

Entwicklung eines Adipozytenmodells aus  
einer humanen mesenchymalen  
Stammzelllinie und dessen molekulare und  
funktionale Charakterisierung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
des Departments Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Janne Prawitt**

aus Marne

Hamburg

2006

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. K. WIESE  
Tag der Disputation: 14. Juli 2006

Hamburg, den 28. Juni 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	1
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Entwicklung des Fettgewebes.....	3
1.2 Stoffwechsel des Adipozyten.....	8
1.2.1 Energiestoffwechsel.....	8
A. Glukosestoffwechsel.....	9
B. Lipogenese.....	10
C. Lipolyse.....	12
1.2.2 Sekretion von Apolipoproteinen.....	13
1.2.3 Endokrine Funktion.....	14
1.3 Rolle des Adipozyten in der Insulinresistenz.....	17
1.4 Zellmodelle zur Untersuchung des Adipozytenstoffwechsels.....	20
1.5 Fragestellung.....	24
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1 Geräte.....	25
2.2 Chemikalien.....	26
2.3 Verbrauchsmaterial.....	26
2.4 Adipozytäre Differenzierung.....	26
2.4.1 Adipozytäre Differenzierung von hMSC-Tert Zellen.....	27
2.4.2 Adipozytäre Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.....	28
2.4.3 Adipozytäre Differenzierung von primären humanen mesenchymalen Stammzellen.....	28
2.5 Charakterisierung der Zellmorphologie.....	28
2.5.1 Fettrot- und DAPI-Färbung.....	28
2.5.2 Nilrotfärbung.....	29
2.6 Molekulare Charakterisierung des Zellmodells.....	29
2.6.1 Präparation von RNA.....	29
2.6.2 Schreiben von cDNA.....	30
2.6.3 RT-PCR.....	30
2.6.4 Quantitative real time PCR.....	32
2.6.5 Herstellung von Gesamzelllysat.....	33
2.6.6 Herstellung von membranangereicherten Proteinproben.....	33
2.6.7 Herstellung von phosphoryliertem Protein.....	34
2.6.8 Proteinbestimmung im SDS-Lowry.....	35
2.6.9 Triglyzeridbestimmung.....	36
2.6.10 Cholesterolbestimmung.....	36
2.6.11 Phospholipidbestimmung.....	36
2.6.12 SDS-PAGE und Western Blot.....	37
2.7 Funktionale Charakterisierung des Zellmodells.....	38
2.7.1 <sup>3</sup> H-Desoxyglukoseaufnahme.....	38
2.7.2 <sup>125</sup> I-Lipoproteinaufnahme.....	39
2.7.3 Sekretionsmessungen im Zellkulturüberstand.....	40
2.8 Untersuchung des Zellproteoms.....	41
2.8.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	41
2.8.2 Gelpunktverarbeitung und Massenspektrometrie.....	42
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1 Etablierung des Zellsystems.....	44
3.1.1 Entwicklung des Differenzierungsprotokolls.....	44
3.1.2 Darstellung des adipozytären Zellmodells.....	47
3.1.3 Zellmorphologie.....	51
3.1.4 Intrazelluläre Lipidparameter.....	53
3.2 Molekulare Charakterisierung.....	54
3.2.1 Expression von adipozytären Markern und Lipoproteinrezeptoren auf mRNA-Ebene.....	54
3.2.2 Expressionsanalysen auf Proteinebene.....	57

3.3 Funktionale Charakterisierung.....	61
3.3.1 Untersuchungen zur Insulinsensitivität.....	62
3.3.2 Insulinabhängige Glukoseaufnahme.....	65
3.3.3 Lipoproteinaufnahme.....	70
3.3.4 Sekretion von Proteinen.....	73
3.4 Proteomanalyse.....	77
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>80</b>
4.1 Adipozytäre Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	80
4.2 Analyse der adipozytären Expression.....	82
4.3 Funktionalität des humanen Adipozytensystems.....	85
4.4 Bedeutung des Lipoproteinstoffwechsels für den Adipozyten.....	91
4.5 Sekretion von Adipozytokinen.....	93
Zusammenfassung.....	96
Abbildungsverzeichnis.....	97
Literatur.....	98
Anhang.....	117
Danksagung.....	123

## Abkürzungen

2D	zweidimensional
ACC	Acyl-CoA Carboxylase
ADD	Adipocyte Determination and Differentiation Factor
Akt	Proteinkinase B
AMPK	5'-AMP aktivierte Proteinkinase
aP2	Adipocyte Lipid Binding Protein
Apo	Apolipoprotein
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CAP	Cbl-assoziertes Protein
Cbl	zelluläres Homolog des v-Cbl Onkogens
cDNA	copy DNA
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
CM	Chylomikron
CR	Chylomikronenremnant
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIGE	Differential In Gel Electrophoresis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAS	Fettsäuresynthetase
FATP	Fatty Acid Transport Protein
FCS	Fötale Kälberserum
G6P	Glukose-6-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
gp130	Glykoprotein 130 kDa
GSK	Glykogensynthase Kinase
HDL	High Density Lipoprotein
HEK	Human Embryonal Kidney
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HSL	Hormonsensitive Lipase
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF $\kappa$ B
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor Substrat
Jak	Januskinase
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal Kinase
kDa	kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDLR-related Protein
LXR	Liver X Receptor

---

MALDI-ToF	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK Kinase
MES	Morpholino Ethansulfonsäure
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymale Stammzellen
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NADPH	Nicotinamid Adenindinukleotidphosphat
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
p70S6K	p70 S6 Ribosomal Protein Kinase
p90RSK	p90 S6 Ribosomal Protein Kinase
PAT	Perilipin, Adipophilin, TIP47
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDE	Phosphodiesterase
PDK	Phosphatidylinositol-abhängige Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
RAP	Receptor-associated Protein
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S	Svedberg
S6	S6 Ribosomal Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
Tert	Telomerase Reverse Transkriptase
TIP47	Tail Interacting Protein of 47 kDa
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
Tris	tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten
UE	Untereinheit
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDLR	VLDL-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

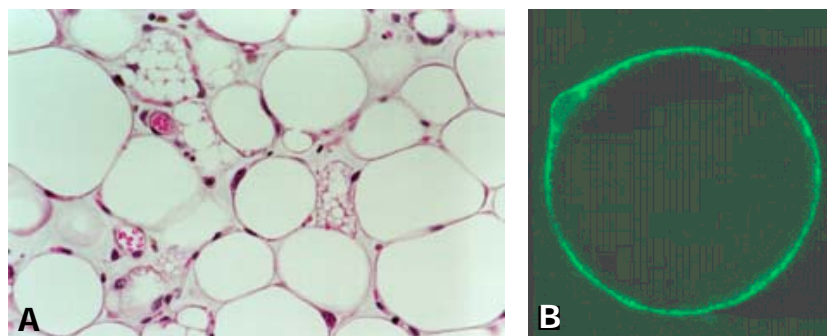
Das Fettgewebe macht bei einem normalgewichtigen Menschen etwa 10-20% des Körpergewichtes aus. Bis zu 95% dieses Gewebes bestehen aus Neutralfetten (Triglyzeriden). Das Baufett dient der Formgebung z. B. in der Wange und dem mechanischen Schutz etwa im Kniegelenk oder an der Fußsohle. Das Speicherfett stellt eine Energiereserve für Zeiten der Nahrungsknappheit dar, um eine kontinuierliche Energieversorgung des Körpers zu gewährleisten. Lange wurde die Aufgabe des Fettgewebes als bloße Speicherfunktion betrachtet. Das zunehmende Auftreten von Erkrankungen des Stoffwechsels, die mit Übergewicht in Verbindung stehen, und die Entdeckung, dass Fettgewebe zahlreiche Hormone synthetisiert, hat das Fettgewebe in den Fokus umfangreicher Untersuchungen gerückt. Viele Studien haben inzwischen gezeigt, dass es kein statisches Gewebe, sondern ein besonders stoffwechselaktives Organ darstellt. Seine Entwicklung und der kontinuierliche Auf- und Abbau seiner Lipidspeicher (Fettspeicher) unterliegen einer fein abgestimmten Regulation. Darüber hinaus ist es an der hormonellen Steuerung des Energiestoffwechsels beteiligt, beeinflusst Empfindungen wie Appetit und Sättigung, nimmt Einfluss auf das Immunsystem und kann bei Störungen in seiner Regulation verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen. Das Fettgewebe wird trotz seiner Aufteilung in verschiedene über den Körper verstreute Depots als ein Organ betrachtet.

## 1.1 Entwicklung des Fettgewebes

Im neugeborenen Menschen gibt es zwei Arten von Fettgewebe. Auf Basis der Histologie wird weißes und braunes Fettgewebe unterschieden. Das braune Fettgewebe erhält seine Färbung durch die hohe Anzahl an Mitochondrien und der darin befindlichen Häm-haltigen Cytochromoxidase, sowie durch eine sehr starke Vaskularisierung (Gefäßbildung). Es unterscheidet sich vom weißen Fettgewebe in der Morphologie, der Entwicklung, dem Stoffwechsel und dem sehr begrenzten Vorkommen. Seine Eigenart besteht darin, die gespeicherten Fette aufzuspalten (hydrolysieren) und die freiwerdenden Fettsäuren im eigenen Mitochondrium zu oxidieren. Die dabei anfallende Energie wird über ein spezifisch exprimiertes Protein in der Mitochondrienmembran, das Uncoupling Protein 1, in Wärme umgesetzt. Diese Thermogenese dient dem Neugeborenen zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Neben allen neugeborenen Säugern besitzen vor allem kleinere kälteadaptierte Säugetiere und Winterschläfer vermehrt braunes Fettgewebe. Da es im adulten Menschen unter normalen Lebensumständen keine maßgebliche Rolle spielt [Übersicht von Cannon und Nedergaard 2003, Übersicht von Leppäluoto et al. 2005], wird es in der weiteren Arbeit ausschließlich um weißes Fettgewebe gehen, welches der Einfachheit halber schlicht als Fettgewebe bezeichnet wird.

Das Fettgewebe ist im Körper auf verschiedene Depots verteilt. Das Unterhautfett (subkutan) kann sich in unterschiedlichen Regionen des Körpers verstärkt ausprägen, etwa femoral – im Bereich des Oberschenkels – oder gluteal – in der Region des Gesäßes. Im Bauchraum liegt das Fettgewebe viszeral um die Eingeweide und omental auf den Netzen der Bauchfellfalte. Weitere Speicher befinden sich u. a. um den Nebenhoden (epididymal), in der Leistenregion (inguinal) und um die Nieren (perirenal).

Das Fettgewebe besteht nur etwa zur Hälfte aus Fettzellen, den Adipozyten. Der restliche zelluläre Bestandteil setzt sich aus Bindegewebszellen (Fibroblasten), adipozytären Vorläuferzellen (Präadipozyten), Immunzellen (hier speziell Makrophagen) sowie Endothel- (Gefäßwand) und Blutzellen zusammen. Eine Entwicklung von Adipozyten aus Vorläuferzellen durch Differenzierung ist zu jedem Lebenszeitpunkt möglich [Hauer et al. 1989]. Für die Festlegung einer definierten Anzahl von Fettzellen im Kindesalter, wie ursprünglich postuliert, gibt es keine stichhaltigen Nachweise [Übersicht von Ailhaud und Hauer 1998, Salans et al. 1973]. Bei einer längerfristig erhöhten Nährstoffzufuhr tritt neben der Größenzunahme (Hypertrophie) vorhandener Fettzellen auch ein Anstieg der Fettzellanzahl (Hyperplasie) ein [Hirsch und Batchelor 1976]. Bei wieder sinkendem Nahrungsangebot geht zwar die Fettzellgröße zurück, die Fettzellzahl wird jedoch kaum reduziert, der Prozess ist also nur in eingeschränktem Maße reversibel [Ginsberg-Fellner und Knittle 1981]. Folglich spielt die Ernährung eine kritische Rolle für den „Füllstatus“ der Fettzelle und das Ausmaß des Fettgewebes.



### Abbildung 1: Morphologie primärer weißer Adipozyten

Die typische Morphologie weißer Adipozyten ist durch eine große zentrale Fettvakuole gekennzeichnet. Dieser Zustand nennt sich unifokal oder monolokulär. Das Zytoplasma umschließt als dünner Saum die Vakuole und enthält den sehr kleinen Zellkern. Dieser wird durch den Lipidvesikel an die Peripherie gedrängt, weswegen diese Zellform auch als Siegelring-Form bezeichnet wird. A histologischer Schnitt von weißem Fettgewebe, B Adipozyt *in vitro*, bei dem der Glukosetransporter GLUT4 in der Zellmembran grün-fluoreszierend angefärbt ist. Quelle: A World Wide Web, B Löffler, Pertrides ©H.Shibata, The Biochemical Society

Adipozyten entstehen durch Differenzierung aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen, genauso wie die Zellen von Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskel, Endothelien und Blut. Der erste Entwicklungsschritt ist die Festlegung der Zelle auf eine adipozytäre

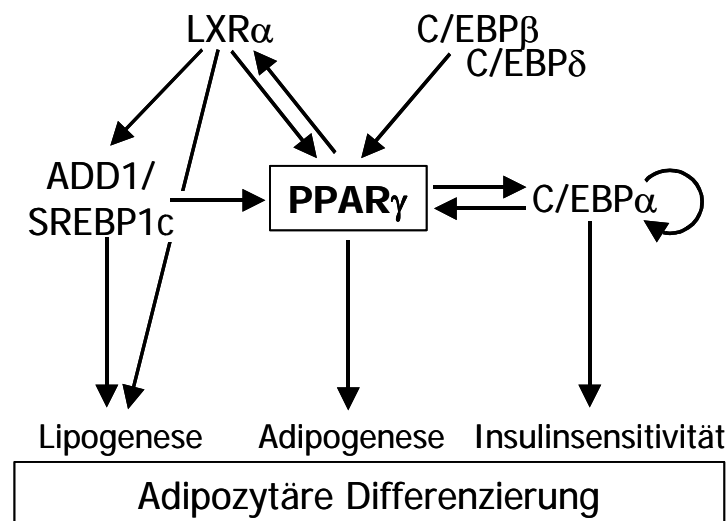


Abstammung (Determination), womit die Differenzierung in Zellen anderer Linien z. B. Knochen oder Muskel ausgeschlossen wird. Dabei entsteht als frühe Vorläuferzelle der Adipoblast. Dieser entwickelt sich zu einem noch teilungsfähigen (proliferierenden) Präadipozyten, der ein ihm eigenes Muster funktioneller Proteine exprimiert. Vor allem sind das verschiedene Transkriptionsfaktoren, die die Expression adipozytenspezifischer Gene steuern. In der Folge prägt die Zelle einen charakteristischen adipozytären Stoffwechsel aus, der zur sukzessiven Akkumulation von Lipiden führt. Dieser Prozess wird als terminale Differenzierung bezeichnet. Dabei bildet sich die typische Morphologie eines Adipozyten aus, dessen Zytoplasma fast vollständig von einer großen Lipidvakuole eingenommen wird. Das verbleibende Zytoplasma ist auf einen schmalen Saum reduziert, in dem der an die Zellperipherie gedrängte Kern liegt (Abbildung 1). Diese Morphologie wird als monolokulär oder unifokal bezeichnet.

