehe Tabelle 20) gepoolt und mit 700 µl Inkubationspuffer (50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 % IGEPAL, 0,25 % Natriumdeoxycholat) versetzt. Zu diesem ChIP-Ansatz wurden dann der zweite Antikörper (4 µg Prmt6-Antikörper oder IgG als Kontrolle) sowie 30 µl magnetische Protein A Beads. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Rad wurden die Beads drei Mal mit Waschpuffer I gewaschen und mit 120 µl Elutionspuffer (1 % SDS, 100 mM NaHCO₃) eluiert. 5 % des Inputs wurden ebenfalls mit Elutionspuffer versetzt. Zu den Proben wurde dann 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) gegeben und diese nun bei 65 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Aufreinigung der DNA und die qPCR gemäß Kapitel 2.2.6.

Tabelle 20: Beispielhafte Reaktionsansätze bei der ChIP-reChIP

	Reaktionen							
1. ChIP	IgG	IgG	IgG	IgG	Ppary	Ppary	Ppary	Ppary
2. ChIP	IgG		Prmt6		IgG		Prmt6	

2.3 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden werden molekularbiologische Methoden beschrieben, die zur Anfertigung dieser Arbeit genutzt wurden.

2.3.1 Klonierung

Die Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche erfolgte mittels PCR. Durch entsprechendes Primerdesign wurden der DNA zudem Restriktionsenzymststellen und HA-Tags hinzugefügt, siehe Tabelle 7. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 21 dargestellt, die angewandten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 22 beschrieben.

Für die Überexpression von Prmt6 wurde der Vektor LeGOiG2 verwendet [198]. LeGOiG2 war ein Geschenk von Boris Fehse (Addgene Plasmid # 27341; <http://n2t.net/addgene:27341>; RRID:Addgene_27341). Die cDNA von Prmt6 (NM_178891.4) wurde aus dem Vektor pGEM-mPRMT6 (Sino Biological, Eschborn, Deutschland) gekoppelt an einen N-terminalen HA-Tag herauskloniert.

Tabelle 21: PCR-Reaktionsansätze für die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

	Volumen [µl]
5x Phusion Puffer (GC-Puffer, HF-Puffer)	10
10 mM dNTPs	2
Primer 1 (0,5 µM)	0,5
Primer 2 (0,5 µM)	0,5
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0,5
3% DMSO	1,5
5 pg DNA-Template	x
ddH ₂ O	x
Σ	50

Tabelle 22: PCR-Bedingungen

Temperatur	98 °C	98 °C	60 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	2 min	30 s	30 s	1 min	10 min	∞
		35 Zyklen				

Zur Überprüfung des PCR-Produkts wurden 3 µl eines PCR-Ansatzes, versetzt mit 6x Auftragspuffer (NEB), gemeinsam mit einem 1 kb DNA Ladder (NEB) auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Für den Fall, dass neben dem erwarteten Fragment auch unspezifische Fragmente im PCR-Produkt vorhanden sind, wurde eine Reinigung über die Agarosegelelektrophorese vorgenommen, indem das DNA-Fragment der erwarteten Größe nach Auftrennung mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten wurde. Die nachfolgende Reinigung erfolgte mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* Kit nach Anleitung des Herstellers. Mit Hilfe des doppelten Restriktionsverdau wurde der Zielvektor linearisiert und die Restriktionsschnittstellen beim PCR-Produkt erzeugt. Die Temperatur, Dauer sowie der benötigte Puffer der Restriktionsreaktion wurden nach Empfehlung der Hersteller für die eingesetzten Enzyme gewählt. Bei einem Doppelverdau wurde folgende Seite zu Rate gezogen: <https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>. Für die Klonierung von HA-Prmt6 in den Vektor LeGOiG2 wurde mit den Enzymen EcoRI und NotI für 2 Stunden bei 37 °C verdaut, siehe Tabelle 23. Nach dem Restriktionsverdau wurden der geschnittene Vektor und das PCR-Produkt ebenfalls mit dem oben genannten Kit aufgereinigt.

Tabelle 23: Ansetzen eines Restriktionsverdaus

	Volumen
500 ng Vektor	x µl
CutSmart Puffer (10x)	2 µl
EcoRI-HF	0,5 µl
NotI-HF	0,5 µl
H ₂ O	x µl
Σ	20 µl

Die Ligation von linearer Vektor-DNA und PCR-Fragment erfolgte durch die T4 DNA Ligase. Der Ligationsansatz besteht aus den DNA-Fragmenten, die in einem geeigneten molaren Verhältnis zueinander gesetzt wurden. Das richtige Verhältnis von Vektor und Insert lässt sich mit Hilfe des NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) berechnen. Der Ligationsansatz (Tabelle 24) wurde bei 16° C über Nacht oder 22 °C für 10 min ligiert. Anschließend wurde die gesamte Ligation in chemisch kompetente *E.coli* JM109 mittels TSS-Hitzesschock-Methode transformiert.

Tabelle 24: Ligationsansatz

	Volumen
40 ng Vektor	x µl
Insert	x µl
Ligasepuffer (10x)	2 µl
H ₂ O	x µl
Σ	20 µl

Das Klonieren der gRNA's für Prmt6 und Ppary den Vektor lentiCRISPRv2 puro erfolgte dagegen über DNA Oligo Annealing, gemäß des Klonierungsprotokolls zum Vektor von (Zhang Lab GeCKO) Sanjana et al. [199]. Die Oligonukleotide wurden so designt, dass sie nach der Anlagerung für die Klonierung geeignete 5' bzw. 3' Überhänge für die Restriktionsendonuklease BsmBI aufwiesen, siehe Tabelle 7. Für das Annealing wurden jeweils 1 µl des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers (100 µM) mit 1 µl T4 Ligasepuffer (NEB) versetzt und 1 µl T4-Polynukleotidkinase (PNK) (NEB) hinzugegeben. Der Ansatz wurde auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt und zunächst für 30 min auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf 95 °C erhitzt. Das langsame Abkühlen erfolgte im ausgeschalteten Thermocycler über mehrere Stunden bis eine Temperatur von 25 °C erreicht wurde. Das optimale Temperaturgefälle liegt bei 5 °C pro Minute. Die für das Annealing verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 angegeben. Der Vektor

LentiCRISPRv2 puro war ein Geschenk von Brett Stringer (Addgene Plasmid # 98290; <http://n2t.net/addgene:98290>; RRID:Addgene_98290) und wurde für diese Klonierung dephosphoryliert, mit BsmBI verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Für die Ligation wurden die angelagerten Oligonukleotide 1:200 verdünnt und 50 ng des verdauten Vektors eingesetzt. Die ligierten Plasmide wurden anschließend in den Bakterienstamm Stbl3 transformiert.

2.3.2 Plasmidpräparation

Für die Experimente wurden verschiedene *E.coli* Stämme mit unterschiedlichen Eigenschaften verwendet. Für die Transformation von DNA in Bakterien wurden entweder die Elektroporation oder die Hitzeschock-Methode angewandt. Für die Elektroporation wurde die DNA in *E.coli* DH5 α transformiert. Für die Anwendung der Hitzeschock-Methode wurden die chemisch kompetenten *E.coli* JM109 oder *E.coli* Stbl3 benötigt. Um die Richtigkeit der Klone nach der Klonierung zu überprüfen, wurden Plasmide mittels Alkalischer Lyse isoliert. Für die Isolation der Plasmide wurde 1 ml Bakterienkultur aus 3 ml Vorkultur abzentrifugiert (4500 rpm, 5 min, RT), in 150 μ l Lysepuffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 μ g/ml RNase A) resuspendiert und gevortext. Dann wurden 150 μ l Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben und durch Invertieren gut gemischt. Nach 3-minütiger Inkubation wurden 150 μ l kalter Puffer 3 (3 M Kaliumacetat pH 5,2) hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Reaktion wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 15000 rcf für 10 min abzentrifugiert. 400 μ l des Überstands wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Isopropanol verdünnt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Ansatz erneut bei 15000 rcf für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen des Pellets wurden dann 200 μ l 70 %-iger Ethanol zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und zum Pellet in 100 μ l 100 %-igen Ethanol gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet unter einem Luftstrom getrocknet und in 40 μ l H₂O oder TE-Puffer gelöst. Sollte Plasmid-DNA zur Sequenzierung geschickt werden, wurde die DNA mit dem *NucleoSpin® Plasmid Mini* Kit von Macherey-Nagel gemäß Herstellerangaben isoliert. Für größere Mengen Plasmid-DNA wurde das *NucleoBond® Xtra Midi* Kit genutzt.

2.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Klonen wurde durch die Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Für den Sequenzierungsansatz wurden 500 ng DNA mit 5 μ l Sequenzierungsprimer versetzt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l gebracht und anschließend zur Firma Eurofins Genomics geschickt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Clone Manager 8.

2.3.4 Reverse Transkription - Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Für die Analyse der Genexpression wurde zunächst die RNA aus den Zellen, mit Hilfe des Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland), gemäß Herstellerprotokoll isoliert. 1 µg dieser RNA wurde zur cDNA-Synthese mittels First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) eingesetzt. Wovon wiederum 1 µl cDNA in der qPCR-Amplifikation eingesetzt wurde. Für den Nachweis der doppelsträngigen DNA wurde entweder SYBR Green (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) als DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff verwendet oder es wurden TaqMan Genexpressionsassays, bestehend aus unmarkierten Primern und einer fluorogenen (FAM) TaqMan Sonde (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), zur Erkennung des PCR-Produkts genutzt. Als Mastermix für die TaqMan-PCR wurde der Luna qPCR-Mix (NEB) eingesetzt. Jeder Ansatz, siehe Tabelle 25, wurde in Triplikaten bestimmt. Für die Datenauswertung wurde die $\Delta\Delta CT$ -Methode angewandt. Hierbei wurde auf die Expression des *TATA-binding-Proteins* (TBP) als Housekeeping-Gen normalisiert. Die Oligonukleotide, die in der qRT-PCR eingesetzt wurden, sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 angegeben. Die mRNA-Expression der Kontrollzellen diente jeweils als Bezugspunkt und wurde daher auf Eins gesetzt. Die mRNA-Expression der anderen Bedingungen wurde dazu in Bezug gesetzt und in Relation zur Expression der Kontrollzellen ausgegeben.

Tabelle 25: Zusammensetzung der qRT-PCR-Ansätze

	SYBR Green		TaqMan
	96-Well Platte [µl]	384-Well Platte [µl]	384-Well Platte [µl]
SYBR Green Mix mit ROX Additive (1:500)	10	5	-
Luna qPCR-Mix	-	-	5
TaqMan Assay	-	-	0,5
Primermix (10 µM)	0,5	0,25	-
H ₂ O	6,5	1,75	1,5
Template (1:3)	3	3	3
Σ	20	10	10

2.4 Zellbiologische Methoden

Im Folgenden werden zellbiologische Methoden beschrieben, die zur Anfertigung dieser Arbeit genutzt wurden.

2.4.1 Kultivierung von Zelllinien

HEK293T Zellen (DSMZ, Braunschweig, Germany) wurden in DMEM GlutaMAX Medium (Gibco, Waltham, MA, USA), ST2 Zellen (DSMZ) in RPMI 1640 GlutaMAX Medium (Gibco) kultiviert, welche mit 10 % Fötalem Kälber Serum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) versetzt wurde. Die mBMSC Zelllinie M2 [195] wurde in α MEM (Gibco) mit 15 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Für die Hemmung von Prmt6 wurden der selektive Inhibitor SGC6870 (Sigma, Darmstadt, Germany) und dessen inaktive Kontrollverbindung SGC6870N bei einer Konzentration von 5 μ m verwendet [200].

Für die Überexpression von Prmt6 wurden die ST2 Zellen mit Prmt6-LeGOiG2 oder dem Leervektor LeGOiG2 (Addgene Plasmid 27341) [198] transduziert. Für den Knockout von Prmt6 wurden die Zellen mit gRNA's im lentiCRISPRv2 (Addgene Plasmid 98290) [201] Vektor transduziert. Der LeGOiG2 Leervektor und ein Vektor, der eine nicht-spezifische gRNA exprimiert, wurden als Kontrollen verwendet.

2.4.2 Immunofluoreszenz Mikroskopie

ST2 Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten Coverslips kultiviert, mit PBS+/+ gewaschen und mit 4 %-igem Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X 100 (Carl Roth, Karlsruhe) in PBS für 5 Minuten permeabilisiert. Nach einem 30-minütigen Blockierungsschritt in 5 % BSA in PBS wurden die Zellen mit den Primärantikörpern markiert, gewaschen und mit Sekundärantikörpern gefärbt. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI, sowie das cytoplasmatische F-Aktin mit Phalloidin (iFluor555, Abcam) gefärbt. Die Färbung wurde mit Fluoramount-G (Invitrogen) fixiert. Analysiert wurden die Proben mit dem LSM710 (Zeiss, Oberkochen). Die verwendeten Antikörper und deren Konzentrationen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

2.4.3 Adipogene Differenzierung und Oil-Red-O Färbung

Die ST2 oder M2 Zellen wurden mit einer Dichte von 15.000 Zellen/cm² Kultivierungsfläche in Adipozyten-Differenzierungsmedium (DMEM GlutaMAX, angereichert mit 9 % FCS, 250 nM Dexamethason, 1 µM Rosiglitazon, 5 µg/ml Insulin, 450 µM IBMX) ausgesät. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Nach der Adipozyten-Differenzierung, sowie zu den angegebenen Zeitpunkten während der Differenzierung, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 %-igem Formaldehyd für 10 min fixiert. Danach wurden die Zellen mit 60 %-igem Isopropanol gewaschen und die Wells, vor der Zugabe der Oil-Red-O Lösung, komplett getrocknet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die in mit Lösungsmittel versetztem Kultivierungsmedium gehalten wurden. Die Fetttröpfchen wurden mit dem Mikroskop analysiert. Für eine Quantifizierung der Fettmenge wurde anschließend das in den Zellen gebundene Oil-Red-O mit 100 %-igem Isopropanol aus den Zellen herausgelöst und bei 500 nm im Platten-Lesegerät analysiert.

2.4.4 Erzeugung der Lentiviren

Für die Herstellung der Lentiviren wurden 4,5x10⁶ HEK293T-Zellen in 10-cm Schalen ausgesät. Nach 24 h wurden die HEK293T-Zellen mit einem Mix bestehend aus 65 µl PEI (1 mg/ml), 4 µg pMD2.G (Verpackungsplasmid), 6,5 µg pCMVdelta8.91 (Verpackungsplasmid) und 10 µg des Zielpasmids transfiziert. Pro Ansatz wurden zwei Platten HEK293T-Zellen transfiziert. Der Virus-enthaltende Mediumüberstand wurde jeweils nach 24 h und 48 h nach der Transfektion abgenommen, gepoolt und durch eine PVDF-Membran mit 0,45 µm Porengröße gefiltert. Anschließend wurde der Überstand bei 25.000 rpm für 1,5 h bei 4 °C ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl PBS resuspendiert und der Virus anschließend bei –80 °C eingefroren.

2.4.5 Transduktion der Zellen

Für die Transduktion wurden 0,6x10⁶ ST2-Zellen in 10 ml Kulturmedium zusammen mit 50 µl Virus und 8 µg/ml Polybrene (Sigma) in eine 10-cm Schale gegeben. Bei der Prmt6-LeGOiG2 Überexpression diente Virus mit dem LeGOiG2-Leervektor als Kontrolle. Die Transfektionseffizienz kann bei diesem Vektor über das exprimierte GFP am Mikroskop und im Durchflusszytometer überprüft werden. Experimente wurden ab einer Transduktionseffizienz von 80 % durchgeführt. Für die Knockout-Experimente wurde eine nicht-spezifische gRNA im lentiCRISPRv2 Vektor als Kontrolle genutzt. 24 h nach der Transduktion wurde das Medium gewechselt. Auf dem lentiCRISPRv2 Vektor befindet sich ein Selektionsmarker für eine Puromycin-Resistenz. Hier wurde zudem ab 48 h nach der Transduktion 1 µg/ml Puromycin (InvivoGen, Toulouse, France) zum Medium hinzugefügt. Als Sterbekontrolle für nicht-transduzierte Zellen wurde von Beginn an eine 10-cm Schale

mit Zellen mitgeführt, die lediglich statt 50 µl Virus mit 50 µl PBS transduziert wurden. Diese Zellen starben spätestens 48 h nach der Puromycin-Behandlung.

2.5 Nomenklatur

Der übersichtlichen Lesbarkeit wegen, wurde in der in der Einleitung und den Überschriften auf die korrekte Schreibweise von murinen Genen und Proteinen verzichtet und einheitlich die humane Schreibweise verwendet. In der Einleitung wurden daher alle Gene und Proteine in Großbuchstaben geschrieben und gegebenenfalls mit einem h für human und m für murin gekennzeichnet. In der korrekten Schreibweise für murine Gene und Proteine ist jeweils nur der erste Buchstabe in Großbuchstaben. Gene werden zusätzlich kursiv geschrieben.

2.6 Statistik/Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens in drei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der Software GraphPad Prism analysiert. In den Abbildungen dargestellt sind die Daten als Mittelwert $\pm$ Standardfehler. Mittels Student's t-Test oder ANOVA (Varianzanalyse, analysis of variance) wurden die Signifikanzen ermittelt. Die jeweiligen *P*-Werte sind in den Abbildungsbeschriftungen angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von PRMT6 in der Adipogenese

Einzelzell-mRNA-Expressionsdaten des Human Protein Atlas zeigen keine Zelltyp-spezifische Expression von PRMT6 [202, 203]. Aus den Daten ist jedoch eine geringere Expression von PRMT6 in Adipozyten als in mesenchymalen Zellen (MSCs) zu entnehmen [203, 204], siehe Abbildung 4. Da Adipozyten durch Differenzierung aus diesen Zellen hervorgehen, soll ein möglicher Effekt von PRMT6 auf die Adipogenese untersucht werden.

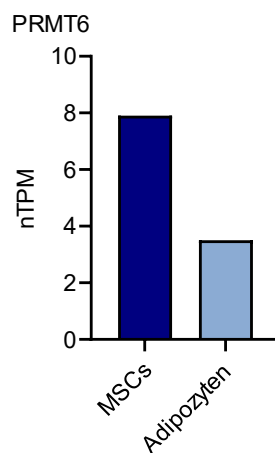


Abbildung 4: Einzelzell-mRNA-Sequenzierung von PRMT6

Einzelzell-mRNA-Expressionsdaten des öffentlich zugänglichen Human Protein Atlas zeigen geringere Mengen von PRMT6 in Adipozyten im Vergleich zu mesenchymalen Zellen. Die Quantifizierung der Expressionsniveaus wird in Transkripte pro Million (nTPM) angegeben. Die bereitgestellten Daten erlauben keine Darstellung mit Fehlerbalken.

Um die Rolle von PRMT6, während der Adipogenese von MSCs, zu untersuchen wurde die Expression von *Prmt6* in murinen ST2 Zellen, welche stromale Vorläuferzellen darstellen, untersucht. Diese Zellen haben das Potential zur osteogenen und adipogenen Differenzierung [205].

Zunächst wurde die erfolgreiche Differenzierung in ST2 Zellen überprüft. Hierfür wurden die ST2 Zellen für 14 Tage mittels Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten im Differenzierungsverlauf die mRNA-Level adipozytärer Gene überprüft (Abbildung 5, Abbildung A 1). Durch *C/ebpβ* wird die Adipogenese initiiert. Dieser Transkriptionsfaktor wird bereits 24 h nach Differenzierungsstart in den ST2 Zellen hoch reguliert (siehe Abbildung A 1A). *Pparγ* gilt als Masterregulator der Adipogenese. Beide Isoformen, *Pparγ1* und *Pparγ2* (Abbildung 5A, Abbildung 5B), zeigten nach Induktion der Differenzierung erhöhte Expressionen. Auch die Genexpression von *C/ebpα* war bereits 24 h nach Differenzierungsbeginn erhöht (Abbildung 5C, Abbildung A 1B). Nicht nur die

Genexpressionen dieser Transkriptionsfaktoren waren über den Differenzierungsverlauf signifikant erhöht, auch die Proteinmenge stieg innerhalb der ersten drei Tage nach Induktion (Abbildung 5D) an. An den Tagen 2 und 3 nach Differenzierungsstart konnte Ppar γ 2 im Western Blot detektiert werden. Als Ladekontrolle diente TATA-Box Binde-Protein (TBP). Die mRNA-Level sowie deren Proteinexpression der adipozyten spezifischen Gene *Fabp4* (Abbildung 5E, Abbildung A 1C) und *Adipoq* (Abbildung 5F, Abbildung A 1C) waren nach Differenzierungsbeginn rasch drastisch erhöht.

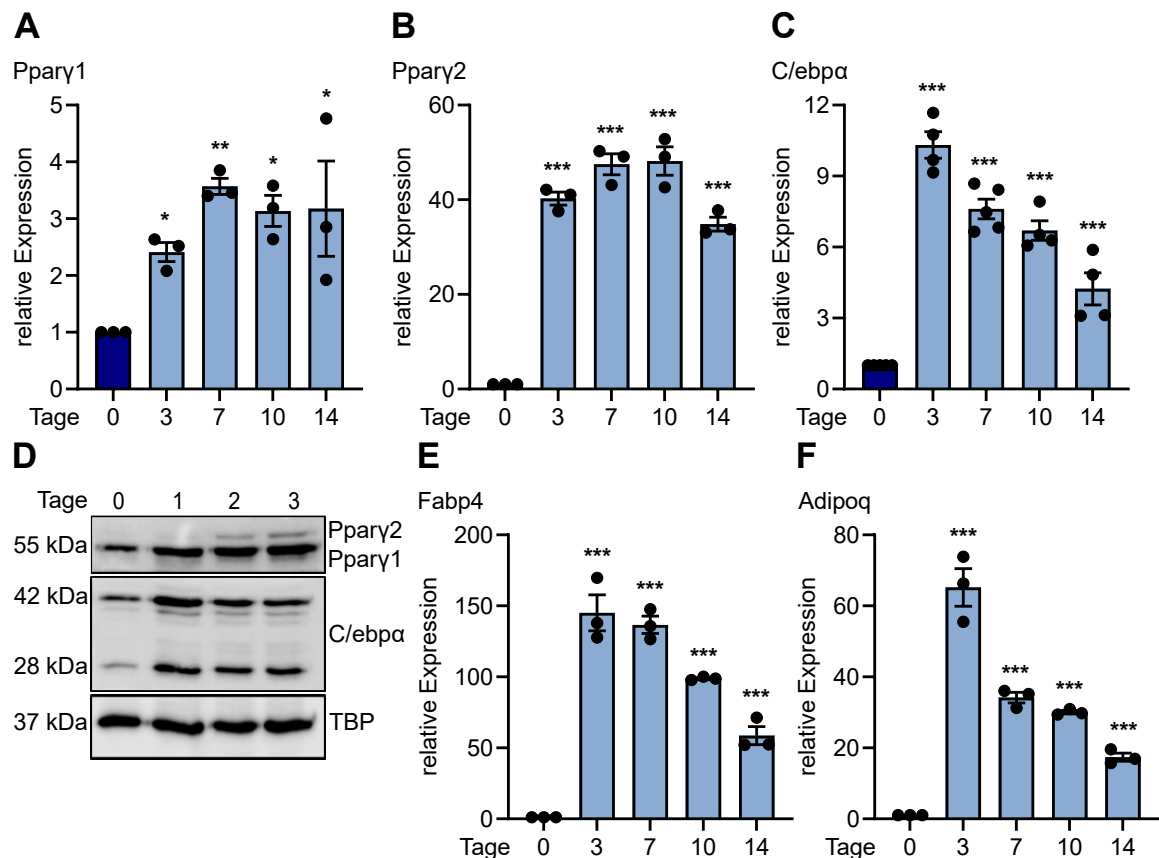


Abbildung 5: Genexpression während der Adipozyten Differenzierung

ST2 Zellen wurden 14 Tage mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses ihre Genexpression mittels qRT-PCR ermittelt. Expression von (A) *Ppar γ 1*, (B) *Ppar γ 2* und (C) *C/ebpa* während der Adipogenese. (D) Die Western Blot Analyse zeigt die Expression der Proteine Ppar γ 1, Ppar γ 2 und C/ebpa während der angegebenen Zeitpunkte der Adipogenese. Der Western Blot wurde mit Lysaten von differenzierten ST2 Zellen und Antikörpern gegen die gezeigten Proteine durchgeführt. Im Western Blot diente TBP als Ladekontrolle. mRNA-Level der Adipozyten-spezifischen Gene (E) *Fabp4* und (F) *Adipoq*. Die qRT-PCR wurde mit genspezifischen Primerpaaren durchgeführt und die Daten als relative Expression, normalisiert auf das Housekeeping-Gen TBP, dargestellt. Die Werte von Tag 0 wurden als 1 gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus dem Mittelwert von mindestens drei Experimenten. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. **P*<0,033, ***P*<0,002, ****P*<0,001.

Zudem wurde das Oberflächenprotein Perilipin untersucht, welches die Lipidtropfen in Adipozyten umhüllt. Die Genexpression von *Plin1* war bereits 24 h nach Induktion der

Differenzierung erhöht (Abbildung A 1D). Als in der Adipogenese negativ reguliertes Gen wurde *Runx2* untersucht. *Runx2* spielt in der Osteogenese eine große Rolle. Die Literatur beschreibt eine jeweilige Hemmung von *Pparγ* oder *Runx2* im jeweils gegensätzlichen Differenzierungsprogramm. Die Hemmung von *Runx2* in der Adipogenese in ST2 Zellen konnte bestätigt werden (Abbildung A 1E).

Außerdem wurde die Expression einiger relevanter Transkriptionsfaktoren im Differenzierungsverlauf in einer weiteren murinen Zelllinie, den M2 Zellen, überprüft (Abbildung A 2). In dieser Zelllinie konnte mit dem angewandten Differenzierungsprotokoll ebenfalls ein Anstieg der Expression für *Pparγ* (Abbildung A 2A), *C/ebpa* (Abbildung A 2B), *Fabp4* (Abbildung A 2C) und *Adipoq* (Abbildung A 2D) nachgewiesen werden.

Die erfolgreiche Differenzierung wurde zudem mittels Oil-Red-O Färbung der in die Zellen eingelagerten Fettsäuren überprüft. Über den Differenzierungsverlauf wird immer mehr Fett in den Zellen eingelagert. Im Lichtmikroskop waren erste kleine Fetttropfen ab Tag 6 der Differenzierung zu sehen. Daher wurde der erste Zeitpunkt für die Untersuchungen auf sieben Tage nach Induktion der Adipogenese festgelegt. Der zweite Zeitpunkt nach 14 Tagen markiert den Endpunkt der Adipogenese. In den Experimenten nahm die Fettmenge in den ST2 Zellen (Abbildung 6) sowie den M2 Zellen (Abbildung A 3) im Differenzierungsverlauf zu.

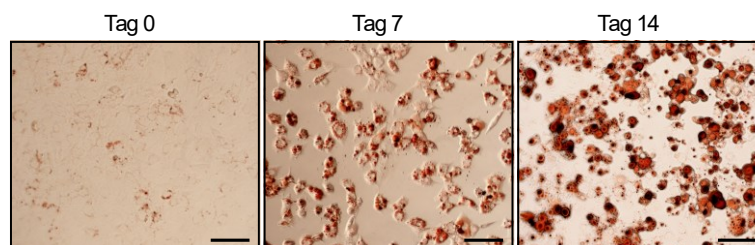


Abbildung 6: Färbung des eingelagerten Fetts in den Zellen

ST2 Zellen wurden 14 Tage mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt, fixiert und mit Oil-Red-O gefärbt. Oil-Red-O färbt intrazelluläres Fett, welches im Laufe der Adipogenese in den Zellen eingelagert wird. Nach sieben Tagen der Differenzierung konnten bereits Fetttropfen in den Zellen gefärbt werden, die sich nach 14 Tagen vermehrten und vergrößerten. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Oil-Red-O Färbung. Der Maßstab gibt 100 μm an. N=3.

Mit der Adipogenese geht eine große Umstrukturierung der Zelle einher. Um mögliche Lokalisationsänderungen von *Prmt6* auf Grund des Differenzierungsprozessen zu ermitteln, wurde *Prmt6* in ST2 Zellen mittels Immunfluoreszenz lokalisiert (Abbildung 7A). Hierfür wurde das Cytoskelett der Zelle sowie der Zellkern gefärbt. Phalloidin färbt das F-Aktin (rot) und DAPI markiert die DNA im Zellkern (blau). *Prmt6* ist in Abbildung 7 grün dargestellt. *Prmt6* befand sich in ST2 Zellen sowohl im undifferenzierten Zustand als auch nach

erfolgter Differenzierung zum Adipozyten, im Nukleus. In der Negativkontrolle (Abbildung 7B) war keine Färbung durch den sekundären Antikörper ersichtlich.

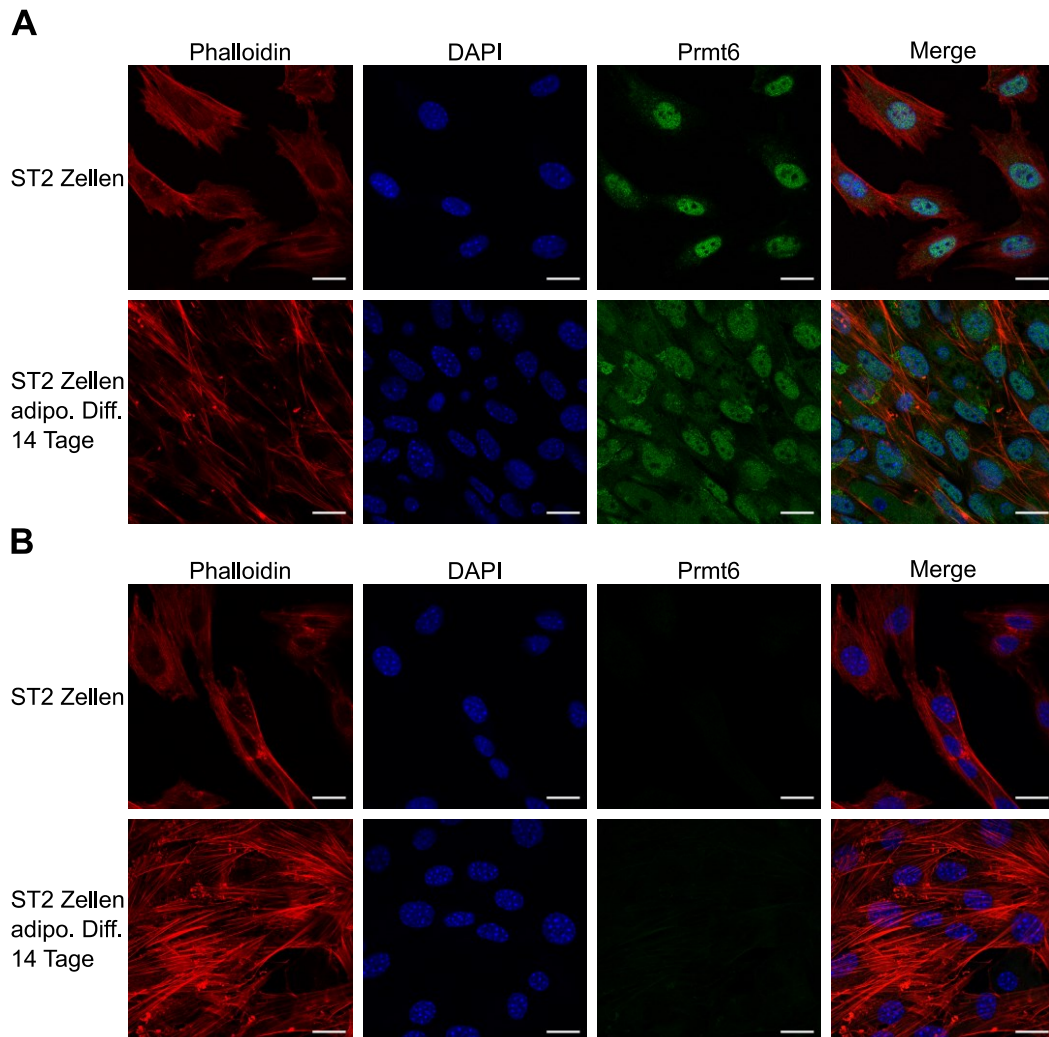


Abbildung 7: Immunofluoreszenzfärbung von Prmt6

ST2 Zellen wurden für 14 Tage in Richtung Adipozyten differenziert. Immunofluoreszenzfärbung von nicht-differenzierten und für 14 Tage differenzierten ST2 Zellen. Rotes Phalloidin-iFluor555 färbt cytoplasmatisches F-Aktin und die blaue DAPI-DNA-Färbung zeigt den Zellkern an. (A) Prmt6 wurde mit einem Anti-Prmt6-Antikörper nachgewiesen und mit einem Alexa-488-Sekundärantikörper (grün) markiert. (B) In der Negativkontrolle ist keine Färbung ersichtlich. Der äußerst rechte Teil der Abbildung zeigt die Zusammenführung der drei Signale. Die Färbung zeigt das Vorhandensein von Prmt6 im Zellkern vor und nach 14 Tagen adipozytärer Differenzierung. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der Immunofluoreszenzfärbungen. Der Maßstab gibt 20 μm an.

Um eine mögliche Rolle von *Prmt6* in der Adipogenese zu erforschen, wurde dessen mRNA-Expressionslevel während der 14-tägigen Adipogenese in ST2 Zellen untersucht (Abbildung 8A, Abbildung A 1E). Die Expression blieb über den Verlauf der Differenzierung weitestgehend konstant. An Tag 2 und Tag 3 nach Induktion war die Expression von *Prmt6* dagegen erhöht. Auf Proteinebene nahm *Prmt6* während der Adipogenese in ST2 Zellen hingegen konstant ab (Abbildung 8B). Als Ladekontrolle im Western Blot diente β -2-Mikroglobulin (B2m). In M2 Zellen war dagegen kein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von *Prmt6* nachweisbar (Abbildung A 2E).

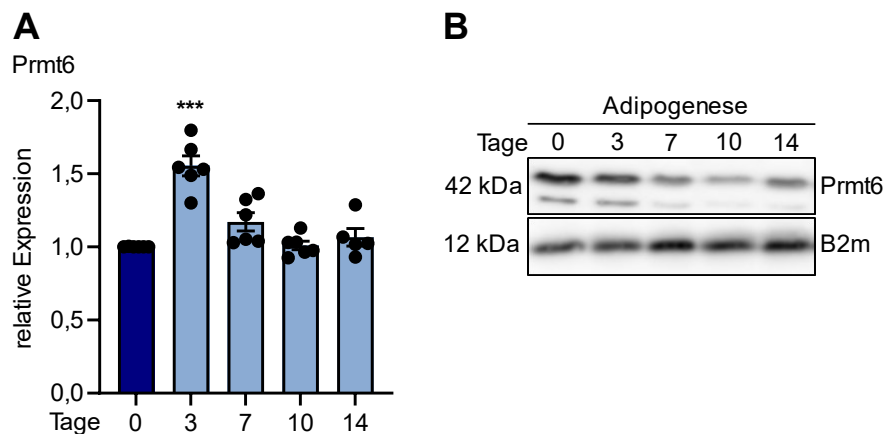


Abbildung 8: *Prmt6* während der Adipogenese

ST2 Zellen wurden 14 Tage mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses wurde die Expression von *Prmt6* ermittelt. (A) mRNA-Expression von *Prmt6* zu den angegebenen Zeitpunkten während der Adipogenese. Die real-time PCR wurde mit spezifischen Primern durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (N=6). Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. ****P*<0,001. (B) Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von *Prmt6* zu den angegebenen Zeitpunkten der Adipozyten-Differenzierung. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen die gezeigten Proteine durchgeführt. Ein Western Blot mit einem Anti-B2m Antikörper diente als Ladekontrolle. (N=3).

Während der Adipogenese war ein Effekt in der Expression von *Prmt6* in ST2 Zellen zu sehen. Auf mRNA-Ebene nimmt die Expression von *Prmt6* zu, das Protein wird im Differenzierungsverlauf immer weniger (Abbildung 8). Eine mögliche Ursache hierfür ist die proteasomale Degradierung von *Prmt6*. Um dies zu untersuchen, wurden ST2 Zellen mit 20 μ M des Proteasom Inhibitors MG132 (sc-201270, Santa Cruz Biotechnology) oder der Lösemittelkontrolle DMSO behandelt. Nach 6 h wurde kein Effekt auf *Prmt6* festgestellt. Runx2 diente dabei als Positivkontrolle für die proteasomale Degradierung [206]. Für den Fall, dass die Halbwertszeit von *Prmt6* deutlich länger als die von Runx2 in ST2 Zellen ist, wurde die Expression von *Prmt6* auch nach 8 h und 12 h Inhibitorbehandlung mit MG132 untersucht. Auch hier war kein Effekt auf die Expression von *Prmt6* erkennbar. Daher ist nicht anzunehmen, dass *Prmt6* in ST2 Zellen der proteasomalen Degradierung unterliegt.

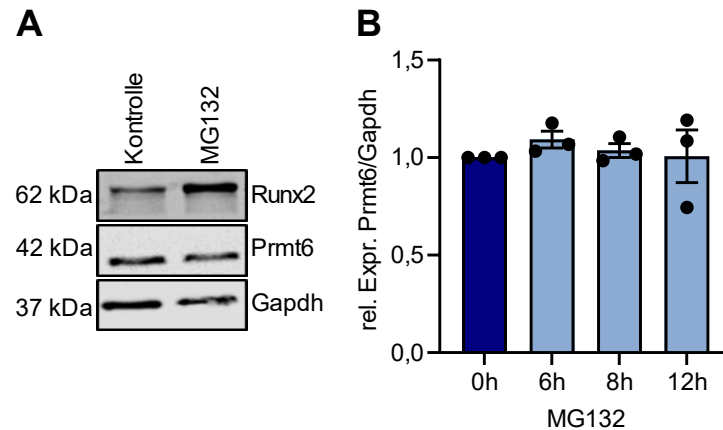


Abbildung 9: Prmt6 unterliegt nicht der proteasomalen Degradierung

ST2 Zellen wurden mit 20 μ M Proteasom Inhibitor MG132 oder DMSO als Kontrolle behandelt. (A) Western Blot Analyse der für 6 h behandelten ST2 Zellen. Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von Prmt6 und Runx2. Der Western Blot wurde mit Lysaten der ST2 Zellen durchgeführt, die zuvor für 6 h mit 20 μ M Proteasom Inhibitor MG132 oder DMSO behandelt wurden. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen die gezeigten Proteine durchgeführt. Ein Western Blot mit einem Anti-Gapdh Antikörper diente als Ladekontrolle. Es wurden Expressionsunterschiede der Proteine von Prmt6 und Runx2 untersucht. Gapdh diente als Ladekontrolle. N=3. (B) ST2 Zellen wurden mit 20 μ M Proteasom Inhibitor MG132 oder DMSO als Kontrolle über 12 h behandelt. Dargestellt ist Quantifizierung der Proteinexpression aus Western Blots von Prmt6, normalisiert zu Gapdh, an den angegebenen Zeitpunkten. N=3.

3.2 PRMT6 hemmt die Adipogenese

Um den Einfluss von Prmt6 auf die Adipogenese zu untersuchen, wurde Prmt6 zunächst in ST2 Zellen überexprimiert und daraufhin die adipogene Differenzierung initiiert.

Der Nachweis der Überexpression des Prmt6 Proteins erfolgte durch Immunoblotting mit einem gegen Prmt6 und einem gegen HA-Tag gerichteten Antikörper (Abbildung 10A). TBP diente dabei als Ladekontrolle. In den Zellen der mit der Überexpression wurde mehr Prmt6 detektiert als in den ST2 Zellen, die mit Leervektor transduziert wurden. Der HA-Tag wurde lediglich in den Prmt6 überexprimierenden Zellen nachgewiesen. Auch die relative Expression der mRNA ist in den Prmt6 Zellen drastisch erhöht (Abbildung 10B).

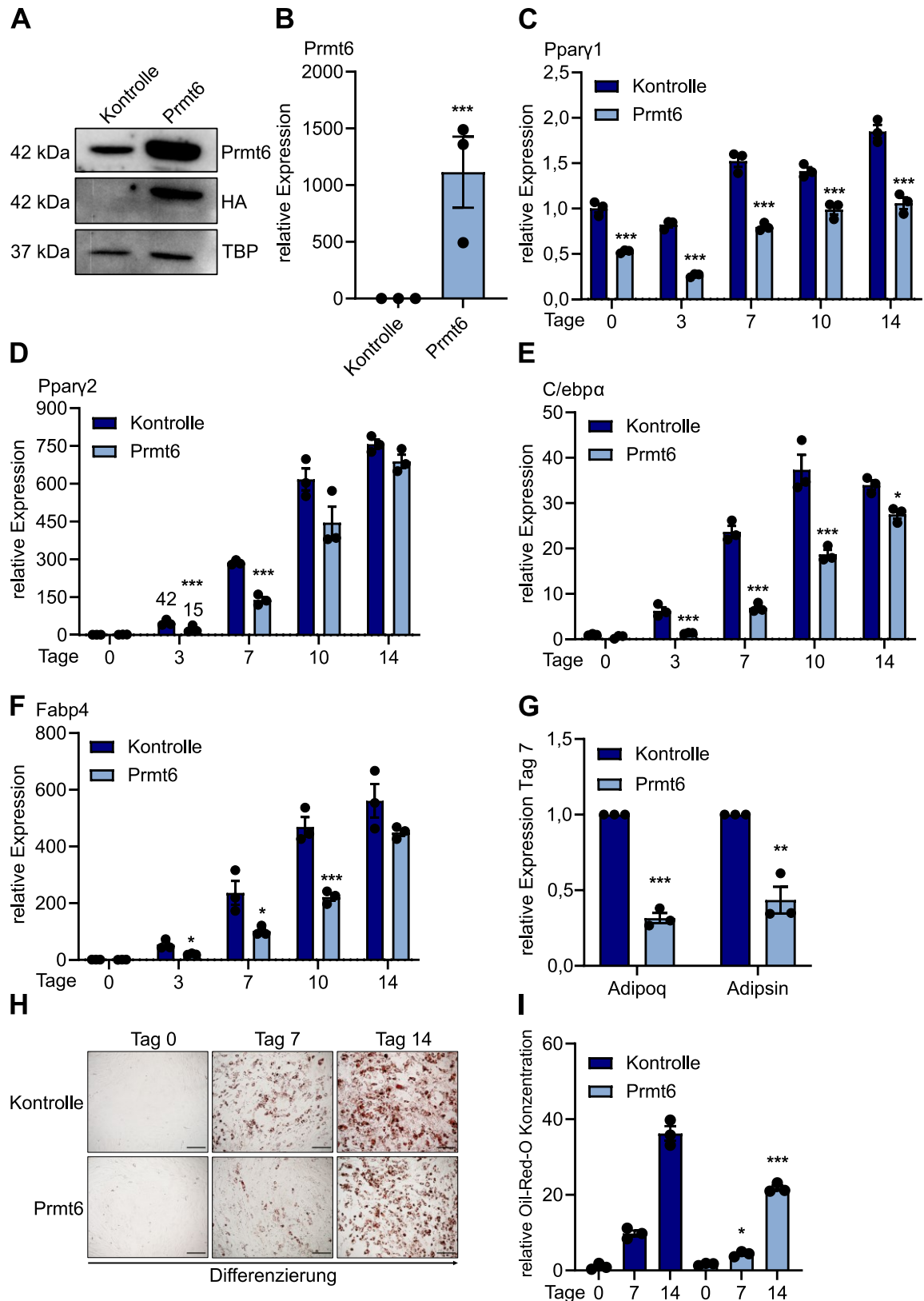


Abbildung 10: Prmt6 hemmt die Adipogenese

HA-Prmt6, sowie der Leervektor LeGOiG2 als Kontrolle, wurden lentiviral in ST2 Zellen transduziert. (A) Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von Prmt6, HA-Prmt6 und TBP als Ladekontrolle. Der Western Blot wurde mit Anti-Prmt6, Anti-HA und Anti-TBP Antikörpern durchgeführt. TBP diente dabei als Ladekontrolle. Die Überexpression konnte über beide Antikörper nachgewiesen werden. HA war nur in den HA-Prmt6 transduzierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. (B) Die Prmt6-Überexpression zeigte sich auch auf mRNA-Ebene. Die qRT-PCR wurde mit genspezifischen

Primerpaaren für *Prmt6* durchgeführt und die Daten als relative Expression, normalisiert auf das Housekeeping-Gen TBP, dargestellt. Während der Differenzierung der ST2 Zellen für 14 Tage wurde die Genexpression von relevanten Transkriptionsfaktoren für die Adipozyten-Differenzierung an den gegebenen Zeitpunkten untersucht. (C) *Pparγ1* wurde in den *Prmt6* exprimierenden Zellen weniger exprimiert als in den Kontrollzellen. (D) *Pparγ2* als adipogener spezifischer Marker war ebenfalls verringert. (E) *C/ebpa* und (F) *Fabp4* waren ebenfalls in den *Prmt6* exprimierenden Zellen geringer exprimiert. (G) Auch die Adipokine Adiponektin (*Adipoq*) und Adipsin waren am Tag 7 weniger exprimiert als in den Kontrollen. Die qRT-PCR wurde mit genspezifischen Primerpaaren für die gezeigten Gene durchgeführt und die Daten als relative Expression, normalisiert auf das Housekeeping-Gen TBP, dargestellt. Die Werte von Tag 0 der Kontrolle wurden als 1 gesetzt. (H) Die Überexpression von *Prmt6* zeigte weniger eingelagertes Fett zu den angegebenen Zeitpunkten als in den Kontrollzellen. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Oil-Red-O Färbung. Der Maßstab zeigt 200 μm . (I) Die Quantifizierung der Fettmenge zeigte eine höhere Konzentration an Fett in den Kontrollzellen im Vergleich zu den *Prmt6* exprimierenden Zellen. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. **P*<0,033, ***P*<0,002, ****P*<0,001.

Durch Wechsel des Kultivierungsmedium auf das Adipozyten-Differenzierungsmedium wurden die ST2 Zellen anschließend 14 Tage lang hin zu Adipozyten differenziert. Durch die Überexpression von *Prmt6* war der Anstieg der wichtigen Regulatoren der Adipogenese *Pparγ1* (Abbildung 10C), *Pparγ2* (Abbildung 10D) und *C/ebpa* (Abbildung 10E) reduziert. Auch die relative Expression von *Fabp4* war über den Differenzierungsverlauf hinweg in den ST2 Zellen mit *Prmt6* Überexpression geringer (Abbildung 10F). Betrachtet man zudem die relative Expression der Adipokine Adiponektin (*Adipoq*) und Adipsin nach 7-tägiger Differenzierung, so wurde auch hier der negative Effekt durch *Prmt6* deutlich (Abbildung 10G). Als Resultat dieser Ergebnisse wurde in den Kontrollzellen eine höhere Fettmenge über die Färbung der eingelagerten Fetttropfchen ermittelt als nach *Prmt6* Überexpression (Abbildung 10H). Dies spiegelte sich auch in der Quantifizierung der Fettmenge wider (Abbildung 10I).

3.3 Interaktion von PPAR γ mit PRMT6

Durch die Inhibierung von *Prmt6* zeigte sich eine erhöhte Expression von *C/ebpa*, was ein wichtiges Zielgen von *Pparγ2* während der Adipogenese darstellt. Dies unterstützt die Annahme, dass *Prmt6* durch *Pparγ* an den Promotor von *C/ebpa* rekrutiert wird [207].

Um zu überprüfen, ob die Isoformen *Pparγ1* und *Pparγ2* mit *Prmt6* assoziieren können, wurde eine Coimmunopräzipitation (CoIP) durchgeführt. Hierfür wurde Flag-markiertes PRMT6 mit beiden PPAR γ Isoformen in HEK293T Zellen exprimiert. In der CoIP wurden anti-Flag-Beads verwendet, um Flag-PRMT6 zu präzipitieren. Der Western Blot mit anti-*Pparγ* Antikörper zeigte eine Copräzipitation von beiden untersuchten Isoformen von PPAR γ , PPAR $\gamma1$ und PPAR $\gamma2$, mit PRMT6 (Abbildung 11A).

Die Interaktion von PPAR γ und PRMT6 wurde anschließend in einem GST-Pulldown Experiment mit rekombinantem GST-PRMT6 und *in vitro* translatiertem ^{35}S markiertem PPAR γ bestätigt (Abbildung 11B).