Die Komplexität der adipogenen Differenzierung erschwert die Untersuchung ihrer molekularen Mechanismen *in vivo*. *In vitro* sind zahlreiche Aspekte der Adipogenese vor allem in murinen (Maus-) Zellmodellen untersucht worden. Auf der Basis dieser Studien lässt sich ein bereits sehr detailliertes Bild vom Netzwerk der beteiligten Regulatoren zusammensetzen. Auf molekularer Ebene stellt die Differenzierung eine Verschiebung des Genexpressionsmusters der Zelle dar. Die Genexpression wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren streng reguliert, die die Transkription derjenigen Gene gewährleisten, die zur Ausprägung des adipozytären Phänotyps führen. Die kaskadenartig ablaufende Änderung der Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren bestimmt so die Differenzierung [Übersicht von Rosen et al. 2000]. Das transkriptionelle Netzwerk ist in der Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Worin sich die Initiation der Adipogenese molekular manifestiert, ist nicht bekannt [Übersicht von Rosen et al. 2000]. Die CCAAT/Enhancer Binding Proteine (C/EBP) treten im Ablauf der Differenzierung als erstes in Erscheinung. Aus dieser Familie DNA-bindender Leucine-Zipper Proteine werden C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  im präadipozytären Stadium für einen begrenzten Zeitraum exprimiert. Ein hoher cAMP-Spiegel in der Zelle kann dabei die Expression von C/EBP $\beta$  induzieren, das ein cAMP Response Element in seinem Promotor trägt [Reusch et al. 2000, Zhang JW et al. 2004]. Zusammen leiten C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  über einen direkten transkriptionellen Effekt die Expression des Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)  $\gamma$  ein. Dieser nukleäre Hormonrezeptor kommt in der Isoform PPAR $\gamma_2$  fast ausschließlich im Fettgewebe vor und gilt als der Hauptregulator der Adipogenese [Tontonoz et al. 1994a, Tontonoz et al. 1994b]. PPAR $\gamma$  wird durch die Bindung spezifischer Liganden aktiviert. Als mögliche endogene Liganden sind langkettige ungesättigte Fettsäuren [Bocos et al. 1995, Krey et al. 1997], deren oxidierte Metabolite wie 9- oder 13-Hydroxyoktadecadiensäure [Nagy et al. 1998] sowie Eicosanoide und ihre Derivate, z. B. das 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> [Forman et al. 1995, Kliewer et al. 1995], vorgeschlagen worden. Allerdings konnte *in vivo* die Bindung dieser prinzipiell

endogen vorkommenden Verbindungen noch nicht beschrieben werden. Die Thiazolidinedione, z. B. das Rosiglitazon, sind pharmakologische Agonisten von PPAR $\gamma$  und werden als insulinsensitivierende Substanzen in der Therapie von Diabetes Typ II eingesetzt [Übersicht von Spiegelman 1998, Lehmann et al. 1995]. Während der Adipogenese aktiviert PPAR $\gamma$  die Expression von C/EBP $\alpha$ . Dieser Transkriptionsfaktor besitzt selber ein C/EBP Response Element und unterliegt zusätzlich zur Induktion durch PPAR $\gamma$  einer Autoaktivierung. Außerdem wirkt er seinerseits aktivierend auf die PPAR $\gamma$ -Expression zurück, so dass die beiden Transkriptionsfaktoren ihre Expression gegenseitig verstärken. Demnach treibt sich die transkriptionelle Kaskade selber an, sobald sie einmal initiiert wurde. Die Expression von PPAR $\gamma$  wird durch einen weiteren Transkriptionsfaktor, den Adipocyte Determination and Differentiation Factor (ADD) 1, auch als Sterol Element Binding Protein (SREBP) 1c bezeichnet, stimuliert [Fajas et al. 1999]. SREBP1c induziert vor allem lipogene Enzyme. Auf diese Weise stellt es Liganden noch nicht bekannter Natur für PPAR $\gamma$  bereit und sorgt auf einem zweiten Weg für dessen Aktivierung [Kim et al. 1998a]. Ein dritter Effektor der PPAR $\gamma$ -Expression ist der ligandenabhängige nukleäre Hormonrezeptor Liver X Receptor (LXR). Dieser verstärkt die Expression sowohl von PPAR $\gamma$  als auch SREBP1c [Seo et al. 2004].



### Abbildung 2: Transkriptionelle Regulation der Differenzierung

An der Regulation der adipozytären Differenzierung ist ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Zentraler Regulator ist PPAR $\gamma$ , das maßgeblich die Adipogenese auslöst. C/EBP $\alpha$  ist vor allem für die Ausprägung der Insulinsensitivität des Adipozyten verantwortlich. ADD1/SREBP1c wirkt von sich aus nicht adipogen, unterstützt aber durch die Induktion lipogener Enzyme entscheidend die Ausprägung des adipozytären Phänotyps. Die detaillierte Beschreibung der Zusammenhänge findet sich im Text. Die Abbildung wurde adaptiert nach Seo et al. 2004 und Rosen et al. 2002.

Die Aktivierung von SREBP1c ist für die Adipogenese notwendig, allerdings hat der Transkriptionsfaktor alleine keine starke adipogene Wirkung. Im Gegensatz dazu kann die Aktivierung von PPAR $\gamma$  alleine zur Ausbildung einer reifen Fettzelle mit veränderter

Morphologie, Lipidanreicherung und der Ausprägung von Insulinsensitivität führen. Da die vermuteten endogenen Liganden für den Transkriptionsfaktor alle aus Lipiden entstehen, nimmt die Zusammensetzung der zugeführten und im Fettgewebe gespeicherten Nahrungslipide großen Einfluss auf die Differenzierung. Die Coexpression von PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  *in vitro* kann sogar die Transdifferenzierung von Myoblasten (Muskelvorläuferzellen) zu Adipozyten bewirken [Hu et al. 1995]. Die Zweige der Transkriptionskaskade laufen in der Aktivierung von PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  zusammen. Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind für die Expression des Großteils der adipozytären Gene verantwortlich, die oft ein Response Element sowohl für C/EBP $\alpha$  als auch für PPAR $\gamma$  besitzen. Dabei wird PPAR $\gamma$  als der Haupteffektor der Adipogenese betrachtet, während die Aufgabe von C/EBP $\alpha$  vornehmlich in der Unterstützung der PPAR $\gamma$ -Expression und der vollen Ausprägung der Insulinsensitivität der Zelle gesehen wird [Rosen et al. 2002]. C/EBP $\alpha$  knockout Adipozyten zeigen keinen insulinabhängigen Glukosetransport, sowie eine reduzierte Expression von Insulinrezeptor und Insulinrezeptor Substrat (IRS) 1 und deren verringerte Aktivierung [Wu et al. 1999]. Unter den Zielgenen der beiden Transkriptionsfaktoren sind Proteine des Fettsäure-, Lipid- und Glukosestoffwechsels. SREBP1c reguliert v. a. lipogene Enzyme. Eine Auflistung der wichtigsten Proteine und der Transkriptionsfaktoren, die ihre Expression regulieren, findet sich in Tabelle 1. Eine terminal ausdifferenzierte Zelle ist folglich mit den Proteinen ausgestattet, die es zur Erfüllung seiner Stoffwechselfunktion und zur Reaktion auf hormonelle Stimuli benötigt.

Protein		Regulator	Referenz
Phosphoenolpyruvat Carboxykinase	PEPCK	PPAR $\gamma$	Tontonoz 1995
Acyl-CoA Synthetase	ACS	PPAR $\gamma$	Schoonjans 1995
Fatty Acid Transport Protein	FATP	PPAR $\gamma$	Martin 1997
Apolipoprotein E	ApoE	PPAR $\gamma$	Yue 2004
LDLR-related Protein 1	LRP1	PPAR $\gamma$	Gauthier 2003
Perilipin		PPAR $\gamma$	Arimura 2004
Adiponektin		PPAR $\gamma$	Maeda 2001, Combs 2002
Adipocyte Lipid Binding Protein	aP2	PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$	Tontonoz 1994a, Lin 1994
Glukosetransporter 4	GLUT4	PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$	Armoni 2003, Lin 1994
Lipoproteinlipase	LPL	PPAR $\gamma$ , SREBP1c	Lefebvre 1997, Kim 1996
Leptin		C/EBP $\alpha$ , SREBP1c	Hwang 1996, Kim 98b
Stearoyl-CoA Desaturase 1/2	SCD1/2	C/EBP $\alpha$ , SREBP1c	MacDougald 1995, Tabor 1999
Fettsäuresynthase	FAS	SREBP1c	Tontonoz 1993, Kim 1996
Glycerol-3-phosphat Acyltransferase	GPAT	SREBP1c	Ericsson 97

**Tabelle 1: Übersicht wichtiger adipogener Transkriptionsfaktoren und ihrer Zielgene**

## 1.2 Stoffwechsel des Adipozyten

Der Stoffwechsel des Fettgewebes ist sehr stark abhängig von den jeweiligen Ernährungsgewohnheiten – das heißt von der Menge und Zusammensetzung der zugeführten Nahrung sowie der dadurch bedingten Größe der Fettmasse –, von hormonellen Einflüssen und individuellen genetischen Prädispositionen. Darüber hinaus können Abweichungen im Verhalten von Fettzellen geschlechtsspezifische oder depot-spezifische Ursachen haben. Die Untersuchung dieser Unterschiede und ihrer molekularen Mechanismen steckt noch in den Anfängen.

### 1.2.1 Energiestoffwechsel

Die Grundfunktion des Fettgewebes ist die Speicherung von Nährstoffen, die mit einer Mahlzeit im Überfluss zugeführt werden. Bei Nahrungskarenz wird diese Reserve zur Energieversorgung des Körpers wieder mobilisiert. Diese gegensätzlichen Abläufe des anabolen (aufbauenden) und katabolen (abbauenden) Stoffwechsels bilden ein über Hormone hoch reguliertes System. Nach Einnahme einer Mahlzeit, in der postprandialen Phase, ist der wichtigste Regulator das Hormon Insulin, welches stimuliert durch den Anstieg des Blutzuckers von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas ausgeschüttet wird. Gegenspieler des Insulins sind im Zustand des Fastens (präprandial) das Hormon Glukagon, welches hauptsächlich den Stoffwechsel der Leber reguliert, und die Hormone Adrenalin und Noradrenalin.

Postprandial werden nicht nur Kohlenhydrate, sondern auch Nahrungslipide aufgenommen. Diese werden im Dünndarm durch die pankreatische Lipase verdaut und in Form von Fettsäuren und  $C_2$ -Monoacylglycerolen aufgenommen. Kurze Fettsäuren gelangen frei in die Blutbahn, mittelkettige und längere Fettsäuren können an Albumin gebunden transportiert werden. Der Großteil der Nahrungslipide wird jedoch in der Mucosazelle des Darms (Enterozyt) zu Triglyzeriden revereestert und zu Lipoproteinen zusammengesetzt, die als Strukturprotein das Apolipoprotein  $B_{48}$  tragen. Diese so genannten Chylomikronen gelangen über das Lymphsystem und den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf, erreichen also unter Umgehung der Leber direkt die Peripherie, z. B. Skelettmuskulatur oder Fettgewebe. Dort spaltet die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) hydrolytisch Fettsäuren aus den Triglyzerid-reichen Partikeln und baut diese zu Chylomikronenremnants ab. LPL wird im Muskel und im Fettgewebe synthetisiert und sekretiert. Im Adipozyten wird ihre Expression postprandial durch Insulin induziert, im Muskel erfolgt die Regulation genau entgegengesetzt, dort wird die Expression postprandial unterdrückt [Übersicht von Mead et al. 2002, Picard et al. 1999, Ladu et al. 1991]. An den entstehenden Chylomikronenremnants verbleibt eine inaktive Form der LPL [Heeren et al. 2002], weiterhin erhalten sie während ihrer Zirkulation im Blut von den High Density Lipoproteinen (HDL) als weiteres Strukturprotein das Apolipoprotein E

(ApoE) [Imaizumi et al. 1978, van't Hooft und Havel 1981]. Die so ausgestatteten Chylomikronenremnants werden hauptsächlich in die Leber aufgenommen. Dieser Transport geschieht über das LDL Receptor-related Protein (LRP) 1 der Leber, an das sowohl ApoE als auch inaktive LPL binden [Beisiegel et al. 1989, Beisiegel et al. 1991, Hussain et al. 1991]. In der Leber werden die in den Remnants verbliebenen Lipide mit endogen synthetisierten Triglyzeriden in Very Low Density Lipoproteins (VLDL) verpackt, die ausgestattet mit dem Strukturprotein Apolipoprotein B<sub>100</sub> ebenfalls in der Peripherie durch LPL hydrolysiert werden. Dabei entstehen sukzessive Intermediate Density Lipoproteins (IDL) und Low Density Lipoproteins (LDL), die durch den sinkenden Triglyzeridgehalt relativ mit Cholesterol angereichert werden. Die LDL werden vermittelt durch den LDL-Rezeptor (LDLR) aufgenommen und dienen der Versorgung von Körperzellen mit Cholesterol z. B. für den Aufbau von Membranen oder die Synthese von Steroidhormonen [Übersicht von Brown and Goldstein 1986].