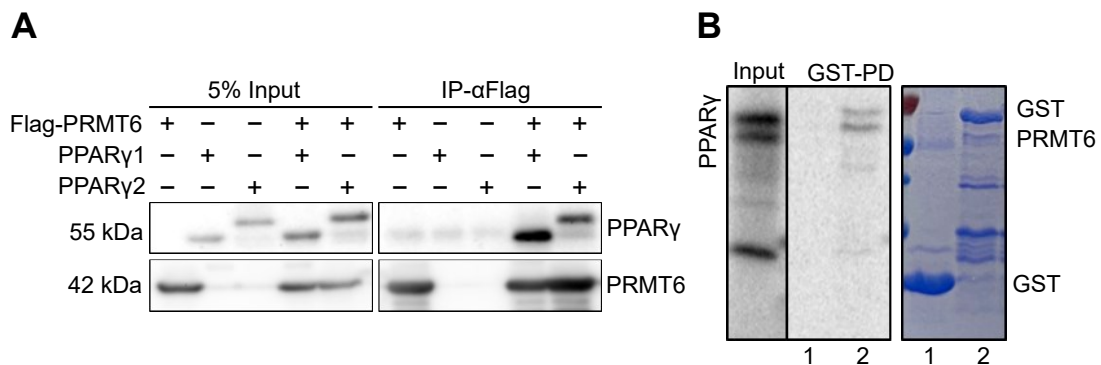


Abbildung 11: Interaktion von PPAR γ und PRMT6 auf Proteinebene

Die Protein-Protein Interaktion von PPAR γ und PRMT6 wurde über zwei verschiedene Methoden nachgewiesen. (A) CoIP in HEK293T Zellen, bei der nach der Präzipitation von Flag-PRMT6 PPAR γ 1 und PPAR γ 2 im Western Blot detektiert wurden. Im Western Blot wurden die Proteine mit einem Anti-PPAR γ und einem Anti-Flag Antikörper für PRMT6 angefärbt. (B) GST-Pulldown (GST-PD) mit ^{35}S markiertem PPAR γ . In Spur 1 ist die GST-Kontrolle aufgetragen. Dort ist kein Proteinnachweis erfolgt. In Spur 2 ist das mit GST markierte PRMT6 aufgetragen. Im Autoradiogramm sind auf Höhe von PPAR γ im GST-PD Banden sichtbar. Die Coomassie-Färbung ganz rechts außen zeigt den Nachweis von GST in Spur 1 und GST-PRMT6 in Spur 2.

Darüber hinaus wurde eine Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) von endogenem Ppar γ und Prmt6 am *C/ebpa* Promotor in ST2 Zellen durchgeführt. Hierbei konnten Ppar γ und Prmt6 in der Nähe des Transkriptionsstarts des *C/ebpa*-Gens detektiert werden (Abbildung 12A). Zudem waren Ppar γ und Prmt6 an der Promotorregion von *Ppar γ* gebunden (Abbildung 12B).

Um weitergehend zu untersuchen ob Ppar γ und Prmt6 gleichzeitig an den *C/ebpa* Promotor binden, wurde eine sequenzielle Chromatinimmunopräzipitation (ChIP-reChIP) durchgeführt. Eine simultane Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren Ppar γ und Prmt6 am *C/ebpa* und *Ppar γ* am Promotor konnte ermittelt werden (Abbildung 12C, D). An der Kontrollregion konnte keine Transkriptionsfaktorbindung festgestellt werden (Abbildung 12E).

Diese Daten zeigen eine gemeinsame Bindung von Ppar γ und Prmt6, sowohl am *Ppar γ* als auch am *C/ebpa* Promotor, in undifferenzierten ST2 Zellen.

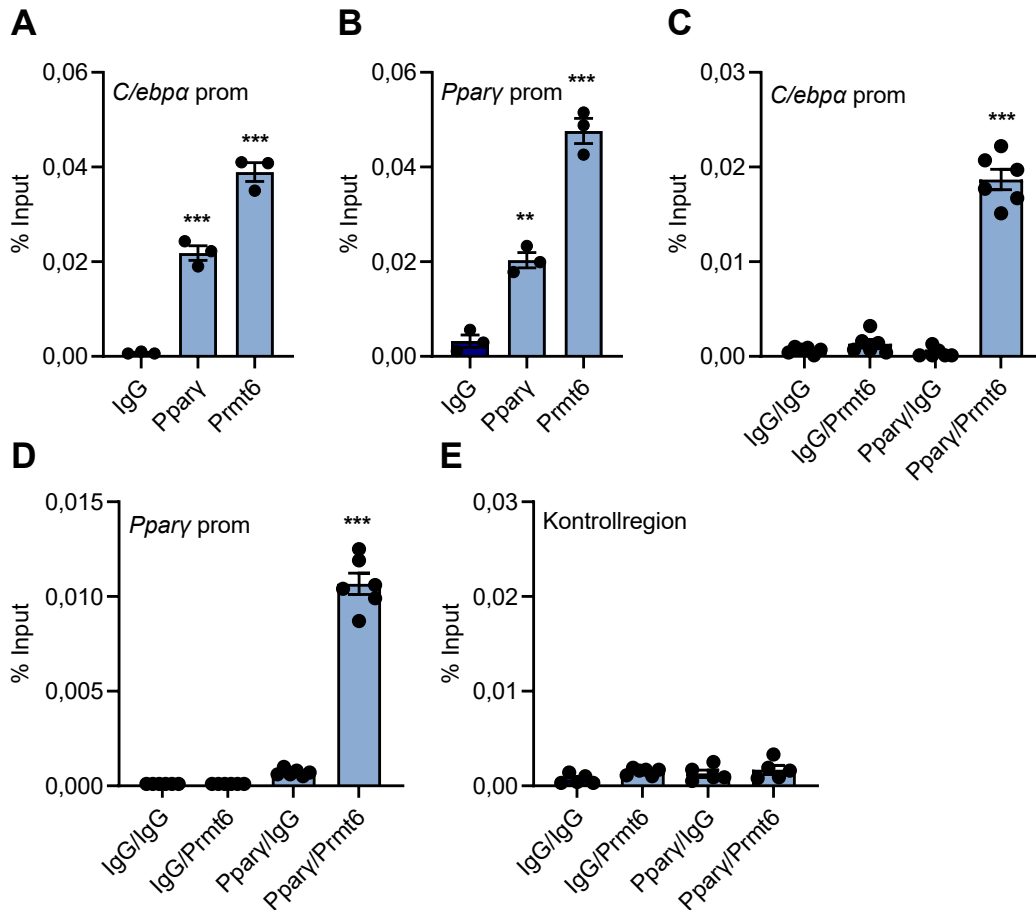


Abbildung 12: Interaktion von Prmt6 und Pparγ auf Chromatinebene

(A) Um die Bindung von Prmt6 und Pparγ an den *C/ebpa* Promotor zu untersuchen, wurde eine ChIP mit Antikörpern durchgeführt, die endogenes Prmt6 bzw. Pparγ nachweisen. (B) Bindung von Prmt6 und Pparγ am *Pparγ* Promotor. (C-E) Um zu ermitteln, ob Prmt6 und Pparγ gemeinsam an Zielgene binden, wurde eine ChIP-reChIP-Analyse durchgeführt. (C) ChIP-reChIP Analyse von Prmt6 und Pparγ am Promotor von *C/ebpa* (C) und *Pparγ* (D). (E) ChIP-reChIP Analyse von Prmt6 und Pparγ an einer Kontrollregion. (A-E) Die ChIP wurde an undifferenzierten ST2-Zellen durchgeführt. Für die qRT-PCR wurden spezifische Primerpaare auf der Promotorregion eingesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus dem Mittelwert von mindestens drei Experimenten. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. ***P*<0,002, ****P*<0,001.

3.4 Verlust von PRMT6 fördert die Adipogenese

Die Überexpression von Prmt6 hemmt die Adipogenese (Abbildung 10). Um weitergehende Untersuchungen zum Einfluss von Prmt6 auf die Expression von *Ppar γ* und *C/ebpa* durchzuführen, wurde Prmt6 mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in ST2 Zellen entfernt. Der Knockout von Prmt6 war, sowohl auf Protein-Ebene (Abbildung 13A) als auch auf mRNA-Ebene (Abbildung 13B), nachweisbar. Dieser Verlust von Prmt6 resultierte in einer stärkeren Expression von *Ppar γ* während der adipogenen Differenzierung (Abbildung 13C). In einem der beiden Prmt6 Knockout-Konstrukte war im Vergleich zu den Kontrollzellen bereits im undifferenzierten Zustand der ST2 Zellen eine höhere *Ppar γ* -Expression festzustellen. Zudem wurde eine gesteigerte Expression von *C/ebpa* nach der adipogenen Induktion deutlich (Abbildung 13D). Dieser Trend führt sich in der Expression des Adipozytenmarkers *Fabp4* fort. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen beide Prmt6 Knockout-Konstrukte höhere Expressionslevel von *Fabp4* auf (Abbildung 13E). Als Konsequenz der Expressionsänderungen pro-adipogenen Markern ergab die nachfolgende Färbung der Fetttröpfchen mehr eingelagertes Fett in jenen Zellen, die den Prmt6 Knockout aufwiesen (Abbildung 13F).

Um die endogene Aktivität von Prmt6 zu verringern, wurde der spezifische Inhibitor SGC6870 und dessen inaktive Variante SGC6870N [200] eingesetzt (Abbildung 14). ST2 Zellen wurden mit 5 μ M Inhibitor für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Inhibitoraktivität über die relative Expression der von Prmt6 vermittelten Histonmodifikation H3R2me2a überprüft. Die Expression von H3R2me2a wurde aus Western Blots quantifiziert und gegen Histon H3 normalisiert. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen die mit Inhibitor behandelten ST2 Zellen eine geringere relative Expression von H3R2me2a auf (Abbildung 14A, Abbildung A 4). Daraufhin wurden die Zellen für 72 h differenziert. Die Inhibitorbehandlung führte, wie auch beim Knockout von Prmt6 (Abbildung 13), zu einer höheren Genexpression der Adipozytenmarker *Ppar γ 1*, *Ppar γ 2*, *C/ebpa* und *Fabp4* (Abbildung 14B-E). Diese Unterschiede waren auch auf Proteinebene sichtbar (Abbildung 14F). Die Werte der Quantifizierung sind in der Abbildung angegeben. Die Färbung der eingelagerten Fetttropfen in den Zellen machte deutlich, dass die Hemmung von Prmt6 einen Effekt auf die Adipogenese aufweist. Nach 72-stündiger Induktion zur adipozytären Differenzierung hatten die Prmt6-inhibierten Zellen bereits Fett eingelagert, während dies in den Kontrollzellen nicht der Fall war (Abbildung 14G).

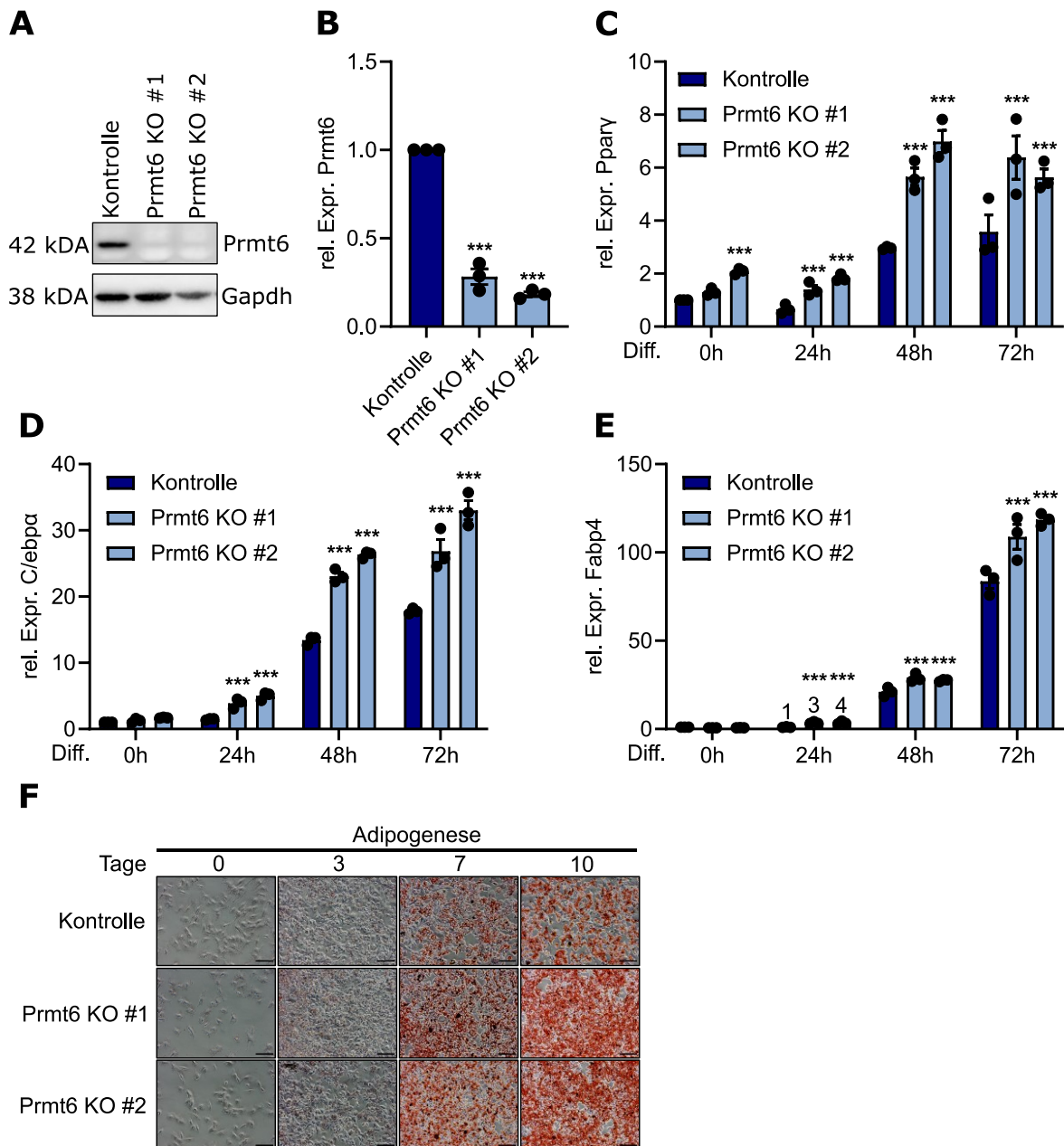


Abbildung 13: Prmt6 Knockout verstärkt die Adipogenese

Der CRISPR/Cas9 vermittelte Prmt6 Knockout wurde in ST2 Zellen mit zwei gRNA's generiert. (A) Western Blot zeigt den Verlust der Prmt6-Expression nach CRISPR/Cas9 vermitteltem Prmt6 Knockout. Es wurden zwei verschiedene Knockout gRNAs ausgewählt (KO #1, KO #2). Der Western Blot wurde mit einem Anti-Prmt6 Antikörper und einem Anti-Gapdh Antikörper als Ladekontrolle durchgeführt. (B) Die Genexpression von *Prmt6* wurde mittels qRT-PCR nach dem Prmt6 Knockout bestimmt. Ein Knockout konnte mit beiden genutzten gRNAs nachgewiesen werden. (C) Die Genexpression von *Ppary* wurde mittels qRT-PCR zu den angegebenen Zeitpunkten der Differenzierung in den Kontrollzellen und in den Prmt6-Knockout-Zellen bestimmt. (D) Die Genexpression von *C/ebpa* wurde mittels qRT-PCR zu den angegebenen Zeitpunkten der Differenzierung in den Kontrollzellen und in den Prmt6-Knockout-Zellen bestimmt. (E) Die Genexpression von *Fabp4* wurde mittels qRT-PCR zu den angegebenen Zeitpunkten der Differenzierung in den Kontrollzellen und in den Prmt6-Knockout-Zellen bestimmt. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus dem Mittelwert von mindestens drei Experimenten. *** $P < 0,001$. (F) Der Verlust von Prmt6 fördert die Bildung von Lipidtröpfchen während der Adipogenese. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Oil-Red-O Färbung. Der Maßstab zeigt 100 μ m.

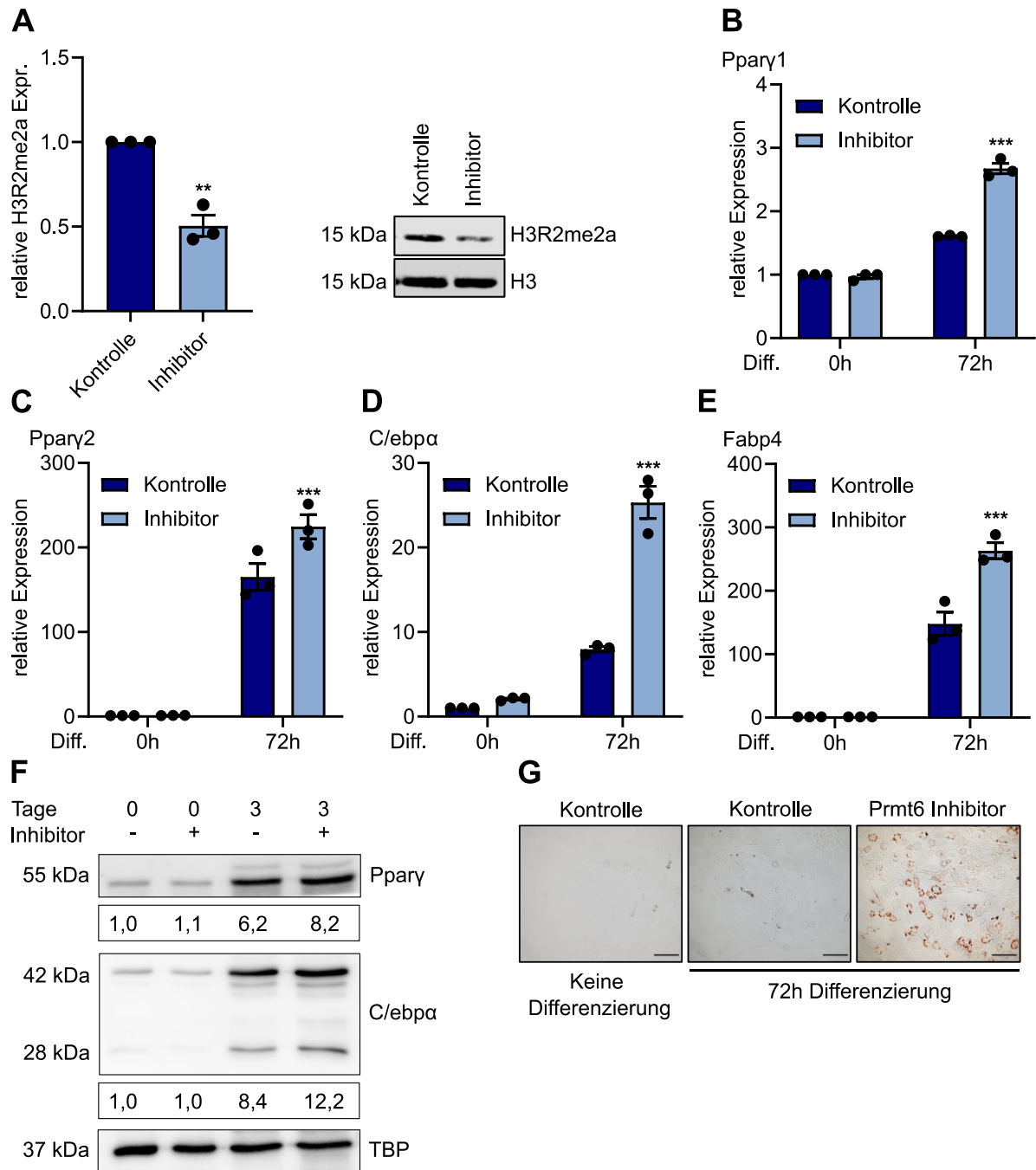


Abbildung 14: Inhibierung von Prmt6 fördert die Adipogenese

ST2 Zellen wurden mit 5 μ M Inhibitor SGC6870 oder dessen inaktives Compound SGC6870N behandelt. 24h nach der initialen Behandlung mit Inhibitor wurden die Zellen für 72h differenziert. (A) Bestätigung der Inhibitoraktivität. Der Western Blot von Histoneextrakten aus Kontroll- und Inhibitor behandelten ST2 Zellen nach 72 Stunden Differenzierung wurde mit Antikörpern gegen H3R2me2a und Histon H3 durchgeführt. Abgebildet sind die Werte aus drei Bestimmungen von den Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (links) und ein repräsentativer Western Blot (rechts). H3R2me2a wurde aus Western Blots quantifiziert und gegen die Werte von Histon H3 normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts aus drei unabhängigen Experimenten. Die P-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet, der die Kontrollzellen mit den mit Prmt6-Inhibitor behandelten Zellen vergleicht. $**P < 0.002$. (B) Expression der *Ppary1*-Isoform nach Hemmung von Prmt6 nach 72 Stunden Adipozyten-Differenzierung. Die Genexpression von *Ppary1* wurde mittels qRT-PCR zu den angegebenen Zeitpunkten in den mit Prmt6-Inhibitor oder Kontrollsubstanz behandelten Differenzierungszellen bestimmt. (C) Expression der *Ppary2*-Isoform nach Prmt6-Inhibition auf mRNA-Ebene, bestimmt durch qRT-PCR. (D) Expression von *C/ebpa* auf

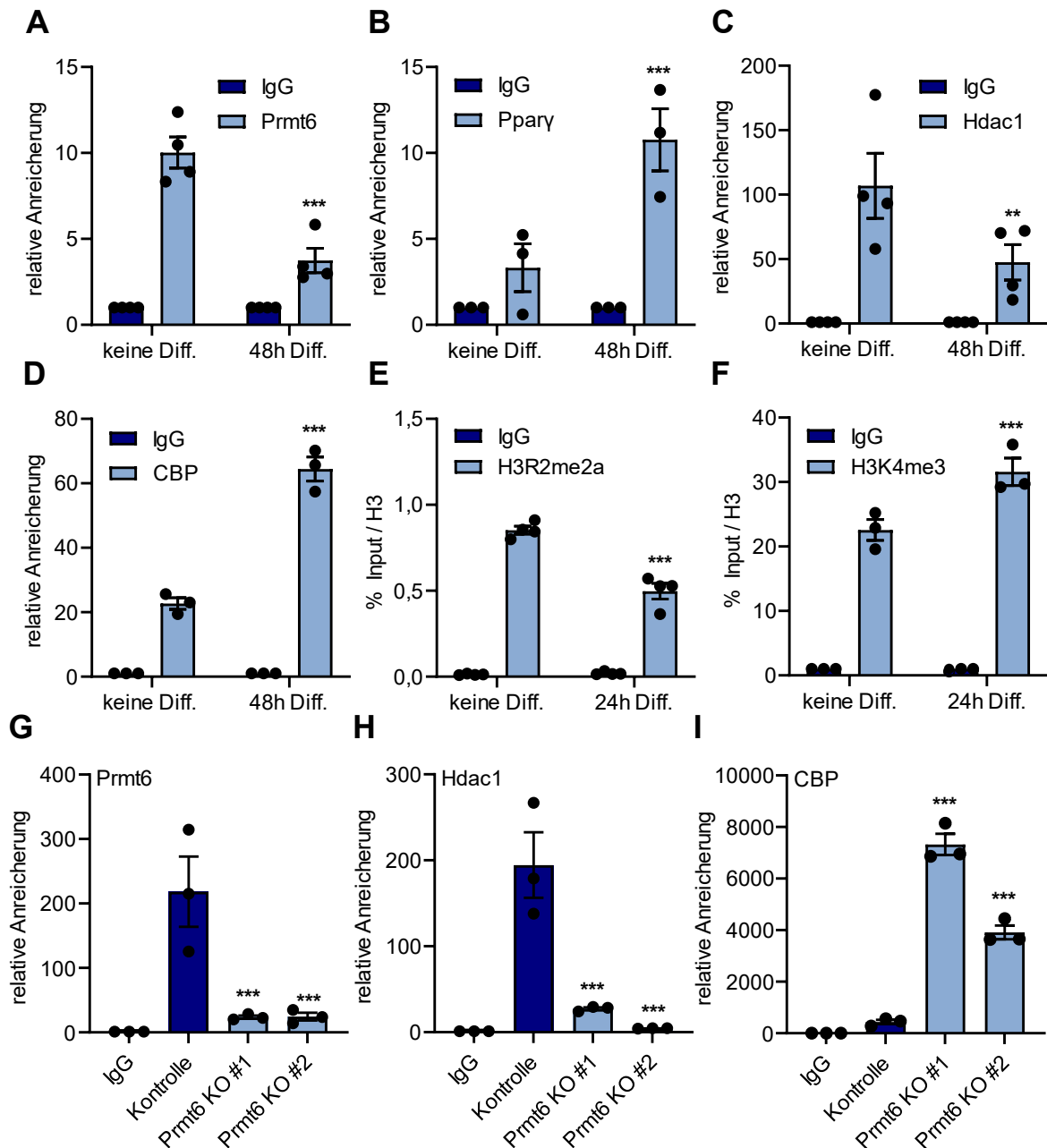
mRNA-Ebene nach Prmt6-Inhibition und Adipozyten-Induktion, gemessen durch qRT-PCR. (E) Genexpression von *Fabp4* in den Prmt6-inhibierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 72 Stunden Differenzierung. (F) Der Western Blot zeigt die Proteinexpression von Ppar γ und C/ebp α . Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen Ppar γ und C/ebp α durchgeführt. TBP diente dabei als Ladekontrolle. Die Werte der Quantifizierung sind jeweils unter den Proteinbanden angegeben. Dabei wurden die Werte der Kontrollzellen mit den mit Prmt6-Inhibitor behandelten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten verglichen. (G) Die Hemmung von Prmt6 fördert die Bildung von Lipidtröpfchen während der Adipogenese. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Oil-Red-O Färbung. Der Maßstab zeigt 100 μ m an. 5 μ M des spezifischen Prmt6-Inhibitors SGC6870 und dessen Kontrollverbindung SGC6870N wurden zur Prmt6-Inhibition verwendet. Die qRT-PCR-Werte sind als relative Expression, normalisiert auf die TBP-Expression, dargestellt. Die Werte, die für die unbehandelten, nicht differenzierten Zellen ermittelt wurden, wurden als eins gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die P-Werte wurden anhand der ANOVA berechnet, bei der die Kontrollzellen mit den mit Prmt6-Inhibitor behandelten Zellen verglichen wurden. ***P < 0,001.