### **A. Glukosestoffwechsel**

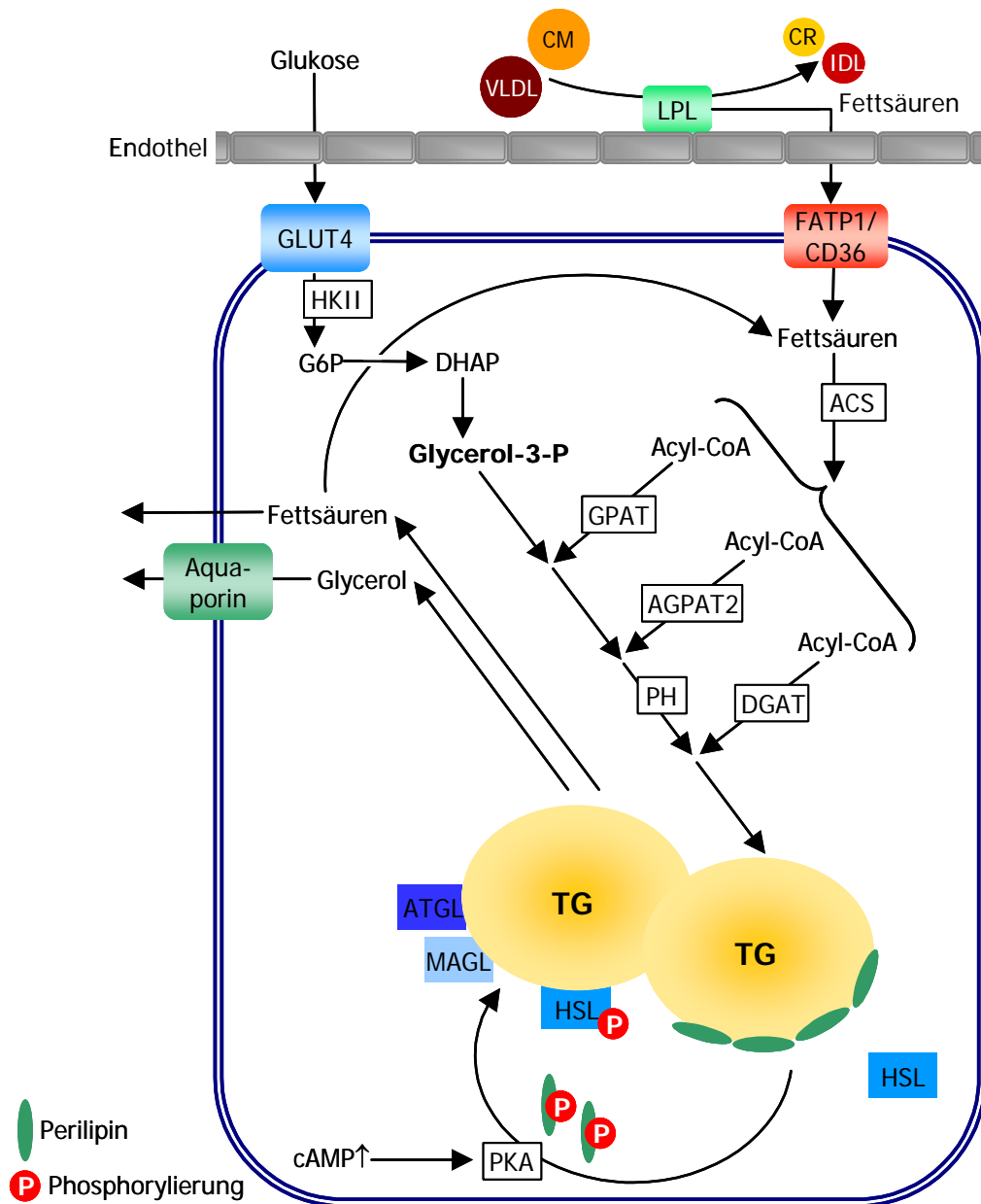
Die postprandiale Phase ist durch hohe Blutglukosewerte gekennzeichnet. Neben anderen Organen nimmt das Fettgewebe Glukose aus dem Blut auf. Dies dient der eigenen Energieversorgung, der Bereitstellung von Bausteinen für die Triglyzeridsynthese und leistet einen Beitrag zur Senkung der angeschwemmten Blutglukose zurück auf den physiologischen Sollwert. Die Entfernung der Glukose aus dem Blut ist ein schnell ablaufender Prozess und wird durch Insulin vermittelt. Ein Adipozyt exprimiert zwei Arten von Glukosetransportern. Der GLUT1 sorgt mit einer geringeren Affinität für Glukose hauptsächlich für den basalen, insulinunabhängigen Glukosetransport. Der GLUT4 dagegen ist hochspezifisch für Glukose und vermittelt die insulinabhängige Aufnahme [Übersicht von Wood und Trayhurn 2003]. Präprandial befindet sich dieser Transporter großteils in intrazellulären Vesikeln. Der postprandiale Insulinreiz bewirkt eine Translokation des GLUT4 an die Plasmamembran der Zelle. Dieser Prozess wird über zwei Signalwege gesteuert, die Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase (PI3K) unter Beteiligung von Akt (Proteinkinase B) oder den atypischen Proteinkinasen C (PKC)  $\lambda/\zeta$  [Standaert et al. 1997] und die CAP-Cbl Signalkaskade [Ribon und Saltiel 1997] einschließlich des G-Proteins TC10. In der Folge erhöht sich die Anzahl der GLUT4-Transporter an der Zelloberfläche und die Glukose wird mit hoher Effektivität aufgenommen [Übersicht von Ishiki und Klip 2005]. Intrazellulär sorgt die Hexokinase II für die schnelle Umsetzung zu Glukose-6-phosphat (G6P) und erhält so den Konzentrationsgradienten aufrecht, der den Glukosetransport in die Zelle antreibt. Das G6P kann dem Abbau in der Glykolyse oder dem Pentosephosphatweg zugeführt werden. Durch die Glykolyse wird einerseits der zelleigene Energiebedarf gedeckt. Andererseits wird das intermediär entstehende Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerol-3-phosphat reduziert, welches für die Triglyzeridbiosynthese benötigt wird. Aktiviertes Glycerol kann nur über diesen Weg

bereitgestellt werden, da die Glycerokinase-Aktivität der Fettzelle verschwindend gering ist [Ryall and Goldrick 1977]. Insulin beschleunigt durch die Induktion der Hexokinase II [Printz et al. 1993] den Ablauf der Glykolyse. Der oxidative Abbau von Glukose über den Pentosephosphatweg dient der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NADPH/H<sup>⊕</sup>) für die Fettsäurebiosynthese. Der Lipid- und der Kohlenhydratstoffwechsel stehen im Fettgewebe also in engem Zusammenhang (siehe Abbildung 3).

## B. Lipogenese

Die im Endothel durch Hydrolyse der Triglyzerid-reichen Lipoproteine freiwerdenden Fettsäuren werden schnell vom Fettgewebe aufgenommen. Wahrscheinlich geschieht dies anteilig über passive Diffusion und über spezifische Transportproteine, Fatty Acid Transport Protein (FATP) 1 oder CD36 (auch Fatty Acid Translokase) [Übersicht von Kalant und Cianflone 2004]. Ein schnelles Verstoffwechseln der Fettsäuren im Adipozyten unterhält den für die Aufnahme notwendigen Konzentrationsgradienten. Da freie Fettsäuren in der Zelle ein hohes lipotoxisches Potential haben – längere Fettsäuren wirken darüber hinaus auf zelluläre Membranen wie ein Detergenz [Strålfors 1990] – wird der intrazelluläre Gehalt freier Fettsäuren streng reguliert. Nach dem Eintritt in die Zelle werden diese sofort an das zytosolische Adipocyte Lipid Binding Protein (aP2) gebunden und ihrem Zielort zugeführt. Der Großteil der Fettsäuren wird über die Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA aktiviert und mit dem aus der Glykolyse stammenden Glycerol-3-phosphat in der Lipogenese zu Triglyzeriden reverestert. Dabei wird in einem mehrstufigen Prozess aus drei Fettsäuren und einem Glycerol-3-phosphat ein Triglyzerid gebildet (genauer Ablauf siehe Abbildung 3). Die entstehenden Triglyzeride werden in speziellen Depots, den Lipidvesikeln (Lipid Droplets) gespeichert. Diese sind von einem funktionellen Proteinkomplex umgeben, der aus einer Vielzahl verschiedener Proteine besteht. Der Hauptteil wird durch Proteine der PAT-Familie (Perilipin, Adipophilin, TIP47 - Familie) dargestellt, vor allem durch Perilipin A [Mooney 1991, Greenberg et al. 1991]. Diese Hülle dient dem Schutz der gespeicherten Triglyzeride vor dem Abbau durch zelluläre Lipasen [Brasaemle et al. 2000]. Die genaue Regulation des Stoffwechsels der Lipid Droplets ist erst in Ansätzen untersucht.

Ein Adipozyt exprimiert die für die Eigensynthese von Fettsäuren benötigten Enzyme. *In vivo* ist jedoch die Menge der mit der Nahrung aufgenommenen Fettsäuren in freier und lipidgebundener Form so hoch, dass im Menschen eine endogene Biosynthese weder in der Leber noch im Fettgewebe stattfindet [Goldrick 1967]. Der relativ große Anteil zugeführter mehrfach ungesättigter Fettsäuren übt eine repressive Wirkung auf die Genexpression dieser Enzyme (Acetyl-CoA Carboxylase, FAS) aus [Übersicht von Clarke 2004], die den induzierenden Effekt von Insulin auf ihre Expression übersteigt. Nur unter extremen Ernährungsbedingungen, z. B. durch eine fast ausschließlich Kohlenhydrat-enhaltende Diät, werden endogen Fettsäuren hergestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von Lipogenese und Lipolyse im Adipozyten**

Fettsäuren und Glukose werden wie im Text dargestellt in den Adipozyten aufgenommen. Beide dienen der Synthese von Triglyceriden (TG) in der Lipogenese. Im ersten Schritt bindet die Glycerol-3-phosphat Acyltransferase (GPAT) eine erste aktivierte Fettsäure (Acyl-CoA) an die C<sub>1</sub>-Position des Glycerol-3-phosphats (Glycerol-3-P). So entsteht Lysophosphatinsäure. Im zweiten Schritt verestert die Acylglycerol-3-phosphat Acyltransferase 2 (AGPAT2) ein weiteres Acyl-CoA an der C<sub>2</sub>-Position und bildet so Phosphatinsäure. Aus dieser wird mittels Phosphatidat-Phosphohydrolase (PH) die Phosphatgruppe entfernt und im letzten Schritt durch die Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) ein letztes Acyl-CoA an der C<sub>3</sub>-Position des Diacylglycerols verestert. Das gebildete Triacylglycerin wird im Lipid Droplet gespeichert. Die Mechanismen der Lipolyse sind im Text beschrieben. ACS Acyl-CoA Synthetase, ATGL Adipocyte Triglyceride Lipase, CD36 Fatty Acid Translokase, CM Chylomikron, CR Chylomikronenremnant, DHAP Dihydroxyacetonphosphat, FATP1 Fatty Acid Transport Protein 1, G6P Glukose-6-phosphat, GLUT4 Glukosetransporter 4, HKII Hexokinase II, HSL Hormonsensitive Lipase, IDL Intermediate Density Lipoprotein, LPL Lipoproteinlipase, MAGL Monoacylglycerol Lipase, PKA cAMP-abhängige Proteinkinase A, VLDL Very Low Density Lipoprotein. Die Abbildung wurde adaptiert nach Löffler, Petrides 2003.

Postprandial wird die Aktivierung der Lipogenese maßgeblich durch Insulin vermittelt. Dieser Effekt überschneidet sich in weiten Teilen mit der inhibierenden Wirkung des Hormons auf die Lipolyse. Die Insulinwirkung kann auf cAMP-abhängige oder -unabhängige Mechanismen zurückgeführt werden. Vermittelt durch den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert Insulin die Phosphodiesterase (PDE) 3B und senkt so den cAMP-Spiegel der Zelle [Kitamura et al. 1999]. Gleichzeitig aktiviert Insulin cAMP-unabhängig bestimmte Proteinphosphatasen [Strålfors und Honnor 1989]. Beide Prozesse bewirken eine Abnahme des Phosphorylierungsstatus bestimmter Proteine, entweder durch direkte Dephosphorylierung oder durch eine verminderte Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Bezüglich der Lipogenese bewirkt dies eine Stabilisierung von Perilipin am Lipid Droplet und eine Hemmung lipolytischer Enzyme (s. u.). Enzyme der Fettsäuresynthese dagegen werden aktiviert (Acyl-CoA Carboxylase und FAS) [Halestrap et al. 1973, Witters und Kemp 1992]. Weiterhin reduziert Insulin die Menge der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren an der Zelloberfläche und desensitiviert sie so gegenüber lipolytischen Stimuli.

### C. Lipolyse

Ein Fehlen des Insulinstimulus zeichnet die präprandiale Phase der Nahrungskarenz aus. In dieser Situation wird die Lipolyse aktiviert, um die gespeicherten Fettsäuren zur Versorgung des Körpers zu mobilisieren. Im Muskel wird die Expression von LPL induziert, was zu einer erhöhten Aufnahme von Fettsäuren führt. Viele Organe können aus der Oxidation von Fettsäuren ihren Energiebedarf decken z. B. die Skelett- und Herzmuskulatur, die Nierenrinde und die Leber. Die Leber verwertet das Acetyl-CoA aus dem Fettsäureabbau für die Synthese von Ketonkörpern, die ebenfalls als Energiequelle dienen. Für die obligat Glukose-verbrauchenden Zellen wie Nerven, Erythrozyten und Nierenmark stellt die Leber mittels der Glukoneogenese Glukose bereit. Auch eine Stressreaktion kann die Aktivierung der Lipolyse verursachen. Dabei vermittelt die Ausschüttung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen im Fettgewebe schnelle Reaktionen, während längerfristige Antworten auf Stressreize über die Freisetzung von Adrenalin aus der Nebennierenrinde erreicht werden.

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin binden beide an die  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren des Adipozyten. Dieses Signal aktiviert die Adenylatzyklase, die daraufhin cAMP synthetisiert. Der steigende cAMP-Spiegel in der Zelle kann ebenfalls durch eine Abnahme der Insulinwirkung, insbesondere die Aufhebung der PDE-Aktivierung, sowie durch das Hormon Glukagon erreicht werden. Glukagon ist ein Insulinantagonist, der bei Hunger aus den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas ausgeschüttet wird. Sein Hauptwirkort ist die Leber, wo es durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Glukagonrezeptoren die Adenylatzyklase aktiviert. Humane Adipozyten besitzen ebenfalls Glukagonrezeptoren [Merida et al. 1993], so dass eine Wirkung des Hormons auf das Fettgewebe möglich ist.



Der über verschiedene Reize verursachte intrazelluläre Anstieg des cAMP bewirkt eine Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA, die sowohl das an der Oberfläche der Lipidvesikel sitzende Perilipin A als auch die zytosolisch vorliegende hormonsensitive Lipase (HSL) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu einer Freigabe des Lipid Droplet durch Perilipin A für die durch die Phosphorylierung aktivierte HSL. Diese transloziert an die Oberfläche des Lipidvesikels und hat somit Zugang zu ihrem Substrat [Clifford et al. 2000]. Wahrscheinlich wird das sehr hydrophobe Perilipin nicht ins Zytosol verlagert, sondern an kleinere Lipidvesikel verschoben [Marcinkiewicz et al. 2006]. Prinzipiell hydrolysiert HSL sowohl Tri-, Di- und Monoacylglycerine als auch Cholesterolester [Fredrikson et al. 1981]. Im Adipozyten sind die vorwiegenden Substrate Triacylglycerine. Hier hydrolysiert HSL vorzugsweise die Fettsäuren an den Positionen C<sub>1</sub> und C<sub>3</sub> und überlässt die Hydrolyse der C<sub>2</sub>-Fettsäure der Monoacylglycerol Lipase [Fredrikson et al. 1986]. Die lipolytische Aktivität von HSL kann durch die Bindung an aP2 erhöht werden [Shen et al. 2001]. Dieser Prozess ist abhängig davon, ob Fettsäuren an den Proteinkomplex gebunden sind [Jenkins-Kruchten et al. 2003]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass aP2 die freiwerdenden Fettsäuren aus der Lipolyse direkt übernimmt und ihrem Zielort zuführt. Im humanen Adipozyten ist eine weitere Lipase, die Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), beschrieben worden. Dieses Enzym ist hochspezifisch für sein Substrat, befindet sich am Lipid Droplet und katalysiert den initialen Schritt der Lipolyse [Zimmermann et al. 2004]. Die ATGL-knockout Maus leidet unter Herzdysfunktion in Folge ektopischer Triglyzeridspeicherung, ist mangelhaft kalteadaptiert und zeigt eine erhöhte Insulinsensitivität. Das lässt eine Rolle der ATGL in der Regulation der Energiehomöostase vermuten [Haemmerle et al. 2006]. Möglicherweise sind weitere noch unbekannte Enzyme an der Lipolyse beteiligt. Die durch die Lipolyse freigesetzten Fettsäuren werden entweder reverestert oder in die Blutbahn ausgeschüttet. Da das Fettgewebe praktisch die einzige Quelle für Plasmafettsäuren ist, bedingt die Fettsäurekonzentration im Zytosol des Adipozyten automatisch den Gehalt freier Fettsäuren im Blut. Das Glycerol kann im Adipozyten nicht wieder aktiviert werden (s. o.), wird über den Aquaporin-Transporter ausgeschleust [Kishida et al. 2000] und in die Leber transportiert (Überblick siehe Abbildung 3).

Tatsächlich sind die Lipogenese und die Lipolyse in der Fettzelle nicht zwei getrennt, sondern parallel ablaufende Prozesse. Viele der freigesetzten Fettsäuren werden sofort wieder in der Lipogenese reverestert. Die Dynamik dieses Systems ermöglicht eine schnelle und feine Anpassung der Zelle an die Bedürfnisse des Organismus, indem das Gleichgewicht in die erwünschte Richtung verschoben wird.

### 1.2.2 Sekretion von Apolipoproteinen

Das Fettgewebe als größter Triglyzeridspeicher des Körpers synthetisiert und sekretiert verschiedene Apolipoproteine. Das ApoE, ein 35 kDa großes Glykoprotein, ist

hauptsächlich als Strukturelement von Lipoproteinen und als Ligand von Lipoproteinrezeptoren ein Begriff. Es wird in verschiedenen Geweben in starker Abhängigkeit von Faktoren wie Zellentwicklung und Hormoneinwirkung synthetisiert. In differenzierenden Adipozyten ist eine zunehmende Expression von ApoE in Abhängigkeit vom steigenden Lipidgehalt der Zelle beschrieben. Diese kann durch eine Cholesterobeladung der Zellen noch weiter erhöht werden [Zechner et al. 1991]. Die lipidinduzierte, aber nicht die basale Expression wird in Adipozyten durch die Transkriptionsfaktoren LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  reguliert [Laffitte et al. 2001]. Die Expression kann *in vitro* und *in vivo* durch die Gabe von PPAR $\gamma$ -Agonisten verstärkt werden [Yue et al. 2004]. Die genaue Funktion der ApoE-Sekretion des Adipozyten ist noch unbekannt. Es wird eine Rolle im Cholesterolefflux postuliert [Yu und Ginsberg 2005]. Zwei weitere Apolipoproteine, das ApoC1 und das ApoD, werden ebenfalls von Adipozyten sekretiert [Wassef et al. 2004]. ApoC1 ist an der rezeptorvermittelten Entfernung von Lipoproteinen aus dem Plasma beteiligt. Mäuse, die ApoC1 überexprimieren, zeigen eine Beeinträchtigung der Fettsäureaufnahme durch das Fettgewebe [Jong et al. 1998] und sind resistent gegen eine durch fettreiche Nahrung induzierte Adipositas [Jong et al. 2001]. ApoD gehört zur Familie der Lipocalin Lipidtransporter. Im Adipozyten wird seine Expression durch LXR $\alpha$  induziert [Hummasti et al. 2004]. Welche Rolle das ApoD im Adipozyten spielt ist noch unklar.

### 1.2.3 Endokrine Funktion

Das Fettgewebe sekretiert bioaktive Peptide, so genannte Adipozytokine. Einige sind spezifische Produkte der Adipozyten, andere werden auch in Zellen anderer Gewebe produziert. Diese hormonähnlichen Stoffe wirken sowohl auf ihre nähere Umgebung (autokrin oder parakrin) als auch systemisch (endokrin). Ein Adipozyt exprimiert eine große Anzahl von Rezeptoren verschiedenster Spezifität, die ihn zur Antwort auf ein endokrines Signal befähigt. Das Fettgewebe kann also efferente (ableitende) Signale aussenden und auf afferente (zuleitende) Signale anderer Hormonachsen oder des Zentralen Nervensystems (ZNS) reagieren. Mithilfe dieser Kommunikation beteiligt sich das Fettgewebe an der Koordination von Energiemetabolismus, neuroendokrinen Funktionen und dem Immunsystem. Inzwischen sind eine Reihe von Adipozytokinen beschrieben worden u. a. Leptin [Zhang et al. 1994], Adiponektin [Scherer et al 1995, Hu et al. 1996] Tumor Nekrose Faktor (TNF)  $\alpha$  [Übersicht von Sethi und Hotamisligil 1999], Interleukin (IL) 6 [Übersicht von Fernández-Real und Ricart 2003], Resistin [Steppan et al. 2001], Visfatin [Fukuhara et al. 2005], Retinol Binding Protein 4 (RBP4) [Yang et al. 2005]. Einige Adipozytokine werden mit einem insulinresistenten, also gesunden Zustand des Organismus verbunden wie z. B. Adiponektin. Andere korrelieren mit Körperübergewicht, Fettleibigkeit (Adipositas) oder Insulinresistenz, etwa Leptin und IL6 [Übersicht von Kershaw und Flier 2004]. Für Resistin ist im murinen Organismus eine strenge

Korrelation zwischen erhöhter Plasmakonzentration und Adipositas sowie Insulinresistenz gezeigt worden [Steppan et al. 2001]. Dieser Zusammenhang konnte im humanen Organismus nicht nachgewiesen werden [Übersicht von Banerjee und Lazar 2003]. Im Folgenden soll eine Auswahl der Adipozytokine besprochen werden, deren Wirkung im humanen Organismus relevant sind.

Leptin wurde als Mediator zwischen Fettgewebe und ZNS im Zusammenhang mit Adipositas entdeckt. Die ob/ob Maus [Zhang et al. 1994], in der das Gen für Leptin zerstört ist, ist genauso wie die db/db Maus [Kobayashi et al. 2000], die keinen Leptinrezeptor synthetisieren kann, extrem anfällig für Diät-induziertes Übergewicht. Während der Phase der aktiven Lipogenese, wird Leptin von der Fettzelle in die Blutbahn sezerniert. Diese Sekretion ist direkt proportional zur Fettmasse und damit zum Ernährungsstatus des Organismus [Fain et al. 2004]. Leptin bindet im Hypothalamus an den Leptinrezeptor und verursacht dort die Unterdrückung der Nahrungsaufnahme, indem es die Synthese oder Aktivität vieler Neuropeptide der Appetitregulierung beeinflusst [Übersicht von Zigman und Elmquist 2003]. Über diesen Weg der negativen Rückkopplung im ZNS vermittelt das ausreichend versorgte Fettgewebe eine Senkung der Nahrungszufuhr. Außerdem bewirkt Leptin eine Erhöhung des Grundumsatzes, die zu einer Reduktion des Triglyzeridgehaltes im Fett und anderen Geweben führt [Pellemounter et al. 1995]. In seiner autokrinen und parakrinen Wirkung verursacht es im Fettgewebe selber eine Steigerung des Energieverbrauchs. Es steigert die Lipolyse und reduziert die Genexpression lipogener Enzyme. Die Mechanismen werden über die Bindung des Hormons an den Leptinrezeptor mit anschließender Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges [Vaisse et al. 1996] oder über eine direkte Stimulation der 5'-AMP aktivierten Proteinkinase (AMPK) vermittelt [Minokoshi et al. 2002]. Leptin hemmt weiterhin die Expression von SREBP1c in Leber, Fettgewebe und Pankreas und damit die Induktion lipogener Enzyme. Diese Regulation der Energiehomöostase ist nur ein kleiner Ausschnitt des breitgefächerten Wirkungsspektrums des Leptins. Es beeinflusst andere hormonelle Achsen wie die von Hypothalamus-Hypophyse und ihrer Zieldrüsen. Es kann direkt auf eine Vielzahl von Organen wirken und so Prozesse wie Reproduktion, Blut- und Gefäßbildung, Immunreaktion oder Knochenbildung beeinflussen [Übersicht Kershaw und Flier 2004]. Im Zustand der Adipositas sind die Plasmaleptinspiegel erhöht. Die Ausprägung der Erkrankung kann auf eine Leptinresistenz der Körperzellen zurückzuführen sein [Van Heek et al. 1997, Bjorbaek et al. 1998]. Die genauen Entstehungsmechanismen sind noch unklar.

Adiponektin ist ebenfalls ein adipozytenspezifisch exprimiertes Adipozytokin. Es wird in großen Mengen produziert und zirkuliert in hohen Konzentrationen im Blut. Dabei treten verschiedenen Formen des Proteins auf: eine Vollängelform, die sowohl Trimere (low molecular weight Adiponektin) als auch Multimere (high molecular weight Adiponektin) bildet, sowie ein Fragment, welches nur aus der globulären Domäne des Adiponektins

besteht [Übersicht von Rajala und Scherer 2003]. Es sind zwei Adiponektinrezeptoren beschrieben, die gewebsspezifisch exprimiert werden [Yamauchi et al. 2003]. Die Wirkung des Adiponektins hängt von seiner Konzentration im Blut, vom Expressionsmuster der Adiponektinrezeptoren in der Zielzelle sowie der jeweiligen Adiponektin-Isoform ab, die mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren binden. Adiponektin bewirkt prinzipiell eine Verstärkung der Insulinsensitivität [Yamauchi et al. 2001]. Dieser wird durch eine Erhöhung der Fettsäureoxidation über die Aktivierung der AMPK und des PPAR $\alpha$  vermittelt [Yamauchi et al. 2002]. Im Muskel und in der Leber stimuliert Adiponektin so den Energieverbrauch. In der Leber mediiert es zusätzlich die Hemmung der Neubildung von Glukose in der Glukoneogenese [Berg et al. 2001]. In der Gefäßwand vermittelt Adiponektin eine Reihe antiatherogener Wirkungen. Die Expression von Adiponektin wird durch PPAR $\gamma$ -Agonisten erhöht [Maeda et al. 2001] und durch TNF $\alpha$  und IL6 gesenkt. Hohe Adiponektinspiegel sind mit einer ausgeprägten Insulinsensitivität, hohen HDL-Cholesterolverwerten, niedrigen Plasmatriglyzeriden und hoher LPL-Aktivität assoziiert. Bei Adipositas und Insulinresistenz sinkt Adiponektin im Plasma drastisch ab [Weyer et al. 2001].

Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  wird nicht ausschließlich im Adipozyten exprimiert, sondern auch in Zellen des Immunsystems. Die Plasmaspiegel von TNF $\alpha$  sind relativ gering, bei Adipositas steigen allerdings die lokalen Konzentrationen im Fettgewebe stark an [Übersicht von Kershaw und Flier 2004]. Diese Zunahme kann zum Teil durch eine Einwanderung von Makrophagen ins Fettgewebe erklärt werden, ist aber auch auf eine erhöhte Synthese und Sekretion in den Adipozyten selber zurückzuführen. TNF $\alpha$  ist ein potenter Auslöser zellulärer Insulinresistenz. Außerdem wirkt es auf die Sekretion anderer Adipozytokine, es reduziert Adiponektin [Fasshauer et al. 2002] und induziert IL1 sowie IL6.

IL6 ist ebenfalls ein Zytokin, das in Verbindung mit Entzündungen von Immunzellen sekretiert wird [Übersicht von Papanicolaou et al. 1998]. Im Fettgewebe wird es sowohl von Adipozyten als auch von Matrixzellen hergestellt [Fain et al. 2004]. Etwa ein Drittel der im Blut zirkulierenden Menge stammt aus dem Fettgewebe [Mohamed-Ali et al. 1997], vor allem dem omentalen Fett [Fried et al. 1998]. Adipozyten exprimieren auch den IL6-Rezeptor, der in einer membrangebundenen und einer löslichen Form vorkommt. Ein Komplex aus Ligand und gebundenem Rezeptor verbindet sich an der Zelloberfläche mit einem Homodimer des gp130 Transmembranproteins und aktiviert so den spezifischen IL6-Signalweg [Übersicht von Kershaw und Flier 2004]. Eine verstärkte Expression von IL6 im Fettgewebe und steigende IL6-Plasmaspiegel korrelieren positiv mit Adipositas, eingeschränkter Glukosetoleranz und Insulinresistenz [Bastard et al. 2002]. Bei Gewichtsabnahme ist dieser Effekt reversibel [Bastard et al. 2000]. Im ZNS wird IL6 von Regionen des Hypothalamus synthetisiert [Schöbitz et al. 1993] Hier scheint IL6 eine andere Funktion zu haben. Im Gegensatz zum Körperkreislauf ist die Regulation des IL6-

Spiegels in Abhängigkeit des Körpergewichts genau entgegengesetzt, bei Übergewicht finden sich niedrige Konzentrationen, die bei Gewichtsreduktion ansteigen. Eine Reihe von Untersuchungen weisen auf die Beteiligung von IL6 an der physiologischen Regulation der Energiehomöostase hin. Die Gabe von IL6 erhöht den Energieumsatz [Tsigos et al. 1997] und die Lipolyse in humanen Probanden [Lyngsø et al. 2002]. Das Mausmodell mit IL6-Defizienz entwickelt eine Alters-Adipositas und die damit verbundenen Stoffwechselstörungen [Wallenius et al. 2002].

Das komplexe Wirkungsspektrum dieser Auswahl an Adipozytokinen zeigt bereits, wie umfassend die Teilnahme des Fettgewebes an der Regulation der Körperfunktionen ist und wie gravierend eine Störung in diesem fein abgestimmten System sein muss.

### **1.3 Rolle des Adipozyten in der Insulinresistenz**

Eine Entwicklung von Körperübergewicht bis hin zur Adipositas führt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit zur Entstehung einer Insulinresistenz. Diese schwere Dysregulation des Stoffwechsels birgt ein hohes Risiko für die Ausprägung einer Reihe von Folgeerkrankungen wie Diabetes Typ II, Atherosklerose, Athrose oder bestimmte Krebserkrankungen [Übersicht von Biddinger und Kahn 2006]. Die Ursache für die Manifestation einer Übergewichts-induzierten Insulinresistenz liegt in einer komplexen Mischung genetischer und exogener Faktoren. Das Anfangsstadium der Insulinresistenz ist durch eine abgeschwächte Reaktion der peripheren Gewebe – Fett und Skelettmuskulatur – auf Insulin gekennzeichnet. Im Fettgewebe findet durch die schwache Insulinwirkung keine Inhibition der HSL statt [Anthonsen et al. 1998], was die erhöhte Lipolyse intrazellulärer Speicher nach sich zieht. Auch die Induktion der LPL ist vermindert [Picard et al. 1999] mit der Konsequenz einer stark verringerten Hydrolyse Triglyzerid-reicher Lipoproteine (Chylomikronen und VLDL) in den Gefäßen der Peripherie. Demzufolge sinkt die Aufnahme von Lipiden in den Adipozyten und steigt die Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe. Aus diesen beiden Prozessen resultieren eine postprandiale Hyperlipidämie und eine erhöhte Fettsäurekonzentration im Plasma [Axelsen et al. 1999]. Die zirkulierenden Nahrungslipide werden in der Folge in Gewebe aufgenommen, die funktionell für den Umgang mit hohen Konzentrationen von Fettsäuren nicht ausgestattet sind (z. B. Muskel, Leber oder Pankreas) [Übersicht von Yu und Ginsberg 2005]. Die Fettsäuren selber oder die aus ihnen entstehenden Metabolite wirken in diesen Zellen lipotoxisch. Möglich ist auch eine Einlagerung der Fettsäuren in Form von Triglyzeriden, die als ektopische Speicher die Zelle in ihrer Funktion beeinträchtigen. Im Muskel bewirken die Fettsäuren eine Einschränkung der Glukoseaufnahme, die Blutglukosespiegel nehmen erhöhte Werte an [Dresner et al. 1999]. In der Leber führt die vermehrte Aufnahme von Fetten und Lipoproteinen zu einer ektopischen Akkumulation von Lipiden (Steatose), welche ursächlich mit der Entstehung der Insulinresistenz im Zusammenhang

steht [Übersicht von Angulo et al. 2002]. Nachfolgend bewirkt die abgeschwächte Insulinwirkung u. a. eine Steigerung der Glukoneogenese, also der de novo Synthese von Glukose, die die bereits bestehende Hyperglykämie verstärkt [Boden et al. 2001, Basu et al. 2005]. Zu Beginn versuchen die  $\beta$ -Zellen des Pankreas über eine erhöhte Ausschüttung von Insulin die zunehmende Insulinresistenz zu kompensieren. Dies führt zu einer Hyperinsulinämie. Die hohen Konzentrationen von Fettsäuren und Glukose im Blut beeinträchtigen allerdings auch die Funktion der  $\beta$ -Zelle. Längerfristig verursacht diese Schädigung ein Absinken der Insulinsekretion. Kann die  $\beta$ -Zelle über die Menge des ausgeschütteten Insulins die Defekte in der peripheren Insulinwirkung nicht mehr kompensieren, manifestiert sich ein Diabetes Typ II [Carpentier et al. 1999]. Die unterschiedlichen Fettdepots im Körper sind verschieden stark an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt. Viszerales Fettgewebe ist durch seine starke lipolytische Aktivität und die Abführung seiner Fettsäuren über die Portalvene direkt zur Leber besonders stark damit assoziiert [Hoffstedt et al. 1997].