3.5 Cofaktoraustausch am C/EBP α Promotor

Die bisherigen Daten zeigen einen negativen Einfluss von Prmt6 auf die Expression des Ppar γ Zielgens *C/ebp α* und wirkt der Adipogenese entgegen. Daher wurde der Komplex aus Prmt6 und Ppar γ vor und nach Induktion der adipogenen Differenzierung am *C/ebp α* Promotor in ST2 Zellen (Abbildung 15) und in M2 Zellen (Abbildung A 5) untersucht.

Interessanterweise war die Bindung von Prmt6 nach Induktion der Differenzierung geringer (Abbildung 15A, Abbildung A 5A), während die Bindung von Ppar γ gemäß Literatur am *C/ebp α* Promotor zunahm (Abbildung 15B). Außerdem verringerte sich die Bindung des Corepressors Hdac1 nach Differenzierungsstart (Abbildung 15C, Abbildung A 5B), während die des Coaktivators CBP anstieg (Abbildung 15D). Nicht nur auf Transkriptionsfaktorebene kam es zu Veränderung am Locus von *C/ebp α* . Auch die Histonmodifikationen veränderten sich aufgrund der Differenzierung. So wurde eine geringere Häufigkeit der reprimierenden Modifikation H3R2me2a nach Differenzierung ermittelt (Abbildung 15E, Abbildung A 5D). Die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 war bereits im nicht-indizierten Zustand der ST2 Zellen vorhanden und nahm durch die adipogene Differenzierung zu (Abbildung 15F). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass viele dieser Ergebnisse auch an der Promotorregion von *Ppar γ* nachgewiesen wurden, siehe hierfür Abbildung A 6.

Die bisher generierten Daten deuten darauf hin, dass sich das Chromatin am *C/ebp α* Promotor in undifferenzierten ST2 Zellen nicht in einem unterdrückten Zustand befindet. Um den Einfluss von Prmt6 auf den Zustand des *C/ebp α* Promotors noch tiefer zu analysieren, wurden ST2 Zellen mit einem CRISPR/Cas9-generierten Knockout von Prmt6 untersucht. Die Reduktion von Prmt6 nach dessen Knockout wurde am *C/ebp α* Promotor festgestellt (Abbildung 15G). Darüber hinaus war die Bindung von Hdac1 reduziert (Abbildung 15H) und die CBP-Bindung erhöht (Abbildung 15I). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anreicherung von Prmt6 am *C/ebp α* Promotor die Bindung von Corepressoren und Coaktivatoren an diesem Locus beeinflusst.

Abbildung 15: Cofaktoraustausch am *C/ebpa* Promotor

(A-D) ChIP-Analyse der Bindung von Transkriptionsfaktoren an den *C/ebpa* Promotor in undifferenzierten ST2-Zellen und nach adipozytärer Differenzierung von ST2-Zellen für 48 Stunden. Dargestellt ist die Bindung von (A) Prmt6, (B) Ppary, (C) Hdac1 und (D) CBP nach adipogener Induktion für 48 h. (E-F) ChIP-Analyse der Histonmodifikationen am *C/ebpa* Promotor in undifferenzierten ST2-Zellen und nach adipozytärer Differenzierung von ST2-Zellen für 24 Stunden. (E) H3R2me2a am *C/ebpa*-Promotor vor und nach adipozytärer Differenzierung. (F) H3K4me3 an der *C/ebpa* Promotorregion vor und nach Differenzierungsinduktion. (G-I) Transkriptionsfaktorbindung am *C/ebpa* Locus nach CRISPR/Cas9 vermitteltem Prmt6 Knockout (KO). G) Prmt6-Bindung an den *C/ebpa* Promotor nach Prmt6-Knockout unter Verwendung eines Anti-Prmt6 Antikörpers. (H) Hdac1-Bindung an den *C/ebpa* Promotor nach Prmt6 Knockout, bestimmt durch ChIP. (I) Bindung von CBP an den *C/ebpa* Promotor nach Prmt6-Knockout. Die Daten der Histon-ChIP werden als prozentualer Input, der auf eine Histon H3 ChIP normalisiert ist, angegeben. Daten der Transkriptionsfaktor-ChIP sind als relative Anreicherung über IgG angegeben. Die qPCR-Werte wurden mit spezifischen Primern gegen den *C/ebpa* Locus ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die *P*-Werte wurden mit Hilfe der ANOVA berechnet. ***P* < 0,002, ****P* < 0,001.

3.6 Der Knockout von Ppar γ verhindert die adipogene Identität

Um mögliche Signalwege von Prmt6 in der Adipogenese zu finden, wurde durch CRISPR/Cas9 ein Knockout von Ppar γ in ST2 Zellen generiert (Abbildung 16A-C). Im Vergleich zu den Kontrollzellen, konnten in beiden Knockout-Zelllinien weder auf Protein-Ebene noch auf RNA-Ebene die Isoformen Ppar γ 1 und Ppar γ 2 nachgewiesen werden. Der Knockout von Ppar γ verhinderte die Adipogenese (Abbildung 16D-E, G). Alle drei Zelllinien wurden für sieben Tage mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt. Die relevanten adipogenen Transkriptionsfaktoren *C/ebp α* (Abbildung 16D) und *Fabp4* (Abbildung 16E) waren in der Kontrolle deutlich höher als in den ST2 Zellen mit Ppar γ Knockout. Nach 7-tägiger Differenzierung der ST2 Zellen, zeigt die Färbung der Lipidtröpfchen in den Zellen mit Ppar γ Knockout keine (KO #2), beziehungsweise eine reduzierte Menge (KO #1), an eingelagertem Fett an (Abbildung 16G). Die mRNA-Expression von *Prmt6* veränderte sich im Differenzierungsverlauf durch den Verlust von Ppar γ im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht (Abbildung 16F).

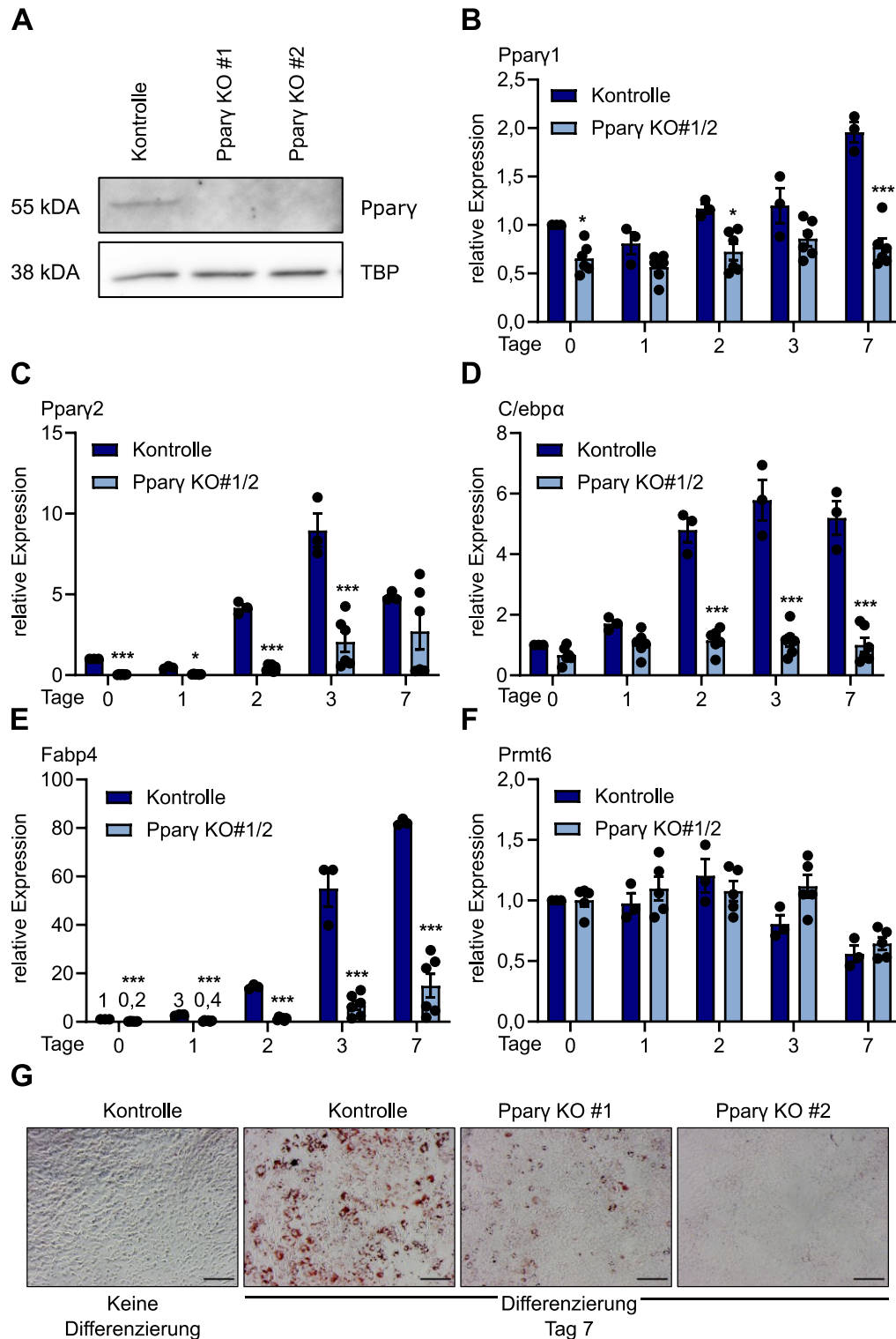


Abbildung 16: Knockout von Ppary verhindert die Adipogenese

Ein Ppary Knockout wurde durch lentivirale Transduktion des CRISPR/Cas9-Systems mit zwei gRNAs in ST2-Zellen (KO #1 und KO #2) erzeugt. (A) Der Knockout von Ppary wurde durch Western Blot mit einem Anti-Ppary Antikörper bestätigt. (B-C) Beide Isoformen von *Ppary* zeigten eine reduzierte Expression nach Knockout in undifferenzierten Zellen und nach adipozytärer Differenzierung, bestimmt durch qRT-PCR. (D) *C/ebpa* Expression bei Differenzierung in den Ppary-Knockout-Zellen, gemessen mittels qRT-PCR. (E) Expression des adipozytären Gens *Fabp4* bei Differenzierung in den Ppary Knockout-Zellen, gemessen mittels qRT-PCR. (F) *Prmt6* Expression bei Differenzierung in den Ppary Knockout-Zellen, gemessen mittels qRT-PCR. Die qRT-PCR-Werte sind als relative Expression, normalisiert auf die TBP-Expression, angegeben. Die für die nicht differenzierten Zellen gesammelten Werte wurden als eins gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den

Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die *P*-Werte wurden mit Hilfe der ANOVA berechnet. **P*<0,033, ****P*<0,001. (G) Die Oil-Red-O Färbung zeigt eine verringerte Bildung von Lipidtröpfchen in den Pparγ Knockout-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 7 der Differenzierung (N = 6). Abgebildet sind repräsentative Bilder der Oil-Red-O Färbung. Der Maßstab zeigt 100 μm an.

3.7 PRMT6 beeinflusst die Adipogenese nicht allein

Da sich die mRNA-Expression von *Prmt6* durch den Knockout von Pparγ im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht veränderte (Abbildung 16F), wurde die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den *C/ebpa* Promotor nach Verlust von Pparγ ermittelt. Nach dem Knockout von Pparγ war weniger Pparγ am *C/ebpa* Promotor gebunden als in den Kontrollzellen (Abbildung 17A). Die Bindung von Prmt6 wurde durch den Knockout von Pparγ nicht beeinflusst (Abbildung 17B). Der Heterodimerisierungspartner von Pparγ, Rxra, band dagegen häufiger durch den Verlust von Pparγ an die *C/ebpa* Promotorregion (Abbildung 17C). Hdac1 ist ein häufiger Interaktionspartner von Prmt6. Auch die Bindung dieses Transkriptionsfaktors wurde durch den Knockout von Pparγ nicht beeinflusst (Abbildung 17D). CBP band durch den Verlust von Pparγ weniger stark an den *C/ebpa* Promotor als in den Kontrollzellen (Abbildung 17E). Die RNA-Polymerase II, Rpb1, band durch den Verlust von Pparγ signifikant weniger an die Promotorregion von *C/ebpa* (Abbildung 17F). Dies galt zudem für die aktive phosphorylierte Form der RNA-Polymerase II, Rpb1 phospho (Abbildung 17G).

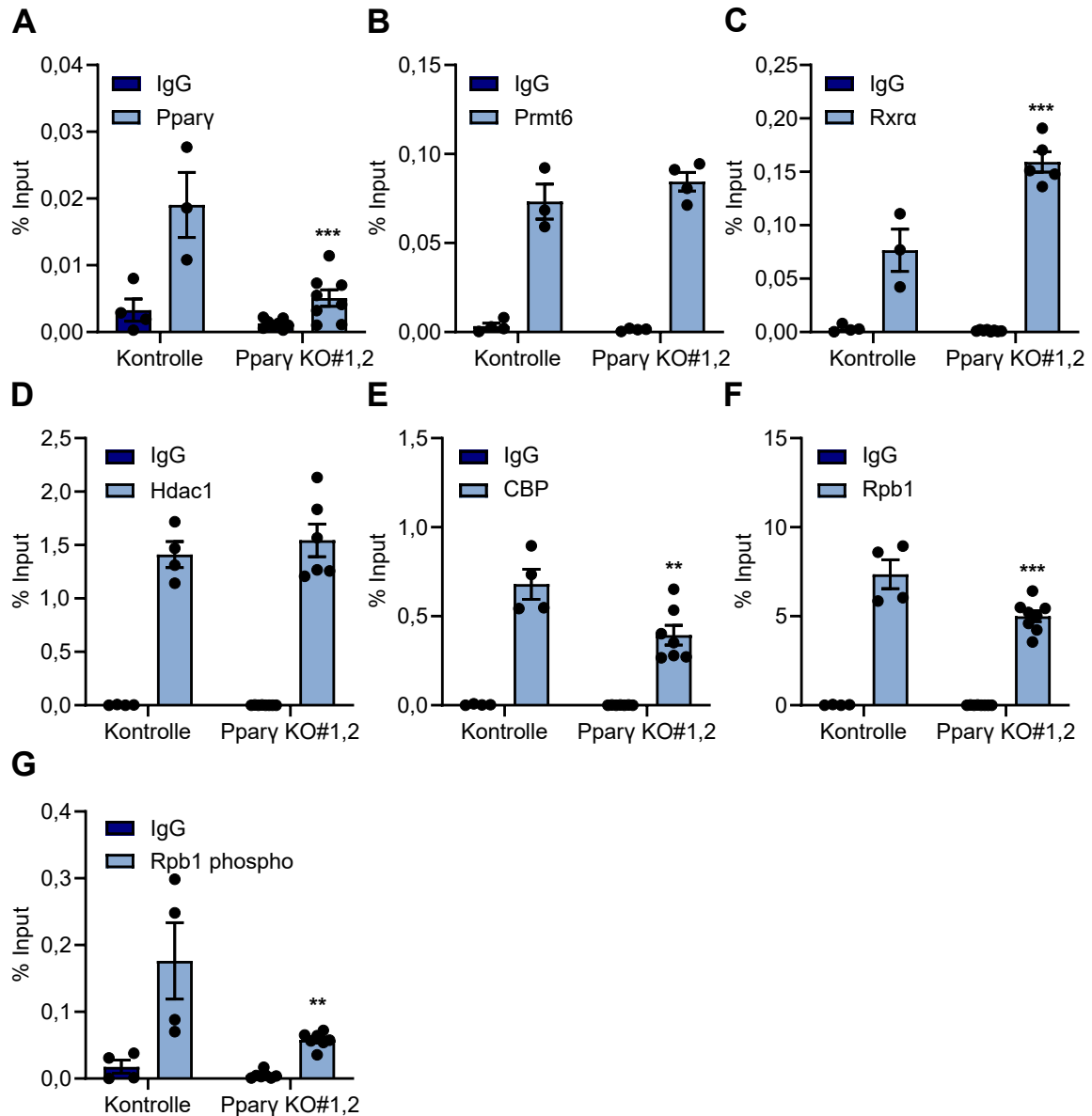


Abbildung 17: Einfluss des Pparγ Knockouts auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren am *C/ebpα* Promotor

ChIP-Analyse des *C/ebpα* Promotors in Pparγ Knockout Zellen. (A) Der Knockout von Pparγ führte zu einer reduzierten Bindung von Pparγ an den *C/ebpα* Promotor. (B) Die Bindung von Prmt6 an den *C/ebpα* Promotor blieb durch den Knockout von Pparγ unverändert. (C) Eine vermehrte Bindung von Rxra am *C/ebpα* Promotor wurde in den Pparγ Knockout-Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. (D) Der Cofaktor Hdac1 zeigte kein verändertes Bindungsverhalten am *C/ebpα* Promotor nach Pparγ Knockout. (E) Die Bindung von CBP ist nach dem Knockout von Pparγ verringert. (F) Die Bindung von Rpb1 an den *C/ebpα* Promotor war durch den Pparγ Knockout reduziert. (G) Die phosphorylierte Form von Rpb1 CTD an Serin 2 zeigte eine verringerte Bindung an den *C/ebpα* Promotor nach dem Pparγ Knockout. (A-G) Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. ** $P < 0,002$, *** $P < 0,001$.

Auch bei den Histonmodifikationen kam es durch den Verlust von Ppar γ am *C/ebpa* Promotor zu Änderungen. So nahm die repressive Markierung H3R2me2a, die durch Prmt6 vermittelt wird, durch den Verlust von Ppar γ zu (Abbildung 18A). H3K4me3 nahm dagegen im Vergleich zu den Kontrollzellen ab (Abbildung 18B). Zudem wurde eine Reduktion von H3K9ac in den Ppar γ Knockout Zellen festgestellt (Abbildung 18).

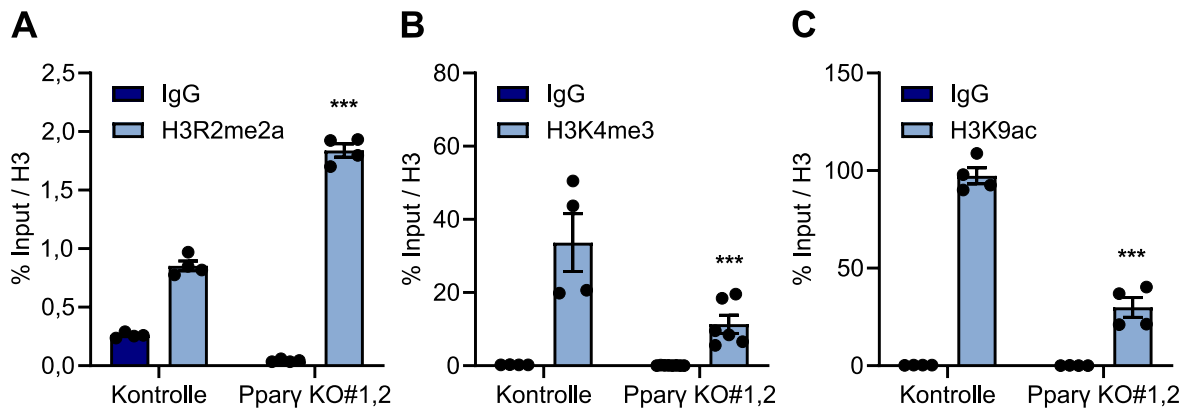


Abbildung 18: Einfluss des Ppar γ Knockouts auf die Histonmodifikationen am *C/ebpa* Promotor

ChIP-Analyse des *C/ebpa* Promotors in Ppar γ Knockout Zellen. (A) Zunahme der repressiven Markierung H3R2me2a am *C/ebpa* Promotor bei Verlust von Ppar γ . (B) Reduktion der aktivierenden Markierung H3K4me3 bei Verlust von Ppar γ am *C/ebpa* Promotor. (C) Reduktion von H3K9ac bei Verlust von Ppar γ am *C/ebpa* Promotor. (A-C) Die ChIPs wurden mit mindestens zwei verschiedenen Chromatinpräparaten durchgeführt. Die Daten sind als prozentualer Input, der zu einer anti-Histon 3 ChIP normalisiert ist, angegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. ****P*<0,001.

3.8 Interaktion von PRMT6 und RUNX2

Da aus den bisherigen Daten hervorgeht, dass Prmt6 die Adipogenese nicht allein reguliert, stellt sich die Frage nach einem Interaktionspartner von Prmt6. Runx2 wirkt ebenfalls wie Prmt6 negativ auf die Adipogenese. Aus diesem Grund wurde die Bindung von Runx2 an den *C/ebpa*- sowie *Pparγ* Promotor untersucht. Eine Bindung von Runx2 an beide Promotoren wurde detektiert (Abbildung 19A, Abbildung 19B). An diesen Stellen der Promotorregionen war in den vorherigen Experimenten sowohl die Bindung von Prmt6 als auch die von *Pparγ* ermittelt worden. Daher wurde mittels ChIP-reChIP die simultane Bindung von Prmt6 und Runx2 überprüft. Eine gemeinsame Bindung von Prmt6 und Runx2 wurde sowohl am Promotor von *C/ebpa* (Abbildung 19C) als auch von *Pparγ* (Abbildung 19D) festgestellt. An der Kontrollregion fand keine Bindung der Transkriptionsfaktoren statt (Abbildung 19E).