Die Mechanismen, die auf molekularer Ebene die abgeschwächte Reaktion der Zelle auf Insulin vermitteln, sind teilweise sehr detailliert untersucht. Die Einordnung in den Zusammenhang des Organismus, das Feststellen der Gewebespezifität der Vorgänge und die Gewichtung bei der Entstehung der Insulinresistenz ist jedoch schwierig. Mehrere Schritte in der Insulinsignalkaskade konnten als Angriffspunkte für eine Reduktion der Insulinresistenz identifiziert werden. Die Einschränkung der Insulinrezeptorfunktion wurde auf eine verminderte Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors [Arner et al. 1987] und auf eine reduzierte Präsenz des Rezeptors an der Zelloberfläche zurückgeführt, die wiederum durch eine gesteigerte Degradation des Proteins verursacht wurde [Übersicht von Pirola et al. 2004]. Auch das in der Signalkaskade unterhalb des Rezeptors liegende Insulinrezeptor Substrat (IRS) 1 ist in der Insulinresistenz in seiner Funktion eingeschränkt. Hier finden sich ebenfalls weniger aktivierende Tyrosinphosphorylierungen, bestimmte inhibierende Serinphosphorylierungen [Jullien et al. 1993] und ein vermehrter Abbau des IRS1 über das Proteasom [Sun et al. 1999]. Sowohl die Hemmung des Insulinrezeptors als auch die des IRS1 können über den suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 vermittelt werden. Dieser Effektor wird durch Insulin induziert und dient eigentlich als physiologischer Regulator für die negative Rückkopplung der Insulinwirkung [Emanuelli et al. 2000]. Der Effekt der Fettsäuren auf den zellulären Stoffwechsel setzt unter anderem auch am Insulinsignalweg an. Fettsäuren verringern die insulinvermittelte Aktivierung der PI3K [Yu et al. 2002] und beeinflussen eine Reihe der unterhalb davon liegenden Kinasen [Kim et al. 2002]. Ein weiterer negativer Effektor ist der erhöhte Glukosespiegel im Plasma. Im Vergleich zum physiologischen Normalzustand wird ein deutlich größerer Anteil der Glukose in den Glukosaminweg eingespeist, was längerfristig zu einer verstärkten und damit dysregulierten Glykosylierung von Proteinen und der Einschränkung ihrer Funktion führt [Übersicht von Pirola et al. 2004].

Die Ausprägung von Adipositas ist mit einer Zunahme der Fettgewebsmasse verbunden. Das Wachstum eines Adipozyten führt zu einer Verschiebung im charakteristischen Profil seiner sekretierten Proteine. Vergrößerte Adipozyten schütten das Adipozytokin  $\text{TNF}\alpha$  aus, was zu einer Hemmung des insulinempfindlichen Glukosetransporters GLUT4 und in der Folge zu erhöhten Glukosewerten im Blut führt. Der Insulinsignalweg wird ebenfalls maßgeblich durch  $\text{TNF}\alpha$  beeinträchtigt. Das geschieht über eine verstärkte Serinphosphorylierung des IRS1 und wird weiterhin über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor (NF)  $\kappa\text{B}$  vermittelt [Ruan et al. 2002]. Dieser wird eigentlich vom Inhibitor of NF $\kappa\text{B}$  (I $\kappa\text{B}$ ) inaktiviert. Die Phosphorylierung der I $\kappa\text{B}$  Kinase (IKK) führt jedoch zur Degradation von I $\kappa\text{B}$  und zur Freisetzung des aktiven NF $\kappa\text{B}$ . Über diesen Weg inhibiert  $\text{TNF}\alpha$  die Lipogenese. Gleichzeitig wird die Lipolyse aktiviert. Für diesen Effekt wird eine Beteiligung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase (JNK) und der p42/44 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) vermutet [Zhang et al. 2002], die Perilipin phosphorylieren und so die Lipidspeicher zur Lipolyse freigeben. Diese Wirkung resultiert in einer drastisch erhöhten Plasmakonzentration freier Fettsäuren. Möglicherweise ist bei der Entstehung von Insulinresistenz durch  $\text{TNF}\alpha$  nicht sein direkter endokriner Effekt ausschlaggebend, sondern die indirekte Wirkung über eine erhöhte Freisetzung von Fettsäuren ins Blut. Diese sind per se, wie bereits dargestellt, massiv an der Auslösung einer Insulinresistenz beteiligt. Bei Adipositas sekretiert das Fettgewebe vermehrt IL6. Da die Hauptmenge an IL6 im omentalen Fett gebildet [Fried et al. 1998] und direkt der Leber zugeführt wird, ist IL6 besonders an der Entstehung der Insulinresistenz der Leber beteiligt. Hier hemmt es den Insulinsignalweg über eine Induktion von SOCS3 mit den daraus resultierenden Folgen (s. o.) [Senn et al. 2003]. Im Fettgewebe hemmt IL6 die LPL-Aktivität [Greenberg et al. 1992] und die Synthese von Adiponektin [Fasshauer 2003, Bruun et al. 2003], *in vitro* darüber hinaus die insulinvermittelte Aufnahme von Glukose [Rotter et al. 2003]. Im Gegensatz zu  $\text{TNF}\alpha$ , dessen direkte Wirkung vermutlich nur lokal ausgeübt wird, ist IL6 ein Adipozytokin mit endokriner Wirkung. Die erhöhte Expression von Adipozytokinen bei Adipositas wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL6, die klassischerweise als proinflammatorische Mediatoren bekannt sind, wird unter dem Begriff der lokalen Entzündung als Ursache für die metabolischen Folgen der Adipositas zusammengefasst [Übersicht von Lyon et al. 2003].

Die systemischen Folgen der Insulinresistenz werden maßgeblich durch die erhöhte Freisetzung der Fettsäuren und ein Ungleichgewicht in der Ausschüttung von Adipozytokinen durch das Fettgewebe beeinflusst. Die regulatorischen Mechanismen, die vor allem zur Dysregulation der Adipozytokinsekretion führen, sind jedoch nur unvollständig untersucht.

## 1.4 Zellmodelle zur Untersuchung des Adipozytenstoffwechsels

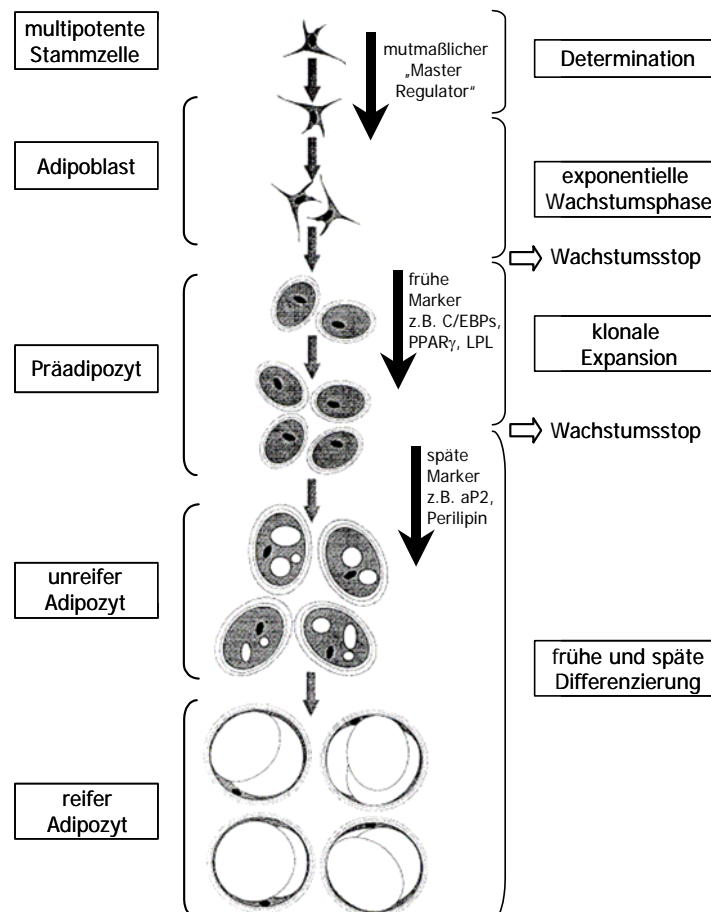
Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen des adipozytären Stoffwechsels stehen eine Reihe von *in vitro* Modellen zur Verfügung. Prinzipiell können das Präparationen primärer Adipozyten oder Präadipozyten sein, die *in vitro* zu reifen Fettzellen ausdifferenziert werden. Eine andere Möglichkeit sind klonale Zelllinien, entweder in Form von Stammzellen oder Präadipozyten, die sich durch Induktion der Differenzierung zu Adipozyten entwickeln. Die Verwendung primärer Zellmodelle versichert die Untersuchung eines Systems, das am ehesten den physiologischen Bedingungen *in vivo* entspricht. Neben dem Nachteil einer aufwendigen und problematischen methodischen Arbeit, muss beim Vergleich unabhängiger Versuche der jeweilige individuelle Hintergrund des Gewebespenders berücksichtigt werden. Außerdem muss beachtet werden, dass die Gewebeentnahme im Regelfall an eine Operation, also eine Stresssituation für den Körper, und an ein Krankheitsbild gekoppelt ist. Führt man sich dazu den großen Einfluss von Geschlecht, hormonellem Status, Depotspezifität und genetischen Faktoren auf das Verhalten des Fettgewebes vor Augen, wird die erwünschte Vergleichbarkeit unabhängiger Versuche stark eingeschränkt. Dieses Problem kann durch die Verwendung klonaler Zelllinien vermieden werden. Ein *in vitro* Modell kann selbstverständlich nicht den großen physiologischen Zusammenhang abbilden. Bei guter Charakterisierung kann aber der gewählte Ausschnitt des Organismus reproduzierbar dargestellt werden. Ebenso ist die gezielte genetische Manipulation mit Hilfe molekularbiologischer Methoden möglich, sodass der Einfluss bestimmter Proteine für den Adipozytenstoffwechsel gezielt untersucht werden kann. Unter dieser Voraussetzung können unabhängig voneinander durchgeführte Versuche ohne Abweichungen, die aus dem Versuchssystem selber entspringen, verglichen werden.

Das Spektrum der verfügbaren Zelllinien reicht von multipotenten Stammzellen bis zu präadipozytären Systemen. Die erstgenannten können zu Zellen verschiedener Abstammung – Chondrozyten, Osteoblasten, Myoblasten, Adipozyten – differenzieren. Die letzteren sind bereits auf die adipogene Linie festgelegt und entwickeln sich ausschließlich zu Adipozyten. Die Phasen der adipozytären Differenzierung, wie sie *in vitro* ablaufen, sind in Abbildung 4 dargestellt.

Die ersten hergestellten Zelllinien waren murinen Ursprungs. Zu den multipotenten Zelllinien gehören die embryonalen Mausfibroblasten 10T1/2 (genau bezeichnet als CH3/10T1/2 clone 8) [Reznikoff et al. 1973], aus denen durch Hypomethylierung der DNA mittels 5-Azacytidin Zellen auf eine bestimmte Abstammung festgelegt werden konnten. Als adipogene Zelllinie entstanden so die TA1 Zellen [Chapman et al. 1984]. Bekannte Modelle für murine Präadipozyten sind die Ob17 Zellen und ihr Subklon Ob1771, die aus epididymalen Fettpolstern junger Mäuse gewonnen wurden und die nach Wachstumsstop durch Kontaktinhibition unter Zusatz exogener Lipide zu Adipozyten differenzieren [Négrel et al. 1978]. Die Zelllinie 1246 wurde aus Teratomen, komplexe Tumore pluripotenter



Keimzellen, von Mausembryonen isoliert. Sie differenziert ähnlich den Ob17 Zellen unter Zusatz adipogener Substanzen [Serrero und Khoo 1982]. In diesen Zellsystemen wurden die ersten mechanistischen Untersuchungen zur Determination von Stammzellen auf bestimmte Abstammungen und zur adipozytären Differenzierung *in vitro* durchgeführt.



#### Abbildung 4: Schematischer Ablauf der adipozytären Differenzierung *in vitro*

Durch bisher unbekannte Mechanismen tritt die multipotente Stammzelle in den Weg der adipozytären Abstammung ein (Determination). Dieser Adipoblast proliferiert (exponentielle Wachstumsphase) und durchläuft dann einen Wachstumsstopp. Es folgen ein bis zwei weitere Runden der Zellteilung des Präadipozyten (klonale Expansion), wobei die Expression früher Marker (z. B. C/EBPs, PPAR $\gamma$ , LPL) einsetzt. Nach Eintritt des zweiten permanenten Wachstumsstops differenziert die Zelle unter sukzessiver Expression der entsprechenden Marker und Einspeicherung von Triglyzeriden zu einem unreifen und nachfolgend reifen Adipozyten. Die Bedeutung der klonalen Expansion ist noch unklar. In murinen Systemen ist sie für die Differenzierung notwendig, in humanen Zellmodellen wird sie nicht beobachtet. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Möglicherweise sind postkonfluente Mitosen ein Artefakt muriner Zellkulturen. Andererseits könnte in isolierten Präadipozyten diese Teilung bereits *in vivo* stattgefunden haben. Die Abbildung wurde adaptiert nach Boone et al. 2000.

Die am weitesten verbreitete und am besten charakterisierte Zelllinie für murine Adipozyten sind die 3T3-L1 und 3T3-F442A Fibroblasten [Green und Kehinde 1974, Green

und Kehinde 1975, Green und Kehinde 1976], die beide als Subklone der aus Mausembryonen isolierten 3T3-Zellen entstanden sind [Torado und Green 1963]. Bei Konfluenz der Zellen stellen diese ihr Wachstum ein und differenzieren zu Adipozyten aus. Die Effizienz der Differenzierung kann durch Zusatz von Insulin, Glukokortikoiden bzw. deren synthetischer Analoga (z. B. Dexamethason) und Phosphodiesterasehemmern wie Isobutylmethylxanthin (IBMX) erhöht werden [Student et al. 1980]. Ausdifferenzierte 3T3-L1 Zellen weisen bezüglich ihrer Morphologie, der Expression lipogener und lipolytischer Enzyme sowie ihrer Reaktion auf hormonelle Stimuli weitreichende Charakteristika von Fettzellen auf. Nach Injektion in immundefiziente Mäuse entwickeln sich 3T3-L1 zu Adipozyten, die nicht von endogenem Fettgewebe zu unterscheiden sind [Green und Kehinde 1979]. Die meisten Studien zu den molekularen Abläufen der adipozytären Differenzierung wurden in diesem Zellmodell gemacht.

Ein großer Nachteil all dieser Zellsysteme ist die Tatsache, dass ihr Chromosomensatz vom Normalzustand abweicht, die Zellen also aneuploid sind. Dieser Umstand führt möglicherweise zu einer Entwicklung und einem Verhalten, das der physiologischen Situation nicht entspricht. Viele Zelllinien bilden als multilokuläre Präadipozyten die frühe adipogene Entwicklung gut ab. Fast alle behalten aber ihre multilokuläre Morphologie, auch nach Erreichen der terminalen Differenzierung, was den physiologischen Gegebenheiten nicht entspricht [Ailhaud und Hauner 1998]. Weiterhin ist wegen grundlegender Unterschiede in der Entwicklung und Funktion des Fettgewebes verschiedener Arten, die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Zellsystemen murinen Ursprungs auf den humanen Organismus eingeschränkt.

Es gibt nur eine begrenzte Anzahl humaner Zellmodelle für die Darstellung des menschlichen Fettgewebes *in vitro*. Eine Möglichkeit ist die Etablierung von Zelllinien, die aus Entartungen des Fettgewebes bzw. des mesenchymalen Gewebes, so genannten Liposarcomen, isoliert werden. Die erste Zelllinie dieser Art ist die SW872, die 1984 von Leibovitz aus einem Fibrosarcoma isoliert wurde [ATCC HTB-92, A. Leibovitz] und die in Anwesenheit von Serum oder einem Hormoncocktail Triglyzeride akkumulieren. Wabitsch et al. haben ebenfalls eine stabile fibroblastäre Zelllinie, LiSa-2, hergestellt. Unter serumfreien Bedingungen und Zusatz eines Hormoncocktails können diese Zellen zu Adipozyten differenzieren, die eine Reihe von adipozytären Markern exprimieren und eine Reaktion auf Insulin und lipolytische Reize zeigen. Allerdings weist der Karyotyp der LiSa-2 schwere Störungen in Form extrem schwankender Chromosomenzahlen und teilweise nicht identifizierbarer Chromosomen auf [Wabitsch et al. 2000]. Eine weitere Liposarcoma-Zelllinie ist die LS14, die als Prolaktin-sekretierende adipozytäre Zelllinie etabliert wurde, um die endokrine Funktion des Fettgewebes zu untersuchen. Da die funktionelle Untersuchung dieses Systems noch nicht sehr weit fortgeschritten ist, kann dessen Stellenwert momentan nicht bewertet werden [Hugo et al. 2006]. Ein anderes humanes Modell ist die stabile präadipozytäre Zelllinie SGBS. Sie wurde aus subkutanem

Fettgewebe eines Säuglings mit dem Simpson-Golabi-Behmel Syndrom hergestellt. Das Kind zeigte neben den typischen Symptomen des Syndroms ein übermäßiges Wachstum, vergrößertes subkutanes Fettgewebe und verstarb im Alter von 3 Monaten an einem Tumor. Die SGBS-Zellen zeigen uneingeschränkte Proliferation *in vitro* und differenzieren bei hormoneller Stimulation zu funktionellen Adipozyten aus. Der Karyotyp der SGBS ist bis auf eine strukturelle Veränderung im Chromosom 22 normal [Wabitsch et al. 2001]. Fraglich ist allerdings, in wieweit die schwere Krankheit des Spenders, vor allem die Störung des Wachstums und die Vergrößerung des Fettgewebes, zu Abweichungen im Stoffwechsel der adipozytären SGBS Zelllinie führt.

Seitdem adultes Knochenmark als eine Quelle für multipotente mesenchymale Stammzellen (MSC) entdeckt wurde, die *in vitro* zu Zellen unterschiedlicher Abstammung ausdifferenzieren können [Pittenger et al. 1999], ist auch das Stroma des Fettgewebes auf derartige Zellen untersucht worden. Zuk et al. konnten aus abgesaugtem Fettgewebe so genannte PLA Zellen (processed lipoaspirates) generieren, die entsprechend den MSC ein adipogenes, myogenes, chondrogenes, osteogenes und zusätzlich neurogenes Differenzierungspotential aufweisen [Zuk et al. 2001, Zuk et al. 2002]. Die Zellen der einzelnen Abstammungen wurden jedoch nur sehr lückenhaft charakterisiert. Offen bleibt bis jetzt ebenfalls die Frage nach der Aufrechterhaltung des Proliferationspotentials und dem Karyotyp der PLA. Ein ähnliches Zellmodell wurde aus dem Stroma humaner Fettgewebeproben junger Spender entwickelt, wobei offenbar Zellen verschiedener Depots gemischt wurden. Diese Zellpopulation genannt hMADS (human multipotent adipose-derived stem cells) hat bei normalem Karyotyp ein starkes Proliferationsvermögen *in vitro* und kann zu Adipozyten, Myoblasten und Osteoblasten differenzieren [Rodriguez et al. 2004]. In muskeldystrophen Mäusen konnte durch Injektion der hMADS eine starke Zunahme von Muskelfibrillen festgestellt werden [Rodriguez et al. 2005]. Eine weitere Charakterisierung des adipogenen Potentials dieser Zellen wurde bisher nicht beschrieben.

Unter den oben beschriebenen Zellsystemen stellen die aus dem Fettgewebe isolierten Stammzelllinien die vorteilhafteste Lösung dar. Die resultierenden Adipozyten sind dabei jedoch als eines von mehreren Differenzierungszielen nicht ausreichend charakterisiert und die erzielten Phänotypen mit vielen kleineren Lipidvesikeln (multilokulär) für die Darstellung eines terminal differenzierten Adipozyten morphologisch unzulänglich.

Für die hier vorliegende Arbeit wurde eine humane mesenchymale Stammzelllinie namens hMSC-Tert (human mesenchymal stem cell-telomerase reverse transcriptase) verwendet [Simonsen et al. 2002]. Für die Herstellung dieser Zelllinie wurde aus Knochenmarkspalten von gesunden Probanden die Fraktion mesenchymaler Stammzellen isoliert. Durch die retrovirale Einführung der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT) konnte eine stabile Zelllinie etabliert werden. Diese Zellen haben einen normalen Karyotyp. Sie proliferieren ohne Alterserscheinung und weisen ein kontinuierliches Potential zur Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten,

Adipozyten und Endothelzellen auf [Abdallah et al. 2005]. Außerdem konnte nach Injektion der Zellen in immunodefiziente Mäuse eine vermehrte Knochenbildung festgestellt werden, ohne dass Tumoren gebildet wurden. Die Zelllinie unterliegt einer fortlaufenden Charakterisierung, die den Schwerpunkt auf verschiedene Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen legt [Fink et al. 2004, Kratchmarova et al. 2005, Bentzon et al. 2004, Burns et al. 2005]. Die hMSC-Tert stellen ein stabile Zelllinie auf gesundem humanem Hintergrund mit hohem Differenzierungspotential dar. Während der bisherigen intensiven Untersuchungen wurden keine Abweichungen vom normalen Verhalten bezüglich Wachstum, Entartung, Karyotyp oder Differenzierungspotential gefunden. In diesen Eigenschaften eignet sich die Zelllinie ideal zur Entwicklung eines humanen Adipozytenmodells.

## 1.5 Fragestellung

Das Fettgewebe ist ein komplex reguliertes Organ, das maßgeblich an der systemischen Regulation der Energiehomöostase beteiligt ist. Dysregulationen im Stoffwechsel des Fettgewebes wirken sich in gravierender Weise auf die Funktion des gesamten Organismus aus. Die geringe Verfügbarkeit gut charakterisierter Zellmodelle des humanen Fettgewebes erschwert die Untersuchung der Mechanismen, die auf molekularer Ebene im Adipozyten die Entstehung dieser Dysregulationen vermitteln.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Zellmodell des humanen Fettgewebes zu entwickeln, das den physiologischen Gegebenheiten möglichst weitgehend entspricht. Eine angemessene Charakterisierung soll das Zellsystem zu einem Werkzeug machen, das die Untersuchung des zellulären Stoffwechsels und der endokrinen Funktion des Fettgewebes auf molekularer Ebene ermöglicht. Das weiterführende Ziel ist die modellhafte Generierung von Stoffwechselzuständen, die den Bedingungen im gesunden bzw. dysregulierten Fettgewebe entsprechen. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die dem Verhalten der Zelle in der jeweiligen Situation zugrunde liegen, kann zur Aufklärung der zellulären Pathophysiologie des Fettgewebes beitragen.

Die Entwicklung des humanen Adipozytenmodells soll durch adipogene Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzelllinie hMSC-Tert erfolgen. Ziel ist die Etablierung eines Protokolls, das zur stabilen reproduzierbaren Generierung terminal differenzierter Adipozyten führt. Diese sollen anhand ihrer Morphologie, ihres Expressionsmusters adipozytärer Marker und ihrer funktionalen Eigenschaften charakterisiert werden. Hierbei soll ein besonderer Fokus auf den Lipoproteinstoffwechsel gelegt werden.

Das übergeordnete Ziel der Arbeit ist es, einen Beitrag zum verbesserten Verständnis der Zusammenhänge zwischen dem Ernährungsstatus des Fettgewebes und Erkrankungen des Stoffwechsels auf zellulärer Ebene zu leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

- sterile Werkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
- CO<sub>2</sub>-Brutschrank CB210 (Binder, Tuttlingen)
- CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System, Reutlingen)
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 mit Objektiven Plan-NEOFLUAR 10x/0,30 440330; Plan-NEOFLUAR 20x/0,50 ∞/0,17; Ph3 Plan-NEOFLUAR 40x/1,30 Oil ∞/0,17; Ph3 Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil ∞/0,17; Ph3 Plan-APOCHROMAT 100x/1,4 Oil ∞/0,17; Kamera AxioCam color und Software Axio Vision Viewer (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Konfokales Laser-Mikroskop LSM 510 META mit Bedienungssoftware (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Spektrophotometer SmartSpec™3000 (BioRad, USA); Mikroküvette aus Quarzglas (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim)
- T3-Thermoblock und UNO-Thermoblock (Biometra GmbH, Göttingen)
- Multiplex Quantitative PCR System Mx4000 (Stratagene, USA)
- Geldokumentation BDA Digital mit Dunkelhaube, Kamera Canon Power Shot G3 und Software BioDoc Analyze (Biometra GmbH, Göttingen)
- Ultrazentrifuge TL 100 mit Festwinkelrotor TLA 100.2 (Beckman Coulter, USA)
- Ultraschall-Desintegrator Sonifier 450 mit doppelstufiger 1/8 Mikrohornspitze (Branson, USA)
- Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik, Staufen)
- Elektrophoresekammer und Zubehör X-Cell Sure Lock (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Blottingkammer und Zubehör TRANS Blot Cell (BioRad, USA)
- ELISAreader Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- Fluorometer Fluorocount (Packard Bioscience, PerkinElmer, USA)
- β-Counter Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (Wallac, PerkinElmer, USA)
- γ-Counter automatic gamma counter LKB-Wallac CliniGamma 1272 (Wallac, PerkinElmer, USA)
- Gerät zur Isoelektrischen Fokussierung IPGphor (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- 2D-Elektrophoresekammer Ettan DALTwelve System Separation Unit, Power Supply and Control Unit (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- Ettan Spot Picker 18-1145-28 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- Ettan Digester 18-1142-68 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- Massenspektrometer Ettan MALDI-ToF/Pro (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)

## 2.2 Chemikalien

Alle nicht extra benannten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Fluka Chemika (Buchs, Schweiz), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) in analytischer Qualität bezogen.

## 2.3 Verbrauchsmaterial

- alle Plastikwaren für die Zellkultur von Nunc (Roskilde, Dänemark), Sarstedt (USA) und Falcon (Becton Dickinson Labware, USA)
- runde Deckgläschen (= Cover Slips) mit Ø13 mm (Assistent, Sondheim)
- Ultrazentrifugenröhrchen aus Polyallomer 11 x 34 mm (Beckman Coulter, USA)
- Nitrocellulosemembran PROTRAN mit Porengröße 0,45 µm (Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel)
- Röntgenfilme Kodak Biomax MR Scientific Imaging Film (KODAK)

## 2.4 Adipozytäre Differenzierung

### Material

- PBS -CaCl<sub>2</sub> -MgCl<sub>2</sub> (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Trypsin-EDTA 1x (GIBCO 25300-054, Invitrogen)
- Penicillin-Streptomycin 10.000 units/mL (GIBCO 15140-122, Invitrogen)
- Antibiotic/Antimycotic Solution (100x) (GIBCO 15240-062, Invitrogen)
- Hepes pH 7.2-7.5 1M (GIBCO 15630-056, Invitrogen)
- DMEM +1000 mg/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 21885-025, Invitrogen)
- DMEM +4500 mg/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 31966-021, Invitrogen)
- Serum für hMSC-Tert: Foetal Bovine Serum (GIBCO 10270-106, Invitrogen oder F7524, Sigma)
- Serum für 3T3-L1: Calf Serum (GIBCO 16170-078, Invitrogen) und Fetal Bovine Serum (Seromed S-0215, Lot 601U, Biochrom)
- Dexamethason (D4902, Sigma)
- Isobutylmethylxanthin IBMX (I5879, Sigma)
- Insulin human 10 mg/mL (I9278, Sigma)
- Rosiglitazon (71740, Cayman)
- U0126 (662005, Calbiochem)

## Zellen

- hMSC-Tert T20, humane mesenchymale Stammzelllinie [Simonsen et al. 2002]
- 3T3-L1, murine Präadipozytenlinie [Green und Kehinde 1974]
- primäre humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark

### 2.4.1 Adipozytäre Differenzierung von hMSC-Tert Zellen

#### Medien

- Kulturmedium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Standardmedium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Differenzierungsmedium: Standardmedium mit Differenzierungszusätzen 0,1  $\mu$ M Dexamethason, 450  $\mu$ M IBMX, 2  $\mu$ M Insulin, 1  $\mu$ M Rosiglitazon, 1  $\mu$ M U0126  
(Stocklösungen der Differenzierungszusätze in DMSO (IBMX, U0126, Rosiglitazon) oder DMSO/Wasser (Dexamethason) werden aliquotiert bei -20°C gelagert)

#### Methode

Die mesenchymalen Stammzellen hMSC-Tert werden in Kulturmedium passagiert. Für eine adipozytäre Differenzierung werden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von 30.000 Zellen/cm<sup>2</sup> und 1 mL Medium/Well in 24well-Platten ausgesät. Standardmäßig differenzieren die Zellen in den 24wells auf Cover Slips, um zu jedem Zeitpunkt Zellen für Versuche entnehmen zu können. Nach zwei Tagen (Zeitpunkt definiert als Tag 0), wenn die Zellen 80-100% konfluent sind, wird die Differenzierung induziert. Dafür werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 mL Differenzierungsmedium pro Well inkubiert. Dieses wird dreimal pro Woche erneuert, die Zusätze dabei jedes Mal frisch dem Medium zugesetzt. An Tag 12 der Differenzierung werden die Differenzierungsansätze in Protokoll A und B getrennt. Dabei werden die Zellen des Protokolls A weiterhin mit allen Differenzierungszusätzen induziert, die Zellen des Protokolls B erhalten alle Differenzierungszusätze außer Rosiglitazon. Vor dem Wechsel auf das Protokoll B werden die Zellen mit PBS gewaschen. An Tag 19 der Differenzierung werden alle Zellen mit PBS gewaschen und auf Standardmedium gesetzt. Dieser Vorgang dient dem Auswaschen der Differenzierungszusätze aus den Zellen. An Tag 21 wird die Differenzierung beendet. In 96well-Platten wird die Differenzierung nach demselben Protokoll durchgeführt mit einer Ausgangszellzahl von 32.000 Zellen/cm<sup>2</sup> und 200  $\mu$ L Medium pro Well.