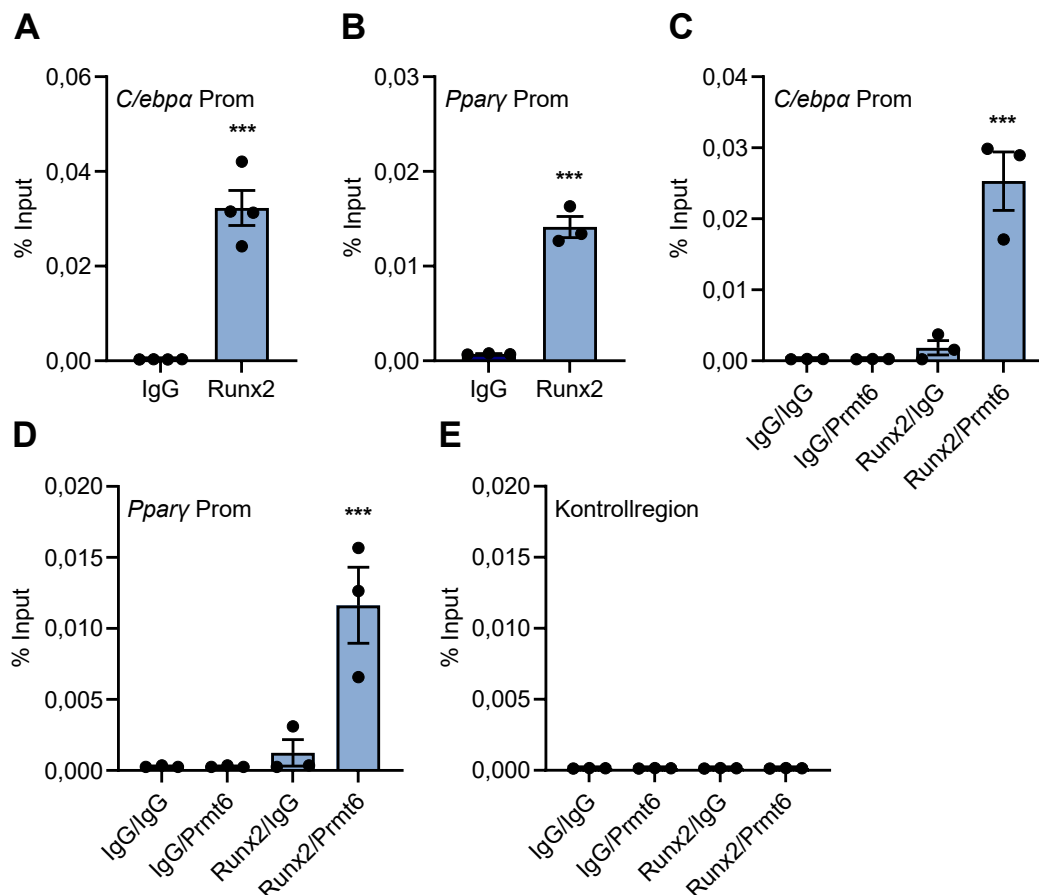


Abbildung 19: Interaktion von Prmt6 und Runx2

(A) Bindung von Runx2 an den *C/ebpa* Promotor von undifferenzierten ST2 Zellen. (B) Bindung von Runx2 an den *Pparγ* Promotor von undifferenzierten ST2 Zellen. (C) Simultane Bindung von Prmt6 und Runx2 an den *C/ebpa* Promotor. (D) Simultane Bindung von Prmt6 und Runx2 an den *Pparγ* Promotor. (E) Keine Bindung von Prmt6 und Runx2 an die Kontrollregion. In der qPCR wurden spezifische Primerpaare für den Locus von *C/ebpa* und *Pparγ* verwendet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. **P*<0,033, ***P*<0,002, ****P*<0,001.

4 Diskussion

Zunächst wurde die erfolgreiche Etablierung der Adipozyten Differenzierung überprüft, indem die Expression typischer adipozytärer Marker ermittelt wurde. Über den signifikanten Anstieg der Expression von Ppar γ 1, Ppar γ 2, C/ebp α , Fabp4, sowie den Adipokinen Adiponektin und Adipsin konnte die Entwicklung der Zellen hin zu Adipozyten nachverfolgt werden. Zudem zeigte die Färbung der Triacylglyceride mittels Oil-Red-O, dass im Differenzierungsverlauf Lipide in Form von Fetttropfen in den Zellen eingelagert werden. Im Anfangsstadium der Differenzierung wurden die Lipide plurivaskulär gespeichert. Diese vielen kleinen einzelnen Fetttropfen schließen sich bis zum Ende der Differenzierung zu einem einzigen großen Fetttropfen zusammen. Dieses Verhalten ist kennzeichnend für die Entwicklung von weißen Fettgewebszellen [208].

Basierend auf diesem etablierten Protokoll, wurde nun die Expression von Prmt6, sowie dessen Lokalisation im Verlaufe der Adipogenese ermittelt.

4.1 PRMT6 ist in MSCs vorhanden und nimmt während der Adipogenese ab

Einige PRMTs, wie PRMT1 [209] und PRMT5 [210], haben die Fähigkeit zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln. In Stammzellen aus der apikalen Papille wurde dies auch für PRMT6 gezeigt [211]. Durch den Ortswechsel kommt es möglicherweise zu einem Funktionsunterschied. Gerade da die Vorläuferzellen im Differenzierungsverlauf hin zu den Adipozyten eine so große Umstrukturierung der Zellen durchlaufen, wurde die Lokalisation von Prmt6 in ST2 Zellen untersucht.

Die Immunofluoreszenzaufnahmen ergaben, dass Prmt6 in ST2 Zellen im Zellkern vorhanden ist und während der Adipogenese weniger wird. Durch die Induktion der Adipogenese kommt es zu keiner Änderung des Orts von Prmt6. Die Protein Arginin Methyltransferase 6 ist in undifferenzierten ST2 Zellen wie auch in Adipozyten im Zellkern lokalisiert.

Neben der Lokalisation von Prmt6 war dessen Expression im Differenzierungsverlauf von Interesse. Daher wurden die Mengen der mRNA-Transkripte und die Proteinmengen zu verschiedenen Zeitpunkten der Adipogenese bestimmt.

Zu Beginn der Adipogenese nimmt die Expression von Prmt6 auf mRNA-Ebene zunächst zu, fällt dann wieder auf das Ausgangsniveau und bleibt konstant. Auf Proteinebene nimmt Prmt6 im Differenzierungsverlauf dagegen stetig ab (Abbildung 8). Dies könnte womöglich über posttranslationale Modifikation oder einen lysosomalen Abbau erklärt werden. Da in

anderen Zelltypen die proteasomale Degradierung von PRMT6 nachgewiesen werden konnte [163, 164], wurde dies in ST2 Zellen überprüft. Diese Hypothese konnte jedoch nicht verifiziert werden. Die Funktionalität des Proteasom-Inhibitors wurde mit Runx2 als Positivkontrolle überprüft und bewiesen [206].

Neben der proteasomalen Degradierung könnte auch die für viele PRMTs beschriebene Automethylierung, so auch für PRMT6, eine Rolle spielen. Die Methylierungen von PRMT6 sind dabei an den Argininen R29, R35 und R37 [171, 212]. Diese Automethylierung hat wenig bis gar keine Auswirkungen auf die Methylierungsaktivitäten des Enzyms, kann aber sekundäre Aktivitäten wie Transkription und mRNA-Splicing von PRMT4 und die Anti-HIV-1-Aktivität von PRMT6 beeinflussen [212]. Zudem konnte durch Mutation an der Stelle von R35 und Zugabe von Cycloheximid gezeigt werden, dass das mutierte R35A-Protein deutlich instabiler als die Wildtyp-Variante von PRMT6 war [171]. Diese genannten Ergebnisse wurden jedoch in einem anderen Zelltyp als den ST2 Zellen generiert.

Die Abnahme von Prmt6 im Differenzierungsverlauf könnte auch ein Hinweis auf eine posttranskriptionale Regulation von Prmt6 sein, womöglich durch eine adipogen-assoziierte microRNA (miRNA). Denn miRNA's spielen in der Adipogenese und der Differenzierung im Allgemeinen eine große Rolle [213]. miRNA's sind kleine endogene nicht-kodierende RNA's, bestehend aus 19-25 Nukleotiden, die die Genexpression regulieren, indem sie post-transkriptionell an mRNA's binden [214]. Die experimentell validierte Datenbank für microRNA-Ziel-Interaktionen [215], miRTarBase, liefert die Information, dass die miRNA's miR-617, miR-4330, miR-3919, miR-4756-3p, miR-6505-3p, miR-6895-5p auf die Interaktion mit PRMT6 abzielen. Zudem wurde ein Effekt von miR-141-3p und miR-372-3p auf PRMT6 festgestellt [216, 217]. Alternativ könnte auch die Transkriptstabilität von Prmt6 durch RNA-Methylierung beeinträchtigt sein [218]. Um den genauen Mechanismus aufzudecken, der für die Reduktion von Prmt6, während der Adipogenese verantwortlich ist, sind weitere Experimente erforderlich.

4.2 Einfluss von PRMT6 auf die Adipogenese

Da der Einfluss von Prmt6 auf die Differenzierung verschiedener Zelltypen bekannt ist [151, 153, 211], wurde dessen Einflussnahme auf die Adipogenese untersucht. Neben Ppar γ rekrutieren auch andere Transkriptionsfaktoren PRMT6 zu Zielgenen während der jeweiligen Differenzierung. So ist die Rekrutierung von PRMT6 durch RUNX1 [150], LEF1 [184], dem Östrogenrezeptor [219] und dem Androgenrezeptor [220] bekannt.

Die Überexpression von Prmt6 reduzierte die adipogene Differenzierung (Abbildung 10). Gemeinsam mit der beobachteten Herunterregulierung von Prmt6, während der Adipogenese (Abbildung 8), deutet dies auf eine physiologische Bedeutung von Prmt6 in diesem Kontext hin. Wurde Prmt6 dagegen mit einem Inhibitor gehemmt oder durch einen Gen-Knockout entfernt, so führte dies zu einer verstärkten Adipogenese (Abbildung 13, Abbildung 14). Dieses Ergebnis bestätigt die Experimente, bei der ein anderer PRMT6-Inhibitor (MS023) verwendet wurde. MS023 ist ein starker selektiver Inhibitor des Typs I, einschließlich PRMT1, PRMT3, PRMT4, PRMT6 und PRMT8, und weist eine hohe Spezifität für PRMT6 auf [221]. Auch in diesem Fall war die Expression von *C/ebpa* und *Fabp4* durch Behandlung von siPrmt6 und Inhibitor höher als in unbehandelten 3T3-L1 Zellen [207]. Der Verlust von Prmt6 führte zu keiner spontanen Adipogenese der ST2 Zellen. Hierfür wird ein äußerer Auslöser benötigt, der die Veränderungen in den Transkriptionskomplexen zu initiieren.

Fünf der aktuell bekannten PRMTs wurden bisher im Hinblick auf ihre Rolle bei der Adipogenese untersucht. Ihre Auswirkungen auf die Adipogenese sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Davon wirken drei fördernd auf die Adipogenese. Deren potenziellen Einfluss wurde hauptsächlich in 3T3-L1, aber auch NIH3T3 und C3H10T1/2 Zellen untersucht [207, 222–229]. Meine Studie wurde in ST2 und M2 Zellen durchgeführt.

Tabelle 26: PRMTs, deren Rolle bei der Adipogenese untersucht wurden

Von den aktuell bekannten PRMTs wurden fünf auf eine Rolle bei der Adipogenese untersucht.

	Histon-Modifikation	Einfluss in der Adipogenese
PRMT1	H4R3me1 & H4R3me2a	↑
PRMT4	H3R17me2a	↑
PRMT6	H3R2me2a	↓
PRMT5	H3R8me2s	↑
PRMT7	H4R3me2s	↓

PRMT1 ist wie PRMT6 eine Typ I Protein Arginin Methyltransferase und ist essenziell für die Adipogenese. PRMT1 fördert die Expression von PPAR γ , indem es die Histonmodifikation H4R3me2a katalysiert und die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs behindert, um die adipogene Differenzierung zu beschleunigen. Darüber hinaus interagiert PRMT1 mit C/EBP β und wirkt dort als positiver Regulator der Proteinstabilität, was wiederum die Adipogenese erleichtert [222].

PRMT4 fördert die adaptive Thermogenese. Durch die Methylierung von Ppary an R240 wird dessen Interaktion mit PRDM16 verstärkt, was zu einer verstärkten Expression von thermogenen Genen führt. PRMT4 spielt daher eine tragende Rolle bei der Bräunung von WAT [230]. In dieser Studie wurden nur weiße Fettzellen betrachtet, jedoch wären weitergehende Experimente in Richtung braunes Fettgewebe sicherlich von Interesse.

Über den Einfluss von PRMT7 wird ambivalent berichtet. Einerseits wurde berichtet, PRMT7 hätte keinen Effekt auf die Adipogenese [231], andererseits gibt es Ergebnisse, die besagen, dass es die Adipogenese über Hemmung der C/EBP β -Aktivität unterdrückt [229]. Interessant wären an dieser Stelle auch Untersuchungen darüber, ob und inwieweit Protein Arginin Methyltransferasen im Kontext der Adipogenese zusammenarbeiten.

Prmt6 zeigte sich in der Adipogenese als negativer Regulator. Nach der Linienentscheidung für die Adipogenese werden viele Signalwege für die Osteogenese blockiert [190, 191, 232–234]. Interessanterweise hat sich auch gezeigt, dass eine Reihe von PRMTs sowie Lysin-Methyltransferasen (KMTs) bei diesen beiden Prozessen gegensätzliche Funktionen ausüben [234]. Daher ist der gegensätzliche Effekt von Prmt6 auf die Osteogenese anzunehmen. Im Gegensatz zur Adipogenese konnte ein positiver Effekt von PRMT6 auf die Osteogenese in Mäusen gezeigt werden. Sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nimmt Prmt6 im Laufe der osteogenen Differenzierung zu [148]. Der regulatorische Mechanismus basiert auf der RNA Demethylase ALKBH5, welche die osteogene Differenzierung von MSCs negativ reguliert, indem sie den mRNA-Abbau von PRMT6 erhöht und so die Aktivierung des PI3K/AKT-Wegs bei der Knochenentwicklung hemmt [148].

4.3 Interaktion von PPAR γ und PRMT6

Die Überexpression von Prmt6 reduzierte die Expression von *C/ebpa*, dem wichtigen Zielgen von Ppar γ 2 während der Adipogenese. Unter der Annahme, dass Prmt6 durch Ppar γ and den *C/ebpa* Promotor rekrutiert wird [207], wurde eine CoIP durchgeführt. Um festzustellen, ob beide Isoformen von PPAR γ mit PRMT6 assoziieren, wurde Flag-markiertes PRMT6 gemeinsam mit PPAR γ 1 oder PPAR γ 2 exprimiert. Die Präzipitation mit Flag-Beads zeigte im Western Blot mit der Nutzung eines PPAR γ -Antikörpers die Co-Präzipitation beider Isoformen (Abbildung 11).

Die Behandlung mit Pioglitazon, einem PPAR γ -Agonisten, verringerte die Wechselwirkung zwischen PPAR γ und PRMT6 erheblich. Darüber hinaus führte die Hemmung von PRMT6 durch die Behandlung mit MS023 zur Auflösung dieses Komplexes [207]. Die Kristallstruktur von PRMT6 und MS023 zeigt die Bindung von MS023 an der Substratbindungsstelle von PRMT6. Ist PPAR γ ein Substrat, kann PRMT6-MS023 nicht gebunden werden. Eine andere Erklärung ist, dass die Bindung von MS023 an PRMT6 eine größere Konformitätsänderung bewirkt, wodurch die Enzymkinetik verhindert wird [221]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die vollständige Aktivierung von PPAR γ die Dissoziation von PRMT6 oder zumindest dessen Hemmung erfordert [207].

Zusätzlich wurde die physische Interaktion von PRMT6 und PPAR γ mit einem GST-Pulldown mit rekombinantem GST-PRMT6 und mit ^{35}S -markiertem *in vitro* translatiertem PPAR γ nachgewiesen (Abbildung 11). Für eine Lokalisierung der Bindestelle müssten weitergehende massenspektrometrische Untersuchungen mit Deletionskonstrukten durchgeführt werden.

Nicht nur die Protein-Protein Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren sollte nachgewiesen werden, sondern auch die Protein-DNA Interaktion. So ergab die endogene Chromatinimmunopräzipitation von Ppar γ und Prmt6 in der Nähe des Transkriptionsstarts von *C/ebpa* eine Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren (Abbildung 12). Die separate Bindung von Prmt6 und Ppar γ and den *C/ebpa* Promotor wurde so bestätigt. Dennoch stellte sich die Frage, ob diese simultan den Locus besetzen. Dies wurde mittels ChIP-reChIP überprüft. Beide Transkriptionsfaktoren wurden gleichzeitig am Promotor von *C/ebpa* und zudem von *Ppar γ* nachgewiesen. In einer gemeinsamen Kontrollregion wurde keine Bindung festgestellt. Diese Daten zeigen, dass Ppar γ und Prmt6 im undifferenzierten Zustand der ST2 Zellen an die Promotorregionen von *C/ebpa* und *Ppar γ* binden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse steht die Hypothese im Raum, dass Ppar γ als Substrat für PRMT6 dient. In einer endogenen IP, bei der 3T3-L1 Zellen für acht Tage mit MS023 Behandlung differenziert wurden, wurde kein asymmetrisches Di-Methyl-Arginin an PPAR γ

nachgewiesen. Auch in einem *in vitro* PRMT6-Methylierungstest mit rekombinantem PPAR γ -Protein wurden keine ^3H -Methylierungen beobachtet [207].

Somit interagiert PRMT6 mit PPAR γ , methyliert es jedoch nicht.

4.4 Die Aktivität von PRMT6 hält *C/EBP α* in einem aktivierbaren Zustand

Prmt6 interagiert mit Ppar γ und ist gemeinsam mit diesem Transkriptionsfaktor am Promotor von *C/ebp α* und *Ppar γ* vorhanden (Abbildung 12). Die Bindung an beide Promotorregionen deutet auf eine Regulation der Ppar γ -C/ebp α Vorwärtsschleife auf mehreren Ebenen hin, siehe Abbildung 20. Nach Induktion der Adipogenese stieg die Menge von Ppar γ am *C/ebp α* Promotor an. Gleichzeitig nehmen Prmt6 und Hdac1 bei der Differenzierung am *C/ebp α* Promotor ab. Der Coaktivator CBP dagegen wird rekrutiert und tritt vermehrt auf. Diese Beobachtung stützt die Annahme von Prmt6 als zusätzlichen Corepressor, der mit Ppar γ assoziiert, und durch Coaktivatoren ausgetauscht wird [235].

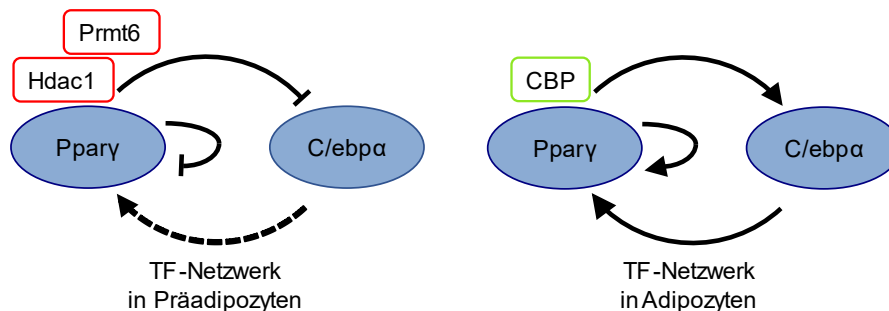


Abbildung 20: Schematische Darstellung von Prmt6 innerhalb der Ppar γ -C/ebp α Vorwärtsschleife

Präadipozytäres Transkriptionsfaktornetzwerk mit geringer Ppar γ - und C/ebp α -Expression, die durch Prmt6 und andere Corepressoren wie Hdac1 unterdrückt werden. Durch Induktion der adipozytären Differenzierung verlässt Prmt6 den mit Ppar γ gebundenen Promotor und Coaktivatoren werden dorthin rekrutiert. Dadurch wird die Ppar γ -C/ebp α -Vorwärtsschleife aktiviert, die die Adipogenese vorantreibt. TF = Transkriptionsfaktor.

Zudem haben Studien gezeigt, dass unabhängig von PRMTs oder Histon Lysin-Methyltransferasen (KMTs), die meisten Histon-Methyltransferasen direkt an der Modulation der Transkription linienspezifischer Gene beteiligt sind, indem sie direkt an die Promoterregionen von C/EBP α -, PPAR γ - und PPAR γ -Zielgenen binden [234]. Unsere Ergebnisse stehen damit in Einklang. Prmt6 bindet in Vorläuferzellen an die Promotoerregion von *C/EBP α* und *PPAR γ* , verlässt diese dann aber durch Induzieren der adipogenen Differenzierung.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Megakaryozyten Differenzierung gemacht [150], in diesem Fall wurde ein RUNX1-PRMT6-Komplex festgestellt. Eine Aussage darüber, ob dasselbe Ppar γ Molekül auf dem Promotor verbleibt und nur die Cofaktoren ausgetauscht sind oder ob ein neuer Komplex gebildet wird, kann anhand der Daten nicht getroffen werden. Da sowohl die Expression von Ppar γ als auch dessen Bindung an den C/ebpa Promotor durch die Differenzierung drastisch zunimmt (Abbildung 5, Abbildung 15), ist die Bildung eines neuen Komplexes wahrscheinlich.

Bemerkenswerterweise befand sich die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 schon in undifferenzierten Zellen am C/ebpa Locus (Abbildung 15). Dies lässt sich damit erklären, dass vor der Aktivierung adipozytärer Gene während der Differenzierung eine aktive Chromatinumgebung geschaffen wird [236–238]. Zudem steht dieses Ergebnis mit der vorherigen Beobachtung im Einklang, dass Ppar γ und C/ebpa zu einem gewissen Grad auch in undifferenzierten ST2 Zellen exprimiert werden (Abbildung 5).

Die repressive Markierung H3R2me2a, die durch Prmt6 vermittelt wird, wurde vor der Differenzierung nachgewiesen und ist nach der Induktion der Differenzierung reduziert. H3R2me2a wirkt der Bildung von H3K4me3 entgegen. Arginin-Methyl-Transferasen und Lysin-Demethylasen stehen in Wechselwirkung zueinander. Die Lysin-Demethylase KDM1A fördert die Adipogenese durch Unterdrückung des Wnt-Signalweges, der für die Osteogenese relevant ist [239]. Da PRMT6 und KDM1A nachweislich miteinander interagieren [240], ist es denkbar, dass PRMT6 und KDM1A gleichzeitig die Linienentscheidung zwischen Adipogenese und Osteogenese regulieren. Um die mögliche Zusammenarbeit von PRMT6 und KDM1A an diesem Punkt zu untersuchen, sind weitere Studien erforderlich.

Der Verlust von Prmt6 durch Genknockout veränderte die Expression von C/ebpa in undifferenzierten Zellen nicht, steigerte durch Induktion der Differenzierung aber seine Aktivierung (Abbildung 13). Außerdem wird die Rekrutierung von Cofaktoren an den Promotorregion von C/ebpa beeinflusst. Durch den Verlust von Prmt6 band weniger Hdac1 aber mehr CBP an diesen Locus. Prmt6 könnte eine Rolle als Gerüstprotein spielen, die zur Bindung von Hdac1 beiträgt. Alternativ könnte Prmt6 jedoch auch Transkriptionsfaktoren in seiner Nähe methylieren und auf diese Weise die Rekrutierung von Cofaktoren verändern. Diese Wirkungsweise wurde für die Transkriptionsfaktoren Prmt1 und Runx1 und gezeigt [241]. Allerdings zeigten Experimente am FABP4 Promotor, einem anderen Zielgen von PPAR γ , dass PRMT6 zwar gemeinsam mit PPAR γ an das PPAR-gamma-responsive Element (PPRE) des FABP4 Promotors bindet, um dort die repressive epigenetische Markierung H3R2me2a zu setzen, PPAR γ aber nicht methyliert [207]. Im Kontext der Bräunung von iWAT wird PPAR γ durch PRMT4 an Arginin 240

methyliert und dadurch der Coaktivator PRDM16 rekrutiert, was die Thermogenese beschleunigt [230]. Darüber hinaus zeigen Studien mit katalytisch defizienten Histon-Methyltransferasen, dass diese über die Methylierung hinaus auch wichtige Katalyse unabhängige Aktivitäten besitzen [234, 242].