## 2.4.2 Adipozytäre Differenzierung von 3T3-L1 Zellen

### Medien

- Kulturmedium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% Calf Serum, 1% Antibiotic/Antimycotic Solution, 10 mM Hepes
- Differenzierungsmedium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% Fetal Bovine Serum, 1% Antibiotic/Antimycotic Solution, 10 mM Hepes

### Methode

Die 3T3-Zellen werden in Kulturmedium so gehalten, dass sie sich immer im Stadium der Subkonfluenz befinden. Sobald sie konfluent werden, setzt die Differenzierung ein. Für die Differenzierung werden die Zellen in Differenzierungsmedium mit einer Dichte von 25.000 Zellen und 100  $\mu$ L Medium pro Well in 96well-Platten ausgesetzt. Für die Differenzierung sollten nur Zellen der Passagen 5 bis 13 benutzt werden. Nach drei Tagen (Zeitpunkt definiert als Tag 0) werden die Zellen mit Differenzierungsmedium inkubiert, das 0,25  $\mu$ M Dexamethason, 500  $\mu$ M IBMX und 1  $\mu$ g/mL (= 172 nM) Insulin enthält. Ab Tag 3 der Differenzierung werden die Zellen dreimal pro Woche mit frischem Differenzierungsmedium ohne Zusätze versorgt. Die Differenzierung läuft 11 bis 17 Tage.

## 2.4.3 Adipozytäre Differenzierung von primären humanen mesenchymalen Stammzellen

Die primären humanen Stammzellen wurden freundlicherweise von Alexej Slobodianski aus der Arbeitsgruppe Dr. Adamietz am Institut für Molekulare Zellbiologie zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach Standardverfahren isoliert. Zusammengefasst dargestellt wird mittels Aspiration Knochenmark aus dem Becken humaner Probanden entnommen. Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgt über die Trennung im Ficoll-Gradienten. Die Zellen werden drei Tage in der Zellkulturflasche kultiviert und der Überstand verworfen. Die adherierte Zellpopulation stellt die mesenchymalen Stammzellen dar. Die Zellen werden wie für die hMSC-Tert Zellen beschrieben (siehe 2.4.1) passagiert und differenziert.

## 2.5 Charakterisierung der Zellmorphologie

### 2.5.1 Fettrot- und DAPI-Färbung

Die Fettrotfärbung (Fettrot bläulich 46290, Fluka) dient der Sichtbarmachung von Neutralfetten – Triglyzeriden und Cholesterolestern –, die im Zytoplasma der differenzierenden Zellen in Vesikeln akkumulieren. Dafür werden durch zweimaliges Waschen mit PBS Mediumreste von den auf Cover Slips wachsenden Zellen entfernt. Die Zellen werden



mit 4% Paraformaldehyd in PBS 30 min lang fixiert und danach einmal mit PBS gewaschen. Nach 2x 2minütigem Waschen mit 50% Ethanol wird pro Cover Slip 1 mL Fettrotlösung (0,3% in 70% Ethanol, über Nacht bei 56°C geschüttelt, frisch filtriert) auf die Zellen gegeben. Nach 10 min wird 3x 3 min mit 50% Ethanol die überschüssige Fettrotlösung abgewaschen, danach 3x je 5 min mit PBS gewaschen. Es schließt sich die Färbung der Zellkerne mit DAPI (D8417, Sigma) an. Dafür wird jeder Cover Slip für 3 min mit 1 mL DAPI-PBS (3 µL DAPI in 100 mL PBS) inkubiert und die Zellen nachfolgend 2x 3 min mit PBS gewaschen. Danach können die Cover Slips mit 0,1% para-Phenyldiamin in Mowiol (475904, Calbiochem) auf Objektträgern eingedeckelt werden. Die Lagerung der Präparate erfolgt lichtgeschützt bei 4°C. Die Fettrotfärbung ist im Durchlicht sichtbar, DAPI-gefärbte Nukleinsäuren bei Anregung mit UV-Licht.

### **2.5.2 Nilrotfärbung**

Eine weitere Möglichkeit, Lipide anzufärben, ist der leicht handzuhabende Fluoreszenzfarbstoff Nilrot (72485, Fluka). Dieses Lysochrom ist in wässriger Lösung nicht fluoreszent. Bei Kontakt mit der anzufärbenden Lipidphase löst es sich schnell in dieser und ist dann mit Wellenlängen zwischen 450 nm und 560 nm anregbar. Die Emmission wird um 590 nm detektiert. Für eine Nilrotfärbung werden die Zellen wie für die Fettrotfärbung beschrieben fixiert und mit PBS gewaschen. Die Nilrotstocklösung von 20 µg/mL in Aceton wird in PBS auf eine Endkonzentration von 0,2 µg/mL verdünnt. Die Cover Slips werden in 1 mL davon jeweils 5 min inkubiert. Es folgt 3x 5minütiges Waschen mit PBS, DAPI-Färbung und Eindeckeln wie bereits beschrieben.

## **2.6 Molekulare Charakterisierung des Zellmodells**

### **2.6.1 Präparation von RNA**

Um die Expression charakteristischer adipozytärer Marker auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten Gesamt-RNA aus den Zellen präpariert. Dafür wurde das Reagenz Trizol (15596-026, Invitrogen) verwendet und das Produktprotokoll befolgt. Kurz zusammengefasst werden dabei die mit PBS gewaschenen Zellen direkt im Well mit Trizol (maximal 200 µL pro 24Well) lysiert. Einfrieren bei -80°C steigert die Effizienz der Lyse. Durch Zugabe von Chloroform zum Lysat erfolgt eine Phasentrennung, wobei sich die Gesamt-RNA in der oberen wässrigen Phase befindet. Daraus wird die RNA durch Zusatz von Isopropanol gefällt. Das Pellet wird mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Proben werden bei -80°C gelagert. Die Konzentration von RNA in der Probe wird mittels einer photometrischen Messung abgeschätzt. Dafür wird die Absorption bei 260 nm bestimmt.

Es gilt  $A_{260} = 1,0$  entspricht 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNA. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Probe, der optimale Wert liegt bei 1,8. Weiterhin wird die Qualität der Probe im 1%igen Agarose-TBE-Gel (TBE = 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1,6 mM EDTA) untersucht. Im UV-Licht wird die mit Ethidiumbromid gefärbte ribosomale RNA sichtbar als 18S-RNA Bande und eine darüber liegende 28S-RNA Bande, die bei guter Probenqualität doppelt so stark erscheint.

### 2.6.2 Schreiben von cDNA

Für die Umschreibung in cDNA wird 1  $\mu\text{g}$  RNA verwendet. Die RNA wird mit 0,5  $\mu\text{g}$  Primer Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Y01212) und 10 U Ribonuklease Inhibitor (RNAsin 15518-012) für 10 min bei 70°C vorinkubiert. Es folgt eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C mit 0,5 mM dNTPs (10297-018), 200 U Reverser Transkriptase M-MLV (28025-013) und 10 mM DTT in einem Puffer aus 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl und 3 mM  $\text{MgCl}_2$ . Alle Reagenzien sind Produkte der Firma Invitrogen. Durch die Verwendung von Oligo(dT)-Primern, die an die Poly(A)Schwänze der mRNA binden, wird nur die messenger-RNA in cDNA umgeschrieben. Die Konzentration der Probe wird ebenfalls photometrisch bestimmt, wobei eine Verunreinigung durch die im Überfluss zugesetzten einfachen Nukleotide angenommen werden muss. Diese kann zu einem erhöhten Wert für die Konzentration führen. Es gilt  $A_{260} = 1,0$  entspricht 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doppelsträngiger cDNA. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  beträgt auch hier optimal 1,8.

### 2.6.3 RT-PCR

Die zu untersuchenden Marker werden mittels RT-PCR vervielfältigt und anschließend im Agarosegel über die Größe des Produktes detektiert. Für die Reaktion werden 0,2  $\mu\text{g}$  cDNA in einem Volumen von 25  $\mu\text{L}$  eingesetzt (Endkonzentration 8 ng/ $\mu\text{L}$ ). Das Reaktionsgemisch enthält 5 U Taq Polymerase (18038-042), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM dNTPs (10297-018), je 800 nM forward und reverse Primer der gewünschten Spezifität in einem Puffer von 20 mM Tris-HCl pH 8,4 und 50 mM KCl. Alle Reagenzien stammen von Invitrogen, die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die Angaben zu den in dieser Arbeit verwendeten Primern sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Reaktion erfolgt nach einem für den jeweiligen Marker optimierten Protokoll im Thermocycler (siehe Tabelle 3). In jedem Experiment wird eine Wasserkontrolle mitgeführt, um ein falschpositives Ergebnis durch DNA-Verunreinigungen auszuschließen. Als Referenzgen dient GAPDH. Das Produkt der PCR wird im 2%igen Agarose-TBE-Gel aufgetrennt und anhand der Größe identifiziert.

Gen		Sequenz	Produkt	Protokoll	Exon	Referenz
LDLR	forward reverse	CCT ACC TCT TCT TCA CCA ACC g CCA TgA ACA ggA TCC ACC ACg	390 bp	23, 24	9 10	Schnieders
LRP1	forward reverse	CAT gCT gCC TTC Agg gAg AC ggA gAg CCT Tgg CAA AgT gTC	135 bp	15		Laatsch et al. 2004
ADD1 =SREBP1c	forward reverse	ggA gCC ATg gAT TgC ACT TTC ATC TTC AAT ggA gTg ggT gCA g	261 bp	18	1c 2	Ribot et al. 2001
PPAR $\gamma$ 2	forward reverse	TTC TCC TAT TgA CCC AgA AAg C CTC CAC TTT gAT TgC ACT TTg g	307 bp	20, 21		Justesen et al. 2002
LPL	forward reverse	gAg ATT TCT CTg TAT ggC ACC CTg CAA ATg AgA CAC TTT CTC	275 bp	12		Justesen et al. 2002
Apo E	forward reverse	ggT ggA gCA AgC ggT ggA gAC gCT CCT CCT gCA CCT gCT CAg AC	149 bp	13		Laatsch
aP2	forward reverse	Tgg TTg ATT TTC CAT CCC AT CAg TTT AAg gAC Cgg gTC AT	114 bp	12		Pittenger et al. 1999
GAPDH	forward reverse	ACC ACA gTC CAT gCC ATC AC TTC ACC ACC CTg TTg CTg TA	452 bp	14		

Tabelle 2: Übersicht der in der RT-PCR verwendeten Primer

Protokoll						
12	95°C 10 min	95°C 30 sec	60°C 30 sec	72°C 60 sec	72°C 7 min	4°C
		40 Zyklen				
13	95°C 5 min	95°C 30 sec	69°C 30 sec	72°C 30 sec	72°C 8 min	4°C
		35 Zyklen				
14	95°C 5 min	95°C 30 sec	67,2°C 30 sec	72°C 30 sec	72°C 8 min	4°C
		35 Zyklen				
15	95°C 5 min	95°C 30 sec	65°C 60 sec	72°C 30 sec	72°C 8 min	4°C
		35 Zyklen				
18	95°C 10 min	95°C 30 sec	61°C 30 sec	72°C 30 sec	72°C 7 min	4°C
		40 Zyklen				
20	95°C 10 min	95°C 30 sec	60°C 30 sec	72°C 30 sec	72°C 7 min	4°C
		38 Zyklen (42 Zyklen = Protokoll 21)				
23	94°C 5 min	94°C 60 sec	61°C 60 sec	72°C 60 sec	72°C 7 min	4°C
		35 Zyklen (42 Zyklen = Protokoll 24)				

Tabelle 3: Zusammenstellung der in der RT-PCR verwendeten Protokolle

## 2.6.4 Quantitative real time PCR

Um die Expressionshöhe bestimmter Marker zwischen den verschiedenen Differenzierungszeitpunkten tatsächlich quantitativ vergleichen zu können, wurde das Multiplex Quantitative PCR System Mx4000 (Stratagene) und der Farbstoff SYBR<sup>®</sup>Green verwendet. Hierbei wird in einer PCR-Reaktion mit einem spezifischen Primerpaar die gewünschte Ziel-DNA vervielfältigt. SYBR<sup>®</sup>Green lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA-Abschnitte ein und gibt daraufhin bei Anregung ein Fluoreszenzsignal ab. Die Höhe des Fluoreszenzsignals wird nach jedem Zyklus gemessen. Das Signal steigt proportional zur Menge des PCR-Produktes in der Reaktion an. Im Bereich der exponentiellen Phase dieses Anstiegs wird für jede Messung signifikant über der Grundlinie ein Fluoreszenzschwellenwert festgelegt. Über diesen Weg wird der sogenannte C<sub>T</sub>-Wert der Probe bestimmt, der definiert ist als die Zyklusanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal den festgelegten Schwellenwert übersteigt. Der C<sub>T</sub>-Wert ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich vorhandenen Anzahl der DNA-Matrizen in der Probe. Aus der Steigung der Kurve im Bereich des exponentiellen Anstiegs kann die Effizienz der Reaktion berechnet werden (PCR-Effizienz =  $2^{(-1/\text{Steigung} \times \log 2)}$ ). Im verwendeten Versuchssystem wird jede Probe in mehreren Verdünnungen gemessen. Aus den Messwerten dieser Proben wird eine Standardkurve erstellt, die dazu dient, die PCR-Effizienz zu errechnen. Der C<sub>T</sub>-Wert wird in jeder Probe für den zu untersuchenden Marker sowie für ein Referenzgen gemessen, dessen Expression im untersuchten System nicht reguliert wird. Der ermittelte C<sub>T</sub>-Wert des Markers wird auf den des Referenzgens normalisiert. Die Expression des Markers kann im Vergleich zweier Proben als relativer Wert angegeben werden. Nach abgeschlossener Amplifikation generiert das Gerät über einen graduellen Anstieg der Temperatur eine Schmelzkurve, die über das Absinken der Fluoreszenz die Schmelzpunkte entstandener Produkte bestimmt. Schmelzpunkte unter 75°C rühren meist von unspezifischen Nebenprodukten her. So kann kontrolliert werden, ob tatsächlich das gewünschte Produkt quantifiziert wird. Als weitere Absicherung kann das PCR-Produkt im 2%igen Agarose-TBE-Gel aufgetrennt und über die Bestimmung der Größe identifiziert werden.