4.5 Knockout von PPAR γ führt zum Verlust der adipogenen Identität

Der Knockout von Ppar γ resultiert in einer verminderten adipozytären Identität der ST2 Zellen (Abbildung 16). Dieser linienbestimmende Faktor [48, 243, 244] ist unerlässlich für die Adipogenese und interagiert dabei mit C/ebp α [29, 32, 76, 245]. Ppar γ bindet gemeinsam mit Prmt6 an seinen eigenen Promotor und an den C/ebp α Promotor (Abbildung 12). Der Verlust von Ppar γ änderte jedoch nicht die Präsenz von Prmt6 auf dem C/ebp α Promotor (Abbildung 17). Zudem führte der Verlust von Ppar γ zu einem Anstieg von dessen Heterodimerisierungspartner Rxr α am Promotor von C/ebp α . Mit der Verschiebung von Ppar γ /Rxr α zu Rxr α /Rxr α geht eine Stärkung der repressiven Chromatinumgebung am C/ebp α Promotor einher [246]. Dies wird zusätzlich durch die Zunahme der reprimierenden Histonmodifikation H3R2me2a und der Abnahme der aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9ac bekräftigt (Abbildung 18). Die Expression von C/ebp α und Fabp4 ist zudem reduziert (Abbildung 16). Die Daten deuten darauf hin, dass der Verlust von Ppar γ zu einem Zusammenbruch des adipozytären Genexpressionsprogramms führt. Infolgedessen besetzen verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie das Homodimer von Rxr α , den Promotor von C/ebp α und legen diesen still. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Vorstellung, dass die Adipogenese in zwei Wellen verläuft [12, 34]. In der ersten Welle schaffen Transkriptionsfaktoren wie C/ebp α und Rxr α eine offene Chromatinumgebung, in der die Expression von C/ebp α und Ppar γ gering ist. Die zweite Welle wird durch die Aktivierung von C/ebp α und Ppar γ bestimmt und ist für die reife Adipozytendifferenzierung erforderlich. Der Bindung von RXR α an Zielgene geht die Bindung von Ppar γ /Rxr α Zielgenen voraus [75]. Vermutlich wird durch den Verlust von Ppar γ ein unreifer Differenzierungszustand wiederhergestellt. Die Daten deuten zudem darauf hin, dass Prmt6 unabhängig von Ppar γ , durch einen Transkriptionsfaktor, zu Zielgenen rekrutiert wird. Prmt6 scheint eine Rolle in der frühen Adipogenese zu spielen, bevor die Ppar γ -C/ebp α Vorwärtsschleife aktiviert wird. Inwieweit Prmt6 mit Rxr α interagiert, muss in weiteren Studien gezeigt werden.

4.6 Interaktion von PRMT6 und RUNX2

Adipozytäre Vorläuferzellen befinden sich in einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen adipogener und osteogener Differenzierung. In den Vorläuferzellen können beide zelltypspezifische Genexpressionsprogramme initiiert werden, werden jedoch so lange unterdrückt, bis eine Differenzierung eingeleitet wird. Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Prmt6 die Aktivierung der Ppar γ -C/ebp α Vorwärtsschleife antagonisiert, siehe Abbildung 20. Auf diese Weise trägt Prmt6 zu Unterdrückung des adipogenen Genexpressionsprogramms in Vorläuferzellen bei.

Da ein negativer Effekt von Prmt6 auf die Adipogenese festgestellt wurde und Prmt6 an die Promotorregionen von beiden Genen, *Ppar γ* und *C/ebp α* , bindet und diese durch Induktion der Adipogenese verlässt, wurde nach Interaktionspartnern von Prmt6 in einem Corepressorkomplex gesucht (siehe Abbildung 21). Denn weitere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Prmt6 die Adipogenese an dieser Stelle nicht allein regulieren kann. Der Knockout von *Ppar γ* hat die Bindung von Prmt6 an den *C/ebp α* Promotor nicht beeinflusst. Zudem blieb die Bindung des ebenfalls repressiven und häufigen Interaktionspartners Hdac1 daraufhin ebenfalls unverändert (Abbildung 17).

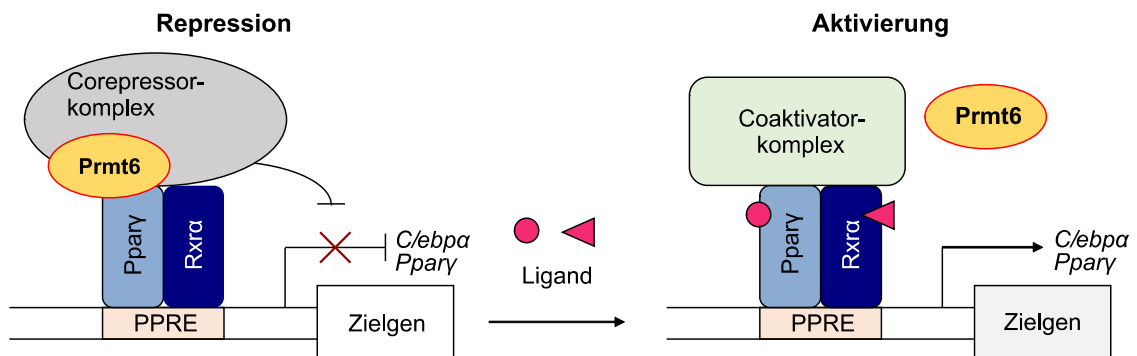


Abbildung 21: Prmt6 ist Teil eines Corepressorkomplexes

Prmt6 ist Teil eines Corepressorkomplexes an Promotorregionen von Ppar γ -Zielgenen. Das Heterodimer aus Ppar γ und Rxra ist an PPAR-Response-Elemente (PPRE) an Zielgenen gebunden. Bei einer Repression der Genexpression ist Prmt6 an Ppar γ gebunden. Kommt es durch Ligandenbindung zur Aktivierung der Differenzierungskaskade, löst sich der Corepressorkomplex samt Prmt6 und dieser wird durch einen Coaktivator-komplex ausgetauscht. Durch diesen Mechanismus kann die Expression von Ppar γ -Zielgenen reguliert werden. Abbildung verändert nach [247].

Prmt6 selbst besitzt keine DNA-Bindungsdomäne [248], daher ist es wahrscheinlich, dass der Interaktionspartner diese Domäne aufweist. PRMTs werden von anderen Transkriptionsfaktoren zu Zielgenen rekrutiert und können Teil von großen Transkriptionskomplexen sein [184]. Die Familie der Runt-related (RUNX)

Transkriptionsfaktoren RUNX1, RUNX2 und RUNX3 wirken kontextabhängig von Cofaktoren. RUNX1 und RUNX3 sind wichtige Regulatoren in der Hämatopoese, während RUNX2 essentiell für die Knochenentwicklung ist [249–251]. Die RUNX-Transkriptionsfaktoren haben in Skelettzellen teilweise redundante Rollen und zeigen kompensatorische Effekte [249]. Bei der Differenzierung von Hämatopoetischen Stammzellen wurde die Interaktion von PRMT6 und RUNX1 gezeigt [150–152, 184].

Die ChIP-Sequenzierungsdaten von RUNX2 aus MC3T3-E1 Zellen zeigen verschiedene RUNX2-Bindungscluster. Ein Teil der Peaks ist mit Osteoblasten bezogenen Genen assoziiert. Eine andere Untergruppe an RUNX2-Peaks dagegen ging auf Grund der Osteoblasten-Induktion verloren. Diese Gene stehen mit biologischen Funktionen in anderen Zelllinien, wie der Adipogenese in Verbindung. Die Bindung von RUNX2 an nicht-osteogene Zielgene hemmt die Zelldifferenzierung in andere Zelltypen [249, 252].

Die adipogene und osteogene Differenzierung sind zwei gegenläufige Prozesse, die sich gegenseitig blockieren [232–234]. Da RUNX2 als Hauptregulator der Osteogenese die Adipogenese hemmt, wurde RUNX2 als Interaktionspartner für PRMT6 in mesenchymalen stromalen Stammzellen vermutet.

Diese Hypothese konnte in ST2 Zellen validiert werden. Prmt6 und Runx2 banden gemeinsam an die Promotorregionen von *C/ebpa* und *Pparγ* (Abbildung 19). Somit ist es wahrscheinlich, dass Runx2 teil des Corepressors mit Prmt6 und Hdac1 an der Promotorregion von *Pparγ* und *C/ebpa* ist.

5 Kurzzusammenfassung

Transkriptionsfaktoren und Histon-modifizierende Enzyme sind zentrale Regulatoren der Genexpression sowie der Differenzierung. Die Adipogenese wird durch ein Netzwerk an verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert.

Bei der Differenzierung von MSCs legen Transkriptionsfaktoren fest, in welchen Zelltyp die Zellen differenzieren. Eine wesentliche Rolle in der Adipozyten-Differenzierung spielen Ppar γ und C/ebp α . Diese Transkriptionsfaktoren bilden während der Adipogenese eine Vorwärtsschleife zur gegenseitigen Verstärkung aus. Ppar γ interagiert mit epigenetischen Cofaktoren um C/ebp α und das nachgeschaltete adipozytäre Genexpressionsprogramm zu aktivieren und zu etablieren. Für das Verständnis der Adipogenese, bei normaler Differenzierung sowie bei Krankheit, ist die Kenntnis der epigenetischen Cofaktoren und Signalwege, die mit Ppar γ in Verbindung stehen, von zentraler Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Prmt6 und Ppar γ in Vorläuferzellen gemeinsam an die Promotorregionen von C/ebp α und Ppar γ binden. Dies führt zu einer reduzierten Expression dieser Gene, welche auch durch die katalytische Fähigkeit zur Induktion von H3R2me2a, beeinflusst wird. Durch Induktion Adipogenese, verlässt die Protein Arginin Methyltransferase 6 die Promotoren von C/ebp α und Ppar γ und das adipozytäre Genexpressionsprogramm wird aktiviert.

Durch die einen CRISPR/Cas9 vermittelten Knockout von Prmt6, sowie der Hemmung von Prmt6 durch den Inhibitor SGC6870, konnte der negative Effekt von Prmt6 auf die Adipogenese gezeigt werden. Der Verlust von Prmt6 wirkte fördernd auf die Adipogenese. Wohingegen eine Überexpression von Prmt6 die Differenzierung in Adipozyten hemmte. Dieses Wissen eröffnet damit die Möglichkeit einer epigenetischen Manipulation der Differenzierung für therapeutische Zwecke.

Darüber hinaus wurde die Beteiligung des für die Osteogenese relevanten Transkriptionsfaktors Runx2 an diesem Corepressorkomplex an den Loci nachgewiesen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass dieser Komplex essenziell zur Linienentscheidung zwischen Adipogenese und Osteogenese beiträgt.

Diese Daten liefern detaillierte Informationen über den molekularen Mechanismus, der die Ppar γ -C/ebp α Vorwärtsschleife steuert. Sie tragen somit zu unserem Verständnis der Adipogenese bei normaler und krankhaft veränderter Adipogenese bei.

6 Summary

Transcription factors and histone-modifying enzymes are central regulators of gene expression and differentiation. Adipogenesis is regulated by a network of different transcription factors.

During the differentiation of MSCs, transcription factors determine the cell type into which the cells differentiate. *Ppar γ* and *C/ebp α* play an essential role in adipocyte differentiation. During adipogenesis, these transcription factors form a feed-forward loop for mutual reinforcement. *Ppar γ* interacts with epigenetic cofactors to activate and establish *C/ebp α* and the downstream adipocytic gene expression program. Knowledge of the epigenetic cofactors and signaling pathways associated with *Ppar γ* is central to understanding adipogenesis, in normal differentiation as well as in disease.

In the present study, it was shown that Prmt6 and *Ppar γ* bind together to the promoter regions of *C/ebp α* and *Ppar γ* in progenitor cells. This leads to reduced expression of these genes, which is also influenced by the catalytic ability to induce H3R2me2a. By inducing adipogenesis, the protein arginine methyltransferase 6 leaves the promoters of *C/ebp α* and *Ppar γ* and the adipocytic gene expression program is activated.

The negative effect of Prmt6 on adipogenesis was demonstrated by CRISPR/Cas9-mediated knockout of Prmt6 and inhibition of Prmt6 by the inhibitor SGC6870. The loss of Prmt6 had a promoting effect on adipogenesis. In contrast, overexpression of Prmt6 inhibited differentiation into adipocytes. This knowledge opens the possibility of epigenetic manipulation for therapeutic purposes.

Runx2 is a relevant transcription factor for osteogenesis. In addition, the presence of Runx2 was demonstrated in this corepressor complex at the loci of *C/ebp α* and *Ppar γ* in progenitor cells. It is therefore reasonable to assume that this complex makes an essential contribution to the lineage decision between adipogenesis and osteogenesis.

These data provide detailed information on the molecular mechanism that controls the *Ppar γ* -*C/ebp α* forward-loop. They thus contribute to our understanding of adipogenesis in normal and pathologically altered adipogenesis.

7 Literaturverzeichnis

1. Nahmgoong H, Jeon YG, Park ES, et al (2022) Distinct properties of adipose stem cell subpopulations determine fat depot-specific characteristics. *Cell Metab* 34:458-472.e6
2. Rosen ED, Spiegelman BM (2014) What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* 156:20–44
3. Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81:715–736
4. Griseti E, Bello AA, Bieth E, Sabbagh B, Iacovoni JS, Bigay J, Laurell H, Čopič A (2024) Molecular mechanisms of perilipin protein function in lipid droplet metabolism. *FEBS Lett.* <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14792>
5. Grabner GF, Xie H, Schweiger M, Zechner R (2021) Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat Metab* 3:1445–1465
6. Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, Kimmel AR (1995) Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* 23:611–615
7. Vishvanath L, Gupta RK (2019) Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *J Clin Invest* 129:4022–4031
8. Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, Hui Y (2019) Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother.* <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108765>
9. Hassanshahi A, Hassanshahi M, Khabbazi S, Hosseini-Khah Z, Peymanfar Y, Ghalamkari S, Su YW, Xian CJ (2019) Adipose-derived stem cells for wound healing. *J Cell Physiol* 234:7903–7914
10. Xie Q, Wei W, Ruan J, Ding Y, Zhuang A, Bi X, Sun H, Gu P, Wang Z, Fan X (2017) Effects of miR-146a on the osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Scientific Reports* 2017 7:1 7:1–16
11. Pant R, Firmal P, Shah VK, Alam A, Chattopadhyay S (2020) Epigenetic Regulation of Adipogenesis in Development of Metabolic Syndrome. *Front Cell Dev Biol* 8:619888
12. Rauch A, Mandrup S (2021) Transcriptional networks controlling stromal cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22:465–482

13. Qin Y, Ge G, Yang P, Wang L, Qiao Y, Pan G, Yang H, Bai J, Cui W, Geng D (2023) An Update on Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine: Where Challenge Meets Opportunity. *Adv Sci* (Weinh). <https://doi.org/10.1002/ADVS.202207334>
14. Li S, Zong X, Zhang L, Li L, Wu J (2022) A chromatin accessibility landscape during early adipogenesis of human adipose-derived stem cells. *Adipocyte* 11:239–249
15. Li X, Zeng S, Chen L, et al (2023) An intronic enhancer of *Cebpa* regulates adipocyte differentiation and adipose tissue development via long-range loop formation. *Cell Prolif*. <https://doi.org/10.1111/CPR.13552>
16. Zheng H, Xie W (2019) The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0132-4>
17. Thunen A, La Placa D, Zhang Z, Shively JE (2022) Role of lncRNA LIPE-AS1 in adipogenesis. *Adipocyte* 11:11–27
18. Pitolitsyna E, Hazell Pickering S, Germier T, Collas P, Briand N (2022) Long non-coding RNA HOTAIR regulates cytoskeleton remodeling and lipid storage capacity during adipogenesis. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14296-6>
19. Shen R, Soeder RA, Ophardt HD, Giangrasso PJ, Cook LB (2019) Identification of long non-coding RNAs expressed during early adipogenesis. *Online J Biol Sci*. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2019.245.259>
20. Hu W, Alvarez-Dominguez JR, Lodish HF (2012) Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Rep*. <https://doi.org/10.1038/embo.2012.145>
21. Karbiener M, Scheideler M (2014) MicroRNA functions in brite/brown fat - Novel perspectives towards anti-obesity strategies. *Comput Struct Biotechnol J*. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.09.005>
22. Chen Y, Pan R, Pfeifer A (2017) Regulation of brown and beige fat by microRNAs. *Pharmacol Ther*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.004>
23. Giroud M, Pisani D, Karbiener M, et al (2016) miR-125b impairs brite adipocyte formation and function. *Diabetologie und Stoffwechsel*. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1580914>
24. Gharanei S, Shabir K, Brown JE, Weickert MO, Barber TM, Kyrou I, Randeva HS (2020) Regulatory microRNAs in Brown, Brite and White Adipose Tissue. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9112489>

25. Karbiener M, Pisani DF, Frontini A, et al (2014) MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.1603>
26. Moss ML, Minond D (2017) Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation. *Mediators Inflamm*. <https://doi.org/10.1155/2017/9673537>
27. Acharya A, Berry DC, Zhang H, Jiang Y, Jones BT, Hammer RE, Graff JM, Mendell JT (2019) MiR-26 suppresses adipocyte progenitor differentiation and fat production by targeting Fbxl19. *Genes Dev*. <https://doi.org/10.1101/gad.328955.119>
28. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002) C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 16:22–26
29. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM (1999) Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3:151–158
30. Lefterova MI, Lazar MA (2009) New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20:107–114
31. Tang QQ, Zhang JW, Lane MD (2004) Sequential gene promoter interactions of C/EBP β , C/EBP α , and PPAR γ during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 319:235–239
32. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, et al (2008) PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 22:2941–2952
33. Tontonoz P, Spiegelman BM (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu Rev Biochem* 77:289–312
34. Audano M, Pedretti S, Caruso D, Crestani M, De Fabiani E, Mitro N (2022) Regulatory mechanisms of the early phase of white adipocyte differentiation: an overview. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/S00018-022-04169-6>
35. Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, Kim SY, Shin CS (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 278:23270–23277

36. Kim J, Ko J (2014) A novel PPAR γ 2 modulator sLZIP controls the balance between adipogenesis and osteogenesis during mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Death Differ* 21:1642
37. Wagner ER, He B-C, Chen L, et al (2010) Therapeutic Implications of PPAR γ in Human Osteosarcoma. *PPAR Res* 2010:956427
38. Stechschulte LA, Lecka-Czernik B (2017) Reciprocal Regulation of PPAR γ and RUNX2 Activities in Marrow Mesenchymal Stem Cells: Fine Balance between p38 MAPK and Protein Phosphatase 5. *Current Molecular Biology Reports* 2017 3:23:107–113
39. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, et al (2005) TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 309:1074–1078
40. Shockley KR, Rosen CJ, Churchill GA, Lecka-Czernik B (2007) PPAR γ 2 Regulates a Molecular Signature of Marrow Mesenchymal Stem Cells. *PPAR Res* 2007:13
41. Stechschulte LA, Czernik PJ, Rotter ZC, et al (2016) PPARG Post-translational Modifications Regulate Bone Formation and Bone Resorption. *EBioMedicine* 10:174–184
42. Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, Olsen BR (2012) Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest* 122:3101–3113
43. Ichida F, Nishimura R, Hata K, et al (2004) Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:34015–34022
44. Sinha KM, Zhou X (2013) Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem* 114:975–984
45. Giralt M, Villarroya F (2013) White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* 154:2992–3000
46. Farmer SR (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263–273
47. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR (2007) Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242–256

48. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611–617
49. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585–595
50. Carmen Carmona M, Iglesias R, Obregón MJ, Darlington GJ, Villarroya F (2002) Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 277:21489–21498
51. Linhart HG, Ishimura-Oka K, Demayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ (2001) C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12532–12537
52. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6:38–54
53. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829–839
54. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM (2006) Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 3:333–341
55. Seale P, Bjork B, Yang W, et al (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961–967
56. Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni J V., Gygi SP, Spiegelman BM (2009) Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 460:1154–1158
57. Hondares E, Rosell M, Díaz-Delfín J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem* 286:43112–43122
58. Barberá MJ, Schlüter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown

- fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 276:1486–1493
59. Siersbæk MS, Loft A, Aagaard MM, Nielsen R, Schmidt SF, Petrovic N, Nedergaard J, Mandrup S (2012) Genome-Wide Profiling of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Primary Epididymal, Inguinal, and Brown Adipocytes Reveals Depot-Selective Binding Correlated with Gene Expression. *Mol Cell Biol* 32:3452–3463
 60. Rajakumari S, Wu J, Ishibashi J, Lim HW, Giang AH, Won KJ, Reed RR, Seale P (2013) EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab* 17:562–574
 61. Villanueva CJ, Vergnes L, Wang J, et al (2013) Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPAR γ specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab* 17:423–435
 62. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8:1224–1234
 63. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD (1995) Isolation of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma cDNA: Expression in Hematopoietic Cells and Chromosomal Mapping. *Gene Expr* 4:281
 64. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E (2021) PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front Endocrinol (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.624112/FULL>
 65. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, et al (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *Journal of Biological Chemistry* 272:18779–18789
 66. Varley CL, Stahlschmidt J, Lee WC, Holder J, Diggle C, Selby PJ, Trejdosiewicz LK, Southgate J (2004) Role of PPAR γ and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J Cell Sci* 117:2029–2036
 67. Rochel N, Krucker C, Coutos-Thévenot L, et al (2019) Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nature Communications* 2019 10:1 10:1–12
 68. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, Benoist C, Mathis D (2012) PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 2012 486:7404 486:549–553

69. Aprile M, Cataldi S, Ambrosio MR, et al (2018) PPAR γ Δ 5, a Naturally Occurring Dominant-Negative Splice Isoform, Impairs PPAR γ Function and Adipocyte Differentiation. *Cell Rep* 25:1577-1592.e6
70. Rastinejad F, Huang P, Chandra V, Khorasanizadeh S (2013) Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J Mol Endocrinol* 51:T1–T21
71. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, Rastinejad F (2008) Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 2008 456:7220 456:350–356
72. Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM (1994) Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucleic Acids Res* 22:5628–5634
73. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992) Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879–887
74. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S (2014) PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25:293–302
75. Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, et al (2008) Genome-wide profiling of PPAR γ :RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* 22:2953–2967
76. Madsen MS, Siersbæk R, Boergesen M, Nielsen R, Mandrup S (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor γ and C/EBP α synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Mol Cell Biol* 34:939–954
77. Lefterova MI, Steger DJ, Zhuo D, Qatanani M, Mullican SE, Tuteja G, Manduchi E, Grant GR, Lazar MA (2010) Cell-Specific Determinants of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Function in Adipocytes and Macrophages. *Mol Cell Biol* 30:2078–2089
78. Nielsen R, Grøntved L, Stunnenberg HG, Mandrup S (2006) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Subtype- and Cell-Type-Specific Activation of Genomic Target Genes upon Adenoviral Transgene Delivery. *Mol Cell Biol* 26:5698–5714

79. Jeninga EH, Gurnell M, Kalkhoven E (2009) Functional implications of genetic variation in human PPAR γ . *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20:380–387
80. Jeninga EH, Van Beekum O, Van Dijk ADJ, Hamers N, Hendriks-Stegeman BI, Bonvin AMJJ, Berger R, Kalkhoven E (2007) Impaired Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Function through Mutation of a Conserved Salt Bridge (R425C) in Familial Partial Lipodystrophy. *Molecular Endocrinology* 21:1049–1065
81. Li B, Reynolds JM, Stout RD, Bernlohr DA, Suttles J (2009) Regulation of Th17 Differentiation by Epidermal Fatty Acid-Binding Protein. *The Journal of Immunology* 182:7625–7633
82. Wang LH, Yang XY, Zhang X, et al (2004) Transcriptional Inactivation of STAT3 by PPAR γ Suppresses IL-6-Responsive Multiple Myeloma Cells. *Immunity* 20:205–218
83. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, et al (2009) The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell–intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 206:2079–2089
84. Ricote M, Glass CK (2007) PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771:926–935
85. Chinenov Y, Gupte R, Rogatsky I (2013) Nuclear receptors in inflammation control: Repression by GR and beyond. *Mol Cell Endocrinol* 380:55–64
86. Pascual G, Glass CK (2006) Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17:321–327
87. Hollman DAA, Milona A, Van Erpecum KJ, Van Mil SWC (2012) Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: Insights into molecular mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821:1443–1452
88. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK (2005) A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature* 2005 437:7059–7063
89. Broekema MF, Savage DB, Monajemi H, Kalkhoven E (2019) Gene-gene and gene-environment interactions in lipodystrophy: Lessons learned from natural PPAR γ mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864:715–732

90. Beekun O Van, Fleskens V, Kalkhoven E (2009) Posttranslational Modifications of PPAR- γ : Fine-tuning the Metabolic Master Regulator. *Obesity* 17:213–219
91. Choi JH, Banks AS, Estall JL, et al (2010) Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature* 2010 466:7305 466:451–456
92. Qiang L, Wang L, Kon N, et al (2012) Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppary. *Cell* 150:620–632
93. Mayoral R, Osborn O, McNelis J, et al (2015) Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPAR γ activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. *Mol Metab* 4:378–391
94. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeldk MG, Willson TM, Glass CK, Milburn M V (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor.
95. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, et al (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4318–4323
96. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel L, Morris DC, Lehmann' JM (1995) A Prostaglandin J2 Metabolite Binds Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Promotes Adipocyte Differentiation. *Cell* 83:813–819
97. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995) 5Deoxy-A 12g 14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ . *Cell* 83:803–812
98. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 93:229–240
99. Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA (2003) Biosynthesis of 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ2 and the ligation of PPAR γ . *J Clin Invest* 112:945–955
100. Balint B, Nagy L (2012) Selective Modulators of PPAR Activity as New Therapeutic Tools in Metabolic Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6:33–43
101. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry* 270:12953–12956

102. Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean MEJ (1999) Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22:288–293
103. Nakamura T, Funahashi T, Yamashita S, et al (2001) Thiazolidinedione derivative improves fat distribution and multiple risk factors in subjects with visceral fat accumulation - Double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 54:181–190
104. Akazawa S, Sun F, Ito M, Kawasaki E, Eguchi K (2000) Efficacy of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23:1067–1071
105. Kroker AJ, Bruning JB (2015) Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR γ partial agonism. *PPAR Res.* <https://doi.org/10.1155/2015/816856>
106. Kojetin DJ, Burris TP (2013) Small Molecule Modulation of Nuclear Receptor Conformational Dynamics: Implications for Function and Drug Discovery. *Mol Pharmacol* 83:1–8
107. Gilani A, Stoll L, Homan EA, Lo JC (2024) Adipose Signals Regulating Distal Organ Health and Disease. *Diabetes* 73:169–177
108. MacDougald OA, Burant CF (2007) The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metab* 6:159–161
109. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A (2009) Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20:16–24
110. Tilg H, Moschen AR (2008) Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci (Lond)* 114:275–288
111. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293–1307
112. van der Ark-Vonk EM, Puijk M V., Pasterkamp G, van der Laan SW (2024) The Effects of FABP4 on Cardiovascular Disease in the Aging Population. *Curr Atheroscler Rep* 26:163
113. Gillilan RE, Ayers SD, Noy N (2007) Structural Basis for Activation of Fatty Acid Binding Protein 4. *J Mol Biol* 372:1246
114. Furuhashi M (2019) Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb* 26:216

115. Abdalla MMI (2024) Therapeutic potential of adiponectin in prediabetes: strategies, challenges, and future directions. *Ther Adv Endocrinol Metab.* <https://doi.org/10.1177/20420188231222371>
116. Kadowaki T, Yamauchi T (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26:439–451
117. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AFH (2003) Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361:226–228
118. Achari AE, Jain SK (2017) Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* <https://doi.org/10.3390/IJMS18061321>
119. Morroni M, Giordano A, Zingaretti MC, et al (2004) Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16801–16806
120. Cinti S (2018) Pink Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29:651–666
121. Noriega L, Yang CY, Wang CH (2023) Brown Fat and Nutrition: Implications for Nutritional Interventions. *Nutrients.* <https://doi.org/10.3390/NU15184072>
122. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ (2001) The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity Reviews* 2:239–254
123. Cedikova M, Kripnerová M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, Mullerova D, Kuncova J (2016) Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2016/6067349>
124. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA (2014) Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature Communications* 2014 5:1 5:1–13
125. Valencak TG, Osterrieder A, Schulz TJ (2017) Sex matters: The effects of biological sex on adipose tissue biology and energy metabolism. *Redox Biol* 12:806–813
126. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S (2014) White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol.* <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945>
127. Cinti S (2019) White, brown, beige and pink: A rainbow in the adipose organ. *Curr Opin Endocr Metab Res* 4:29–36

128. Corrêa LH, Heyn GS, Magalhaes KG (2019) The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/CELLS8070662>
129. Enerbäck S (2010) Human Brown Adipose Tissue. *Cell Metab* 11:248–252
130. Colleluori G, Perugini J, Di Vincenzo A, Senzacqua M, Giordano A, Cinti S (2022) Brown Fat Anatomy in Humans and Rodents. *Methods in Molecular Biology* 2448:19–42
131. Rao J, Djeflal Y, Chal J, et al (2023) Reconstructing human brown fat developmental trajectory in vitro. *Dev Cell* 58:2359-2375.e8
132. Enerbäck S (2010) Brown adipose tissue in humans. *International Journal of Obesity* 2010 34:1 34:S43–S46
133. Sabaté-Pérez A, Romero M, Sánchez-Fernández-de-Landa P, et al (2023) Autophagy-mediated NCOR1 degradation is required for brown fat maturation and thermogenesis. *Autophagy* 19:904–925
134. Genchi VA, Palma G, Sorice GP, et al (2023) Pharmacological modulation of adaptive thermogenesis: new clues for obesity management? *J Endocrinol Invest* 46:2213–2236
135. Giordano A, Frontini A, Cinti S (2016) Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discov* 15:405–424
136. Li Z, de Jonge WJ, Wang Y, Rensen PCN, Kooijman S (2020) Electrical Neurostimulation Promotes Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11:567545
137. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJJ (2009) Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718> 360:1500–1508
138. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al (2009) Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine* 360:1518–1525
139. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al (2009) Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine* 360:1509–1517

140. van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P (2011) Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301:285–296
141. Ikeda K, Maretich P, Kajimura S (2018) The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 29:191–200
142. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S (2012) PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab* 15:395–404
143. Gupta S, Kadumuri RV, Singh AK, Chavali S, Dhayalan A (2021) Structure, Activity and Function of the Protein Arginine Methyltransferase 6. *Life* 2021, Vol 11, Page 951 11:951
144. Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33:1–13
145. Chen Z, Gan J, Wei Z, Zhang M, Du Y, Xu C, Zhao H (2022) The Emerging Role of PRMT6 in Cancer. *Front Oncol*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.841381>
146. Harrison MJ, Tang YH, Dowhan DH (2010) Protein arginine methyltransferase 6 regulates multiple aspects of gene expression. *Nucleic Acids Res* 38:2201–2216
147. Dowhan DH, Harrison MJ, Eriksson NA, et al (2012) Protein arginine methyltransferase 6-dependent gene expression and splicing: association with breast cancer outcomes. *Endocr Relat Cancer* 19:509–526
148. Li Z, Wang P, Li J, et al (2021) The N6-methyladenosine demethylase ALKBH5 negatively regulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through PRMT6. *Cell Death Dis*. <https://doi.org/10.1038/S41419-021-03869-4>
149. Lausen J (2013) Contributions of the histone arginine methyltransferase PRMT6 to the epigenetic function of RUNX1. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 23:265–274
150. Herglotz J, Kuvardina ON, Kolodziej S, Kumar A, Hussong H, Grez M, Lausen J (2013) Histone arginine methylation keeps RUNX1 target genes in an intermediate state. *Oncogene* 32:2565–2575
151. Herkt SC, Kuvardina ON, Herglotz J, et al (2018) Protein arginine methyltransferase 6 controls erythroid gene expression and differentiation of human CD34+ progenitor cells. *Mol Cell* 103:585–595

152. Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, et al (2015) RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood* 125:3570–3579
153. Lee YH, Ma H, Tan TZ, Ng SS, Soong R, Mori S, Fu XY, Zernicka-Goetz M, Wu Q (2012) Protein arginine methyltransferase 6 regulates embryonic stem cell identity. *Stem Cells Dev* 21:2613–2622
154. El-Andaloussi N, Valovka T, Toueille M, et al (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell* 22:51–62
155. Veland N, Hardikar S, Zhong Y, Gayatri S, Dan J, Strahl BD, Rothbart SB, Bedford MT, Chen T (2017) The Arginine Methyltransferase PRMT6 Regulates DNA Methylation and Contributes to Global DNA Hypomethylation in Cancer. *Cell Rep* 21:3390–3397
156. Kim S, Kim NH, Park JE, Hwang JW, Myung N, Hwang KT, Kim YA, Jang CY, Kim YK (2020) PRMT6-mediated H3R2me2a guides Aurora B to chromosome arms for proper chromosome segregation. *Nat Commun.* <https://doi.org/10.1038/S41467-020-14511-W>
157. Huang T, Yang Y, Song X, et al (2021) PRMT6 methylation of RCC1 regulates mitosis, tumorigenicity, and radiation response of glioblastoma stem cells. *Mol Cell* 81:1276-1291.e9
158. Zhang H, Han C, Li T, Li N, Cao X (2018) The methyltransferase PRMT6 attenuates antiviral innate immunity by blocking TBK1–IRF3 signaling. *Cellular & Molecular Immunology* 2018 16:10 16:800–809
159. Luo M, Li Y, Guo H, Lin S, Chen J, Ma Q, Gu Y, Jiang Z, Gui Y (2015) Protein Arginine Methyltransferase 6 Involved in Germ Cell Viability during Spermatogenesis and Down-Regulated by the Androgen Receptor. *Int J Mol Sci* 16:29467–29481
160. Ma M, Liu F, Miles HN, Kim EJ, Fields L, Xu W, Li L (2023) Proteome-wide Profiling of Asymmetric Dimethylated Arginine in Human Breast Tumors. *J Am Soc Mass Spectrom* 34:1692–1700
161. Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, et al (2011) Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* 128:562–573

162. Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT (2002) The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem* 277:3537–3543
163. Li T, He X, Luo L, Zeng H, Ren S, Chen Y (2021) F-Box Protein FBXW17-Mediated Proteasomal Degradation of Protein Methyltransferase PRMT6 Exaggerates CSE-Induced Lung Epithelial Inflammation and Apoptosis. *Front Cell Dev Biol* 9:599020
164. Chen W, Gao D, Xie L, Wang A, Zhao H, Guo C, Sun Y, Nie Y, Hong A, Xiong S (2020) SCF-FBXO24 regulates cell proliferation by mediating ubiquitination and degradation of PRMT6. *Biochem Biophys Res Commun* 530:75–81
165. Cheng D, Gao G, Lorenzo A DI, Jayne S, Hottiger MO, Richard S, Bedford MT (2020) Genetic evidence for partial redundancy between the arginine methyltransferases CARM1 and PRMT6. *J Biol Chem* 295:17060–17070
166. Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, Hsieh J, Bauer UM (2007) PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev* 21:3369–3380
167. Iberg AN, Espejo A, Cheng D, Kim D, Michaud-Levesque J, Richard S, Bedford MT (2008) Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *J Biol Chem* 283:3006–3010
168. Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Lüscher B, Amati B (2007) Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 449:933–937
169. Casadio F, Lu X, Pollock SB, LeRoy G, Garcia BA, Muir TW, Roeder RG, Allis CD (2013) H3R42me2a is a histone modification with positive transcriptional effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:14894–14899
170. Hwang JW, Cho Y, Bae G-U, Kim S-N, Kim YK (2021) Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. *Exp Mol Med* 53:788–808
171. Singhroy DN, Mesplède T, Sabbah A, Quashie PK, Falgout JP, Wainberg MA (2013) Automethylation of protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6) regulates its stability and its anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-73>
172. Hamey JJ, Rakow S, Bouchard C, Senst JM, Kolb P, Bauer UM, Wilkins MR, Hart-Smith G (2021) Systematic investigation of PRMT6 substrate recognition reveals

- broad specificity with a preference for an RG motif or basic and bulky residues. *FEBS J* 288:5668–5691
173. Kolodziej S, Kuvardina ON, Oellerich T, et al (2014) PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation. *Nat Commun.* <https://doi.org/10.1038/NCOMMS4995>
 174. Tenney K, Shilatifard A (2005) A COMPASS in the voyage of defining the role of trithorax/MLL-containing complexes: linking leukemogenesis to covalent modifications of chromatin. *J Cell Biochem* 95:429–436
 175. Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN, Herr W (2003) Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* 17:896–911
 176. Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, et al (2004) Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus. *Mol Cell* 13:587–597
 177. Steward MM, Lee JS, O'Donovan A, Wyatt M, Bernstein BE, Shilatifard A (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13:852–854
 178. Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, Zardo G, Nervi C, Bernard L, Amati B (2006) Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 8:764–770
 179. Stein C, Nötzold RR, Riedl S, Bouchard C, Bauer U-M (2016) The Arginine Methyltransferase PRMT6 Cooperates with Polycomb Proteins in Regulating HOXA Gene Expression. *PLoS One* 11:e0148892
 180. Zheng S, Zeng C, Huang A, Huang F, Meng A, Wu Z, Zhou S (2022) Relationship between protein arginine methyltransferase and cardiovascular disease (Review). *Biomed Rep.* <https://doi.org/10.3892/BR.2022.1572>
 181. Raveendran VV, Al-Haffar K, Kunhi M, Belhaj K, Al-Habeeb W, Al-Buraiqi J, Eyjolsson A, Poizat C (2020) Protein arginine methyltransferase 6 mediates cardiac hypertrophy by differential regulation of histone H3 arginine methylation. *Heliyon.* <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2020.E03864>
 182. Nakakido M, Deng Z, Suzuki T, Dohmae N, Nakamura Y, Hamamoto R (2015) PRMT6 increases cytoplasmic localization of p21CDKN1A in cancer cells through

- arginine methylation and makes more resistant to cytotoxic agents. *Oncotarget* 6:30957
183. Schneider L, Herkt S, Wang L, et al (2021) PRMT6 activates cyclin D1 expression in conjunction with the transcription factor LEF1. *Oncogenesis*. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00332-z>
 184. Schneider L, Herkt S, Wang L, et al (2021) PRMT6 activates cyclin D1 expression in conjunction with the transcription factor LEF1. *Oncogenesis* 10:42
 185. Xuan X, Zhang Y, Song Y, Zhang B, Liu J, Liu D, Lu S (2024) Role of protein arginine methyltransferase 1 in obesity-related metabolic disorders: Research progress and implications. *Diabetes Obes Metab*. <https://doi.org/10.1111/DOM.15640>
 186. Aggoun Y (2007) Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Pediatr Res* 61:653–659
 187. Daniels SR, Jacobson MS, McCrindle BW, Eckel RH, Sanner BMH (2009) American Heart Association Childhood Obesity Research Summit: executive summary. *Circulation* 119:2114–2123
 188. Eckel RH, York DA, Rössner S, Van Hubbard, Caterson I, St. Jeor ST, Hayman LL, Mullis RM, Blair SN (2004) Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: executive summary. *Circulation* 110:2968–2975
 189. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH (1999) The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 282:1523–1529
 190. Chen Q, Shou P, Zheng C, et al (2016) Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ* 23:1128–1139
 191. Abdallah BM (2017) Marrow adipocytes inhibit the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts via suppressing BMP-signaling. *J Biomed Sci* 24:1–10
 192. Gkastaris K, Goulis DG, Potoupnis M, Anastasilakis AD, Kapetanios G (2020) Obesity, osteoporosis and bone metabolism. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 20:372
 193. DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (2024) 293T. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-635>. Accessed 2 Jan 2024

194. DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (2024) ST-2. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-333>. Accessed 2 Jan 2024
195. Raeth S, Sacchetti B, Siegel G, Mau-Holzmann UA, Hansmann J, Vacun G, Hauk TG, Pfizenmaier K, Hausser A (2014) A mouse bone marrow stromal cell line with skeletal stem cell characteristics to study osteogenesis in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev* 23:1097–1108
196. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419–6419
197. Abcam (2021) ChIP protocol for cross-linking chromatin immunoprecipitation (X-ChIP). <https://www.abcam.com/protocols/cross-linking-chromatin-immunoprecipitation-x-chip-protocol>. Accessed 3 Jan 2024
198. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B (2008) A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 16:698–706
199. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11:783–784
200. Shen Y, Li F, Szewczyk MM, et al (2021) A First-in-Class, Highly Selective and Cell-Active Allosteric Inhibitor of Protein Arginine Methyltransferase 6. *J Med Chem* 64:3697–3706
201. Stringer BW, Day BW, D'Souza RCJ, et al (2019) A reference collection of patient-derived cell line and xenograft models of proneural, classical and mesenchymal glioblastoma. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-41277-Z>
202. The Human Protein Atlas (2023) Single cell type - PRMT6 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198890-PRMT6/single+cell+type>. Accessed 28 Dec 2023
203. Karlsson M, Zhang C, Méar L, et al (2021) A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABH2169>
204. The Human Protein Atlas (2023) Single cell type - PRMT6 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198890-PRMT6/single+cell+type/adipose+tissue>. Accessed 28 Dec 2023
205. Abdallah BM, Alzahrani AM, Abdel-Moneim AM, Ditzel N, Kassem M (2019) A simple and reliable protocol for long-term culture of murine bone marrow stromal

- (mesenchymal) stem cells that retained their in vitro and in vivo stemness in long-term culture. *Biol Proced Online* 21:3
206. Chava S, Chennakesavulu S, Gayatri MB, Reddy ABM (2018) A novel phosphorylation by AMP-activated kinase regulates RUNX2 from ubiquitination in osteogenesis over adipogenesis article. *Cell Death Dis.* <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0791-7>
207. Hwang JW, So YS, Bae GU, Kim SN, Kim YK (2019) Protein arginine methyltransferase 6 suppresses adipogenic differentiation by repressing peroxisome proliferator-activated receptor γ activity. *Int J Mol Med* 43:2462–2470
208. Sethi JK, Vidal-Puig AJ (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48:1253–1262
209. Herrmann F, Fackelmayer FO (2009) Nucleo-cytoplasmic shuttling of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) requires enzymatic activity. *Genes Cells* 14:309–317
210. Gu Z, Li Y, Lee P, Liu T, Wan C, Wang Z (2012) Protein arginine methyltransferase 5 functions in opposite ways in the cytoplasm and nucleus of prostate cancer cells. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0044033>
211. Wang N, Li M, Cao Y, Yang H, Li L, Ge L, Fan Z, Zhang C, Jin L (2022) PRMT6/LMNA/CXCL12 signaling pathway regulated the osteo/odontogenic differentiation ability in dental stem cells isolated from apical papilla. *Cell Tissue Res* 389:187–199
212. Bonnefond L, Stojko J, Mailliot J, Troffer-Charlier N, Cura V, Wurtz JM, Cianférani S, Cavarelli J (2015) Functional insights from high resolution structures of mouse protein arginine methyltransferase 6. *J Struct Biol* 191:175–183
213. Elkhawaga SY, Ismail A, Elsakka EGE, Doghish AS, Elkady MA, El-Mahdy HA (2023) miRNAs as cornerstones in adipogenesis and obesity. *Life Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121382>
214. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N (2015) Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.008>

215. Huang HY, Lin YCD, Cui S, et al (2022) MiRTarBase update 2022: An informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1079>
216. Li X, Liu B, Wang S, Li J, Ge X (2023) MiR-141-3p promotes malignant progression in prostate cancer through AlkB homolog 5-mediated m⁶A modification of protein arginine methyltransferase 6. *Chinese Journal of Physiology.* <https://doi.org/10.4103/cjop.CJOP-D-22-00071>
217. Jiang N, Li QL, Pan W, Li J, Zhang MF, Cao T, Su SG, Shen H (2020) PRMT6 promotes endometrial cancer via AKT/mTOR signaling and indicates poor prognosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105681>
218. Cheng Y, Gao Z, Zhang T, et al (2023) Decoding m⁶A RNA methylome identifies PRMT6-regulated lipid transport promoting AML stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* 30:69-85.e7
219. Sun Y, Chung HH, Woo ARE, Lin VC-L (2014) Protein arginine methyltransferase 6 enhances ligand-dependent and -independent activity of estrogen receptor α via distinct mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1843:2067–2078
220. Scaramuzzino C, Casci I, Parodi S, et al (2015) Protein arginine methyltransferase 6 enhances polyglutamine-expanded androgen receptor function and toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 85:88–100
221. Eram MS, Shen Y, Szewczyk MM, et al (2016) A Potent, Selective and Cell-active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases. *ACS Chem Biol* 11:772
222. Zhu Q, Wang D, Liang F, Tong X, Liang Z, Wang X, Chen Y, Mo D (2022) Protein arginine methyltransferase PRMT1 promotes adipogenesis by modulating transcription factors C/EBP β and PPAR γ . *Journal of Biological Chemistry.* <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102309>
223. Li Y, Peng M, Zeng T, Zheng J, Liao Y, Zhang H, Yang S, Chen L (2020) Protein arginine methyltransferase 4 regulates adipose tissue lipolysis in type 1 diabetic mice. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity.* <https://doi.org/10.2147/DMSO.S235869>
224. Yadav N, Cheng D, Richard S, Morel M, Iyer VR, Aldaz CM, Bedford MT (2008) CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPAR γ . *EMBO Rep.* <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401151>

225. Miao F, Li SL, Chavez V, Lanting L, Natarajan R (2006) Coactivator-associated arginine methyltransferase-1 enhances nuclear factor-kb-mediated gene transcription through methylation of histone H3 at arginine 17. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0365>
226. Dacwag CS, Ohkawa Y, Pal S, Sif S, Imbalzano AN (2007) The Protein Arginine Methyltransferase Prmt5 Is Required for Myogenesis because It Facilitates ATP-Dependent Chromatin Remodeling. *Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01528-06>
227. Ma Z, Lyu X, Qin N, Liu H, Zhang M, Lai Y, Dong B, Lu P (2023) Coactivator-associated arginine methyltransferase 1: A versatile player in cell differentiation and development. *Genes Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.021>
228. Imbalzano AN, Hu YJ, Sif S (2013) Prmt7 is dispensable in tissue culture models for adipogenic differentiation. *F1000Res*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-279.v1>
229. Leem YE, Bae JH, Jeong HJ, Kang JS (2019) PRMT7 deficiency enhances adipogenesis through modulation of C/EBP- β . *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.096>
230. Zhong Y, Wang Y, Li X, et al (2023) PRMT4 Facilitates White Adipose Tissue Browning and Thermogenesis by Methylating PPAR γ . *Diabetes* 72:1095–1111
231. Imbalzano AN, Hu YJ, Sif S (2013) Prmt7 is dispensable in tissue culture models for adipogenic differentiation. *F1000Res* 2:279
232. Zhao Y, Ding S (2007) A high-throughput siRNA library screen identifies osteogenic suppressors in human mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9673–9678
233. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102:341–351
234. Zhao Y, Skovgaard Z, Wang Q (2024) Regulation of adipogenesis by histone methyltransferases. *Differentiation* 136:100746
235. Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J, Reddy JK (2010) Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res*. <https://doi.org/10.1155/2010/250126> PM - 20814439

236. Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, Rosen ED (2010) Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell* 143:156–169
237. Siersbæk R, Nielsen R, John S, Sung M-H, Baek S, Loft A, Hager GL, Mandrup S (2011) Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor “hotspots” during early adipogenesis. *EMBO J* 30:1459–1472
238. Sarusi Portuguese A, Schwartz M, Siersbaek R, Nielsen R, Sung M-H, Mandrup S, Kaplan T, Hakim O (2017) Hierarchical role for transcription factors and chromatin structure in genome organization along adipogenesis. *FEBS J* 284:3230–3244
239. Wang D, Kuang Y, Zhang G, Xiao K, Liu Y (2022) Lysine-Specific Demethylase 1 in Energy Metabolism: A Novel Target for Obesity. *J Nutr* 152:1611–1620
240. Prakasam R, Bonadiman A, Andreotti R, et al (2023) LSD1/PRMT6-targeting gene therapy to attenuate androgen receptor toxic gain-of-function ameliorates spinobulbar muscular atrophy phenotypes in flies and mice. *Nat Commun.* <https://doi.org/10.1038/S41467-023-36186-9>
241. Zhao X, Jankovic V, Gural A, et al (2008) Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 22:640–653
242. Morgan MAJ, Shilatifard A (2023) Epigenetic moonlighting: Catalytic-independent functions of histone modifiers in regulating transcription. *Sci Adv.* <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg6593>
243. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM (1995) Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9856–9860
244. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147–1156
245. Musri MM, Carmona MC, Hanzu FA, Kaliman P, Gomis R, Párrizas M (2010) Histone demethylase LSD1 regulates adipogenesis. *J Biol Chem* 285:30034–30041
246. Huang F, Li Y, Chen J, Zhang X kun, Zhou H (2020) Rosiglitazone binds to RXRα to induce RXRα tetramerization and NB4 cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 530:160–166
247. Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, Doi T (2008) The Role of PPARs in Cancer. *PPAR Res* 2008:102737

248. Kleinschmidt MA, de Graaf P, van Teeffelen HAAM, Timmers HTM (2012) Cell Cycle Regulation by the PRMT6 Arginine Methyltransferase through Repression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *PLoS One* 7:41446
249. Hojo H, Ohba S (2023) Runt-related Transcription Factors and Gene Regulatory Mechanisms in Skeletal Development and Diseases. *Curr Osteoporos Rep* 21:485
250. Hojo H, Saito T, He X, et al (2022) Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. *Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111315>
251. De Bruijn M, Dzierzak E (2017) Runx transcription factors in the development and function of the definitive hematopoietic system. *Blood* 129:2061–2069
252. Wu H, Whitfield TW, Gordon JAR, Dobson JR, Tai PWL, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2014) Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis. *Genome Biol.* <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r52>

8 Anhang

8.1 Adipogenese in ST2 Zellen

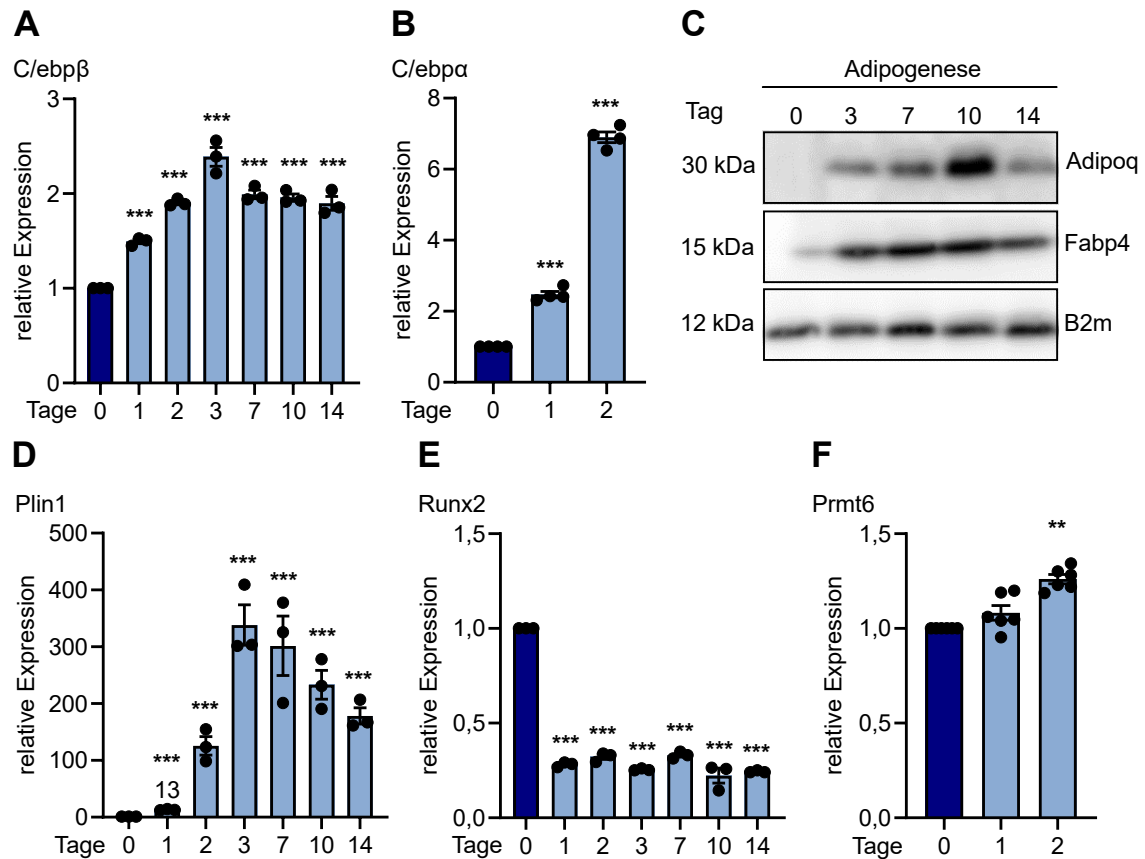


Abbildung A 1: Genexpression in ST2 Zellen während der Adipozyten Differenzierung

ST2 Zellen wurden mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses ihre Genexpression mittels qRT-PCR oder ihre Proteinmenge ermittelt. Genexpression von (A) *C/ebpβ* und (B) *C/ebpα* während der Adipogenese. (C) Proteinexpression von Adiponektin (Adipoq) und Fabp4 zu den angegebenen Zeitpunkten. Ein Western Blot mit Anti-B2m Antikörper wurde als Ladekontrolle verwendet. (D) Relative Genexpression von (*Perilipin*) *Plin1* während der Adipogenese. (E) mRNA-Level des osteogenen spezifischen Gens *Runx2* im Verlauf der Adipogenese. (F) Relative Expression von *Prmt6* zu den angegebenen Zeitpunkten während der Adipogenese. Die qRT-PCR wurde mit genspezifischen Primerpaaren durchgeführt und die Daten als relative Expression, normalisiert auf das Housekeeping-Gen TBP, dargestellt. Die Werte von Tag 0 wurden als 1 gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus dem Mittelwert von mindestens drei Experimenten. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. ***P* < 0,002, ****P* < 0,001.

8.2 Adipogenese in M2 Zellen

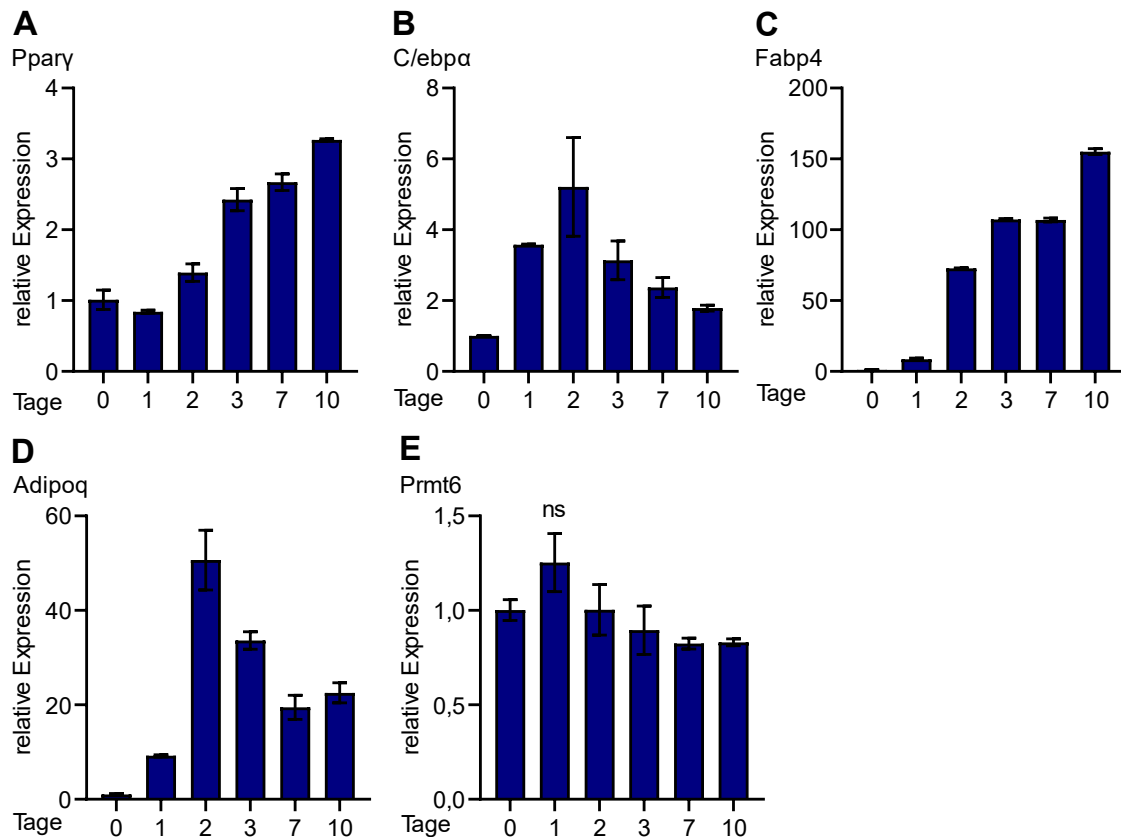


Abbildung A 2: Genexpression in M2 Zellen während der Adipogenese

M2 Zellen wurden mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses ihre Genexpression mittels qRT-PCR ermittelt. Die Genexpression von (A) *Pparγ*, (B) *C/ebpa*, (C) *Fabp4* und (D) *Adipoq* im Verlauf der Adipogenese. (E) *Prmt6* Expression durch Induktion der adipogenen Differenzierung. Die qRT-PCR wurde mit genspezifischen Primerpaaren durchgeführt und die Daten als relative Expression, normalisiert auf das Housekeeping-Gen TBP, dargestellt. Die Werte von Tag 0 wurden als 1 gesetzt. N=3.

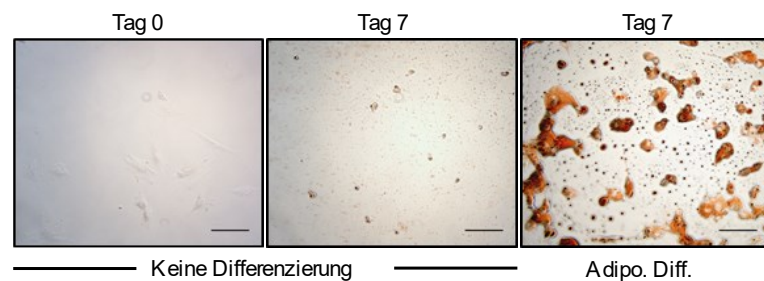


Abbildung A 3: Differenzierungskapazität von M2 Zellen

M2 Zellen wurden für sieben Tage mit Adipozyten-Differenzierungsmedium oder dem Lösungsmittel als Zugabe behandelt. Nach sieben Tagen der Differenzierung konnten Fetttropfen mittels Oil-Red-O angefärbt werden, während die Zellen der Lösungsmittelkontrolle kein eingelagertes Fett aufwiesen. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Oil-Red-O Färbung. Der Größenmarker gibt 100 µm an. N=3.

8.3 Inhibierung von PRMT6 reduziert H3R2me2a in M2 Zellen

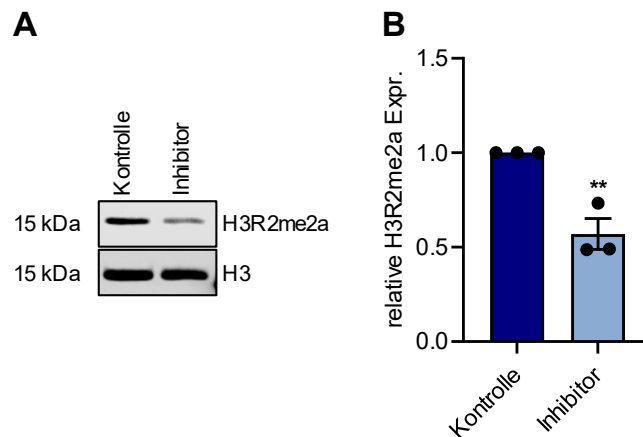


Abbildung A 4: Inhibierung von Prmt6 reduziert H3R2me2a in M2 Zellen

M2 Zellen wurden mit 5 μ M Inhibitor SGC6870 oder dessen inaktive Kontrolle SGC6870N behandelt. Bestätigung der Inhibitoraktivität. Der Western Blot von Histoneextrakten aus Kontroll- und Inhibitor behandelten M2 Zellen nach 72 Stunden Differenzierung wurde mit Antikörpern gegen H3R2me2a und Histon H3 durchgeführt. (A) Der Western Blot wurde mit einem Anti-H3R2me2a Antikörper und einem Anti-Histon H3 Antikörper durchgeführt. Die Inhibitor Behandlung führt zur Reduktion der durch Prmt6 vermittelten Histonmodifikation H3R2me2a. Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot. (B) H3R2me2a wurde aus Western Blots quantifiziert und gegen die Werte von Histon H3 normalisiert. Abgebildet sind die Werte aus drei Bestimmungen von den Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts aus drei unabhängigen Experimenten. Die *P*-Werte wurden mit dem Student's t-Test berechnet. ***P* < 0.002.

8.4 Cofaktoraustausch am *C/EBP α* Promotor in M2 Zellen

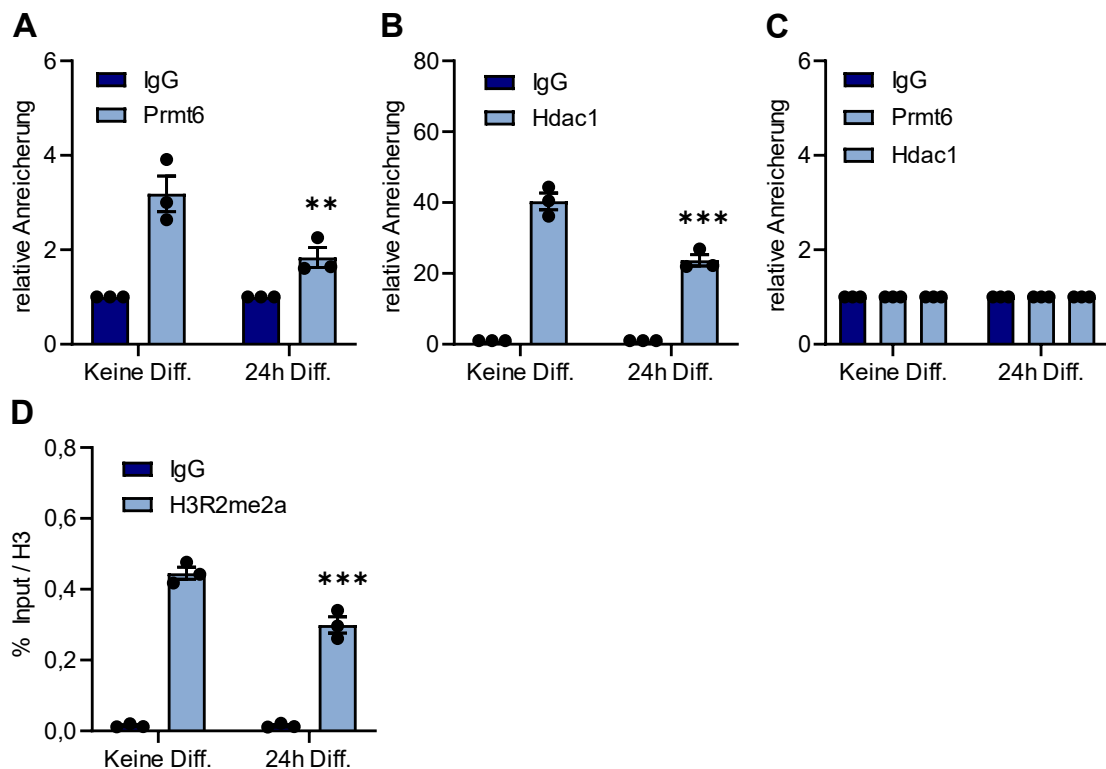


Abbildung A 5: Cofaktoraustausch am *C/ebp α* Promotor in M2 Zellen

Die Transkriptionsfaktorbindung wurde am *C/ebp α* Promotor vor und nach der Induktion der Adipogenese für 24 h untersucht. Nach 24 h konnte eine verringerte Bindung von (A) Prmt6 und (B) Hdac1 an den *C/ebp α* Promotor festgestellt werden. (C) An der Kontrollregion banden weder Prmt6 noch Hdac1. Die Daten sind als relative Anreicherung, die auf IgG normalisiert ist, angegeben. (D) Zudem war 24 h nach der Induktion weniger der Histonmodifikation H3R2me2a am *C/ebp α* Promotor nachweisbar. Die Daten der Histon-ChIP sind als prozentualer Input, der zu einer anti-Histon 3 ChIP normalisiert ist, angegeben. Die qPCR-Werte wurden mit spezifischen Primern gegen den *C/ebp α* Locus ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus dem Mittelwert von drei Experimenten. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. ***P*<0,002, ****P*<0,001.

8.5 Cofaktoraustausch am *PPAR γ* Promotor in ST2 Zellen

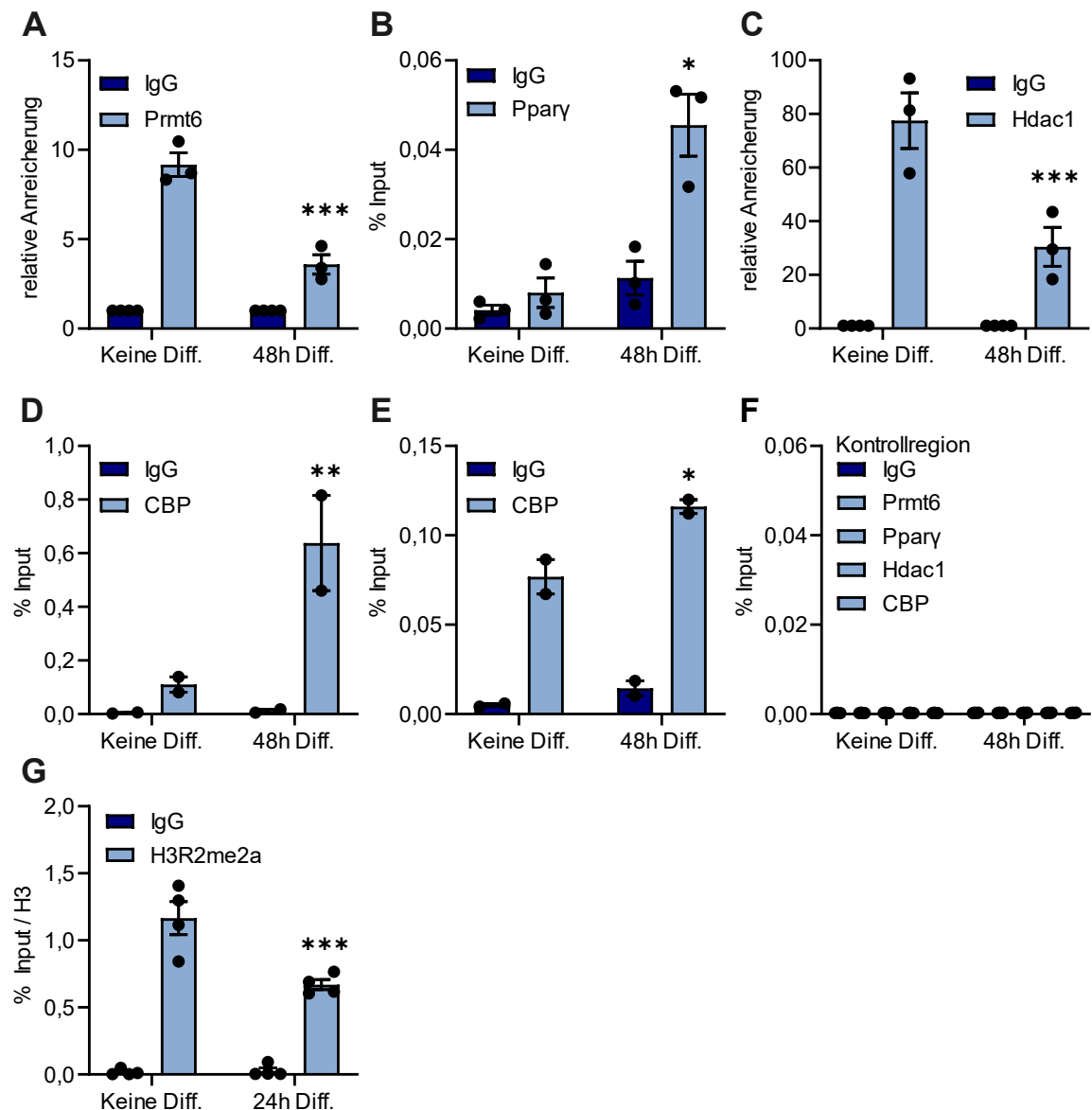


Abbildung A 6: Cofaktoraustausch am *Ppar γ* Promotor in ST2 Zellen

ST2 Zellen wurden für 24 h und 48 h mit Adipozyten-Differenzierungsmedium behandelt. (A) Am *Ppar γ* Promotor band nach Differenzierungsstart weniger Prmt6 an diesen Locus als ohne Differenzierung. (B) Die Bindung von Ppar γ an dessen eigenen Promotor wurde durch die Differenzierung verstärkt. (C) Durch Induktion der Adipogenese band weniger Hdac1 an die Promotorregion von *Ppar γ* . (D) und (E) zeigen die Änderung von CBP am *Ppar γ* Promotor. Da durch verschiedene Chromatinpräparationen und Antikörperchargen die Werte stark schwanken, jedoch die Tendenz in dieselbe Richtung geht, wurden jeweils zwei Wiederholungen in einem Diagramm abgebildet. (F) Keine Bindung der Transkriptionsfaktoren konnte an der Kontrollregion festgestellt werden. (G) Die reprimierende Histonmodifikation H3R2me2 nahm 24 h nach Induktion der Adipogenese am Locus von *Ppar γ* ab. Die qPCR-Werte wurden mit spezifischen Primern gegen den *Ppar γ* Locus ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus dem Mittelwert von mindestens drei Experimenten. Die *P*-Werte wurden mittels ANOVA berechnet. **P*<0,033, ***P*<0,002, ****P*<0,001.

8.6 Verwendete Puffer

Tabelle 27: Zusammensetzung 10x SDS-Laufpuffer

10x SDS-Laufpuffer	Endkonzentration
TRIS-Base	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 %

Tabelle 28: Zusammensetzung 5x SDS-PAGE Auftragspuffer

5x SDS-PAGE Auftragspuffer	Endkonzentration
TRIS-HCl pH 6,8	250 mM
EDTA	10 mM
SDS	5 %
Glycerin	50 %
Bromphenolblau	0,1 %
β-Mercaptoethanol (frisch dazu)	5 %

*Lagerung bei -20°C

Tabelle 29: Zusammensetzung 10x Towbin Puffer

10x Towbin Puffer (Transferpuffer)	Endkonzentration
TRIS-Base	250 mM
Glycin	2 M

Tabelle 30: Zusammensetzung 1x Towbin Puffer

1x Towbin Puffer (Transferpuffer)	Endkonzentration
10x Towbin Puffer (Transferpuffer)	1x
Methanol	20 %

Tabelle 31: Zusammensetzung 10x TBS

10x TBS pH 7,5	Endkonzentration
TRIS-Base	20 mM
NaCl	150 mM

Tabelle 32: Zusammensetzung 1x TBS-T

1x TBS-T	Endkonzentration
10x TBS pH 7,5	1x
Tween 20	0,1 %

Publikationen und Posterpräsentationen

Publikationen

Gerstner M, Heller V, Fechner J, Hermann B, Wang L, Lausen J. Prmt6 represses the pro-adipogenic Ppar-gamma-C/ebp-alpha transcription factor loop. Sci Rep. 2024 Mar 20;14(1):6656. doi: 10.1038/s41598-024-57310-9. PMID: 38509237; PMCID: PMC10954715.

Heller V, Wang L, Schneider E, **Gerstner M**, Bajer L, Decker R, Boenig H, Lausen J. ID3 promotes erythroid differentiation and is repressed by a TAL1/PRMT6 complex. (submitted Juni 2024)

Posterpräsentationen

Gerstner M, Lausen J. (2022) A PPAR γ /PRMT6 corepressor complex regulates adipogenesis. German Stem Cell Network Conference, Münster, Deutschland (Posterpräsentation)

Gerstner M, Lausen J. (2024) A PPAR γ /PRMT6 corepressor complex regulates adipogenesis. SRCSB Day – University of Stuttgart, Deutschland (Posterpräsentation)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen meinen Dank ausdrücken, die mich auf dem Weg der Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Jörn Lausen für die Bereitstellung des Themas, und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, bedanken. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung!

Besonders danken möchte ich Sylvia Weiss für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Vielen, vielen Dank auch für das um die Ohren schlagen von Feiertagen für das Aussäen der Zellen der großen Versuchsansätze.

Außerdem möchte ich mich bei Vivien Heller bedanken, die mich auf unserem gemeinsamen Weg auch immer mit einem guten Rat und lieben Worten begleitet hat. Die Musikauswahl in Labor 4 war hervorragend! Das gemeinsame Arbeiten mit dir war immer sehr bereichernd und mit der musikalischen Untermalung auf einem anderen Level.

Bei meiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die kleineren oder größeren Hilfestellungen, der großartigen Zusammenarbeit und der Diskussionsbereitschaft.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich meinen drei Bachelor Student:innen danken. Vivian Budig, Franziska Gekeler und Benedikt Herrmann – ihr wart eine super Unterstützung durch die Übernahme von Teilprojekten dieser Arbeit.

Des Weiteren Danke ich der *KW45*. Vielen Dank für die Zusprüche und den Support während der Arbeit an der Doktorarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden für das Verständnis, den Zuspruch und die Unterstützung.

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Einfluss der Protein Arginin Methyltransferase 6 auf die Adipogenese“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Stuttgart, 17.06.2024

Mirjam Gerstner