Für die durchgeführten Analysen wurde der SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix (4309155) von Applied Biosystems verwendet. Dieser enthält im fertigen 2x-Gemisch den Farbstoff SYBR<sup>®</sup>Green, das Hotstart-Enzym AmpliTaq Gold<sup>®</sup>DNA Polymerase, dNTPs und den Referenzfarbstoff ROX<sup>™</sup>. Dieser dient der Normalisierung von Variationen zwischen den Reaktionsansätzen einer Messung. Für die Messung wird in einem Gesamtvolumen von 25 µL der Master Mix 1:2 verdünnt und je 150 nM beider Primer, im unverdünnten Ansatz 1 µg cDNA sowie in weiteren Ansätzen Verdünnungen der Probe von 1:4, 1:16, 1:64 und 1:256 eingesetzt. Als Referenzgen dient β<sub>2</sub>-Microglobulin. Die Reaktion läuft nach folgendem Protokoll ab: 3 min 95°C (Denaturierung der cDNA); 45 Zyklen mit 20 sec 95°C (Schmelzen der Doppelstränge), 30 sec 59°C (Annealing der Primer), 24 sec 72°C

(Verlängerung des neu synthetisierten Stranges durch das Enzym), 24 sec 78°C (Messen der Fluoreszenz über dem Schmelzpunkt von möglichen Primer-Dimeren); 1 min 95°C und 80 Zyklen mit Messintervallen von 30 sec bei jeweiliger Erhöhung der Temperatur um 1°C ausgehend von 55°C (Aufnahme der Schmelzkurve).

In der Auswertung werden die für jede Verdünnung einer Probe bestimmten  $C_t$ -Werte mithilfe der PCR-Effizienz der Reaktion auf die der Ausgangsverdünnung entsprechenden  $C_t$ -Werte zurückgerechnet [errechneter  $C_t = \text{gemessener } C_t - \log(\text{Verdünnungsfaktor}) / \log(\text{PCR-Effizienz})$ ]. Diese Werte werden gemittelt und davon der mittlere  $C_t$ -Wert des Referenzgens der Probe subtrahiert. Wird der so entstandene  $\Delta C_t$ -Wert auf den einer anderen Probe bezogen ( $=\Delta\Delta C_t$ ) kann für die Expressionshöhe des untersuchten Markers ein relativer Wert angegeben werden [Expression in % =  $\text{PCR-Effizienz}^{\Delta\Delta C_t}$ ]. Für die hier durchgeführten Expressionsanalysen wurden alle Ergebnisse auf die Expression der Marker an Tag 7 der Differenzierung bezogen. Zu diesem Zeitpunkt waren alle getesteten Marker verlässlich detektierbar.

Gen		Sequenz	Produkt	Exon	Referenz
$\beta_2$ -Microglobulin	forward reverse	TAC ATg TCT CgA TCC CAC TTA ACT AT AgC gTA CTC CAA AgA TTC Agg TT	295 bp	1, 2 2, 3	Lupberger et al. 2002
GLUT1	forward reverse	gCC ATA CTC Atg ACC ATC gC AgC TCC TCg ggT gTC TTA TC	225 bp		Armoni et al. 2002
GLUT4	forward reverse	CTT CgA gAC AgC Agg ggT Ag Agg AgC AgA gCC ACA gTC AT	180 bp		Prawitt

**Tabelle 4: Übersicht der in der quantitativen real time PCR verwendeten Primer**

### 2.6.5 Herstellung von Gesamtzelllysat

Zur Herstellung von unfraktionierten Proteinproben aus Zellen werden diese mit kaltem PBS gewaschen und in Zelllysispuffer abgelöst. Dieser enthält 50 mM Tris pH 8, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 80 mM NaCl und 1% Triton X-100. Das Lysat steht 5 min auf Eis und wird dann 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dabei sedimentieren vor allem die Zellkerne. Der Überstand enthält insbesondere zytosolische Proteine und nicht integrale Membranproteine. Die Proben werden bei -20°C gelagert.

### 2.6.6 Herstellung von membranangereicherten Proteinproben

Die Zellen einer 24well-Platte werden für die Herstellung membranangereicherter Proteinfractionen in 1,2 mL Homogenisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 M Saccharose) vereinigt. Den Proben wird ein Gemisch aus Proteaseinhibitoren PIC (1 mM PepstatinA 516481, 10 mM Chymostatin 230790, 10 mM

Leupeptin 108975, 10 mM Antipain 178220, alle Calbiochem) im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Die Proben werden im Ultra-Turrax homogenisiert, um die Zellen zu vereinzeln. Zur Abscheidung großer Aggregate wird 15 min bei 800xg und 4°C zentrifugiert, die Zentrifugation mit dem abgenommenen Überstand wiederholt. Nachfolgend werden in der Ultrazentrifuge (Beckmann TL100 mit Festwinkelrotor 100.2 in Röhrchen #347287) bei 100.000xg und 4°C für eine Stunde die Membranen sedimentiert, während die zytosolischen Proteine in Lösung bleiben. Das Pellet wird vorsichtig mit einer 27"-Kanüle in 0,2 mL Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 80 mM NaCl, 1% Triton X-100, PIC 1:1000) suspendiert. Eine weitere Ultrazentrifugation bei 100.000xg und 4°C für 30 min lässt vornehmlich Kernmembranen und Mitochondrien absinken, während sich im Überstand Membranen der Plasmamembran, des Golgiapparates, des Endoplasmatischen Retikulums, sowie Lysosomen und Mikrosomen anreichern.

### 2.6.7 Herstellung von phosphoryliertem Protein

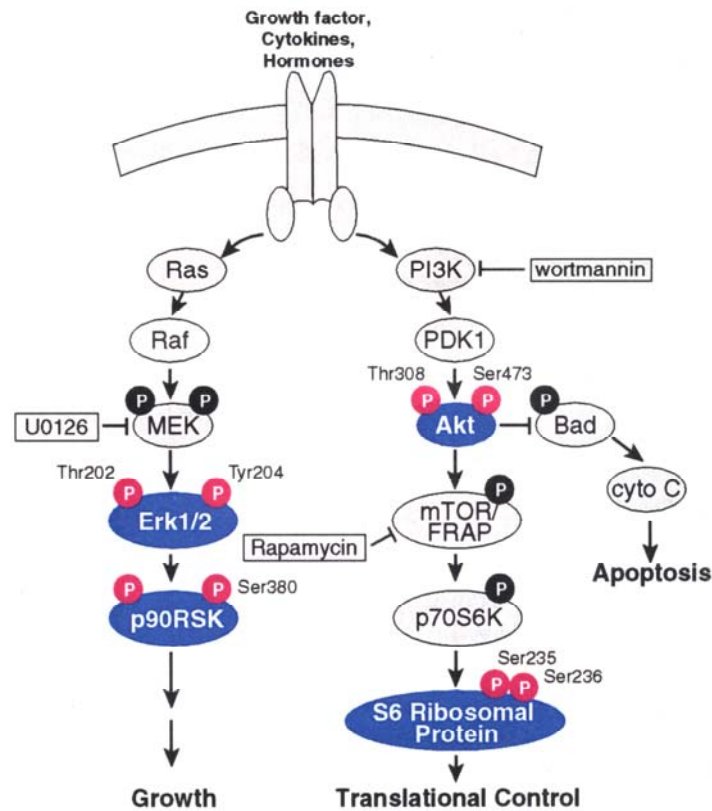
#### Material

- Hungermedium: DMEM (1000 mg/L Glukose), 1% fettsäurefreies BSA (A8806, Sigma), 1% Penicillin/Streptomycin
- Inkubationsmedium: 1x Krebs-Ringer-Puffer mit 118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 20 mM Hepes pH 7,5; 0,5% fettsäurefreies BSA
- RIPA-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM Na-Pyrophosphat, 50 mM NaF, 1% Nonidet P40; frisch zugesetzt 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10% SDS, Complete Mini Protease Inhibitor (11836153001, Roche)
- PathScan Multiplex Western Cocktail I (7100, Cell Signaling Technology)

#### Methode

Die Untersuchung von Proteinphosphorylierungen in Folge eines Insulinstimulus wurde in den Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung durchgeführt. Um den Einfluss der Differenzierungszusätze auf das Experiment zu minimieren, werden die Zellen für einen Tag in Standardmedium ohne Zusätze kultiviert und anschließend über Nacht gehungert. Es wird mit warmem Inkubationsmedium gewaschen und mit Inkubationsmedium mit und ohne 50 nM Insulin für 15 min bei 37°C im Kleinbrutschrank ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Waschen mit kaltem PBS wird eiskalter RIPA-Puffer aufgegeben. Die Zellen werden mittels Sonifizieren (10 sec mit 20% Amplitude) vollständig lysiert. Die Proteinkonzentration in der Probe wird bestimmt und ein Western Blot unter Verwendung des PathScan Multiplex Western Kit durchgeführt. Dabei wird im TBS/Tween System mit Antikörperkonzentrationen von 1:200 (1. Antikörper) und 1:2000 (2. Antikörper) die

Phosphorylierung von Proteinen des Akt- und des MAPKinase-Signalweges getestet (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schema der mittels PathScan Western Blot detektierbaren Signalwege**

Im Multiplex Western wird ein Gemisch aus primären Antikörpern verwendet. Diese sind gegen die aktivierte Form der im Schema blau dargestellten Signalproteine gerichtet. Tatsächlich erkennen die Antikörper die im Schema rot dargestellten Phosphorylierungen. Abbildung ©Cell Signaling Technology, Inc.

### 2.6.8 Proteinbestimmung im SDS-Lowry

Die Proteinkonzentration aller hergestellten Proben wurde im SDS-Lowry bestimmt, einem modifizierten Protokoll der ursprünglich beschriebenen Methode [Lowry et al. 1951]. Dabei werden 20 µL der Probe 1:5 in 0,1 N NaOH verdünnt. Von einer Lösung mit 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,02% NaK-Tartrat, 0,01% CuSO<sub>4</sub> und 0,1% SDS in 0,1 N NaOH (CuSO<sub>4</sub> und SDS frisch aus 0,5% CuSO<sub>4</sub> bzw. 5% SDS-Stocklösung verdünnt) wird 1 mL dazugegeben. Je ein Kupferion bildet mit mindestens zwei Peptidbindungen des Proteins einen rotvioletten Farbkomplex. Nach 10 min werden 100 µL Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, frisch 1:1 in Wasser verdünnt, hinzugefügt. Dieses wird durch bestimmte Aminosäuren im Protein (vor allem Tyrosin und Tryptophan) unterstützt vom Kupfer-Protein-Komplex reduziert, wobei eine tiefblaue Färbung entsteht. Die Proben werden 30 min im Dunkeln inkubiert und

dann das Absorptionsmaximum der Probe bei 760 nm gemessen. Mithilfe einer durch BSA-Standardlösungen ermittelten Eichgerade wird die Proteinkonzentration bestimmt.

### **2.6.9 Triglyzeridbestimmung**

Die Bestimmung der Triglyzeridkonzentration im Gesamtzelllysat wurde unter Verwendung eines enzymatischen Kits (Triglyceride GPO-PAP 1488899, Roche) durchgeführt. Die darin enthaltene Lipoproteinlipase setzt aus den Triglyzeriden der Probe Glycerin frei. Dieses wird in mehreren enzymatischen Reaktionen unter der Entstehung von Wasserstoffperoxid umgewandelt. Dessen äquimolare Umsetzung mit Aminophenazon und Chlorphenol bewirkt die Bildung eines roten Farbstoffes, der ein Absorptionsmaximum bei 546 nm aufweist. Für die Bestimmung werden 100 µL der Probe mit 200 µL Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wird der Ansatz vermessen. Aus der mithilfe eines Standardserums erstellten Eichgerade wird die genaue Konzentration der Triglyzeride in der Probe ermittelt.

### **2.6.10 Cholesterolbestimmung**

Der Gesamtcholesterolgehalt der Proben wurde ebenfalls über einen enzymatischen Nachweis bestimmt (Amplex<sup>®</sup> Red Cholesterol Assay Kit A12216, Molecular Probes). Als Ester gebunden vorliegendes Cholesterol wird mittels Cholesterolesterase freigesetzt. Bei der anschließenden Oxidation des freien Cholesterols entsteht Wasserstoffperoxid. Dieses wird mit dem Amplex Red Reagenz und der Horseradish Peroxidase (HRP) stöchiometrisch umgesetzt unter Entstehung des Farbstoffs Resorufin. Es werden 50 µL der Probe, wenn nötig verdünnt im Reaktionspuffer, mit 50 µL Reagenz vermischt. In der Endkonzentration enthält der Reaktionsansatz 150 µM Amplex<sup>®</sup> Red Reagenz, 1 U/mL HRP, 1 U/mL Cholesteroxidase und 0,1 U/mL Cholesterolesterase. Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und danach im Fluorometer vermessen. Die Anregung erfolgt bei 530 nm, die Emission wird bei 590 nm detektiert. Mithilfe eines Standards wird die Konzentration des Gesamtcholesterols in der Probe berechnet.

### **2.6.11 Phospholipidbestimmung**

Für die Bestimmung der Phospholipidkonzentration (Lecithin, Lysolecithin und Sphingomyelin) wurde ein enzymatisches Reagenz benutzt (999-54006, Wako). Dabei werden die Lipide durch die Phospholipase D hydrolysiert und das freigewordene Cholin weiter umgesetzt. Nach einer Farbreaktion unter Beteiligung von Phenol und 4-Aminoantipyrin wird die Absorption bei 505 nm gemessen. Der Gehalt von Phospholipiden in der Probe wird über die Vermessung eines Standards bestimmt.



## 2.6.12 SDS-PAGE und Western Blot

### Material

- Gradientengele NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gele (NP0321, Invitrogen)
- Laufpuffer NuPAGE® MES SDS Running Buffer 20x (NP0002, Invitrogen)
- Probenpuffer: 1 Volumenteil Mercaptoethanol, 1 Volumenteil 87% Glycerin mit Bromphenolblau, 2 Volumenteile 10% SDS in 50 mM Tris-HCl pH 8
- Regenbogenmarker RPN756 oder RPN800 (Amersham)
- Blottingpuffer: 150 mM Glycin, 20 mM Tris, 20% Methanol
- Ponceau S-Lösung: 0,2% in 3% Trichloressigsäure (Serva)
- Blocklösung: 10% Milchpulver, 5% BSA in Waschpuffer A
- Waschpuffer A: 154 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween 20, pH 7,4
- Waschpuffer B: 154 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween 20, 0,25% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, pH 7,4
- ECL Western Blotting Detection Reagent (RPN2209, Amersham)

### Methode

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in 4-12%igen Gradientengelen in einem MES-SDS-Puffer System. Die Proben werden dafür im Verhältnis 6:4 mit Probenpuffer gemischt und vor dem Auftragen bei 95°C bzw. bei 40°C für 10 min denaturiert. Die Spuren des Gels werden mit gleichen Proteilmengen beladen. Als Massenkontrolle dient ein gefärbter Proteinstandard. Die Proteine werden im Gel bei 100 V für ca. 45 min aufgetrennt und das Gel dann nass in Blottingpuffer auf eine Nitrocellulosemembran mit 0,45 µm Porengröße geblottet. Dieser Vorgang erfolgt bei 4°C und 200 mA über Nacht oder bei 400 mA über 4 h. Die geblottete Membran wird in Ponceau S-Lösung gefärbt, um die gleichmäßige Beladung der Spuren zu kontrollieren. Nach dem Blockieren der Membran für eine Stunde wird mit dem ersten Antikörper (in 5% BSA in Waschpuffer A) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird 1 min mit Waschpuffer A, 2x 10 min mit Waschpuffer B und 1 min mit Waschpuffer A gewaschen. Es folgt die Inkubation für 2 Stunden mit dem 2. Peroxidase-gekoppelten Antikörper in Blocklösung. Danach wird wie oben beschrieben gewaschen und mit ECL detektiert. Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Protein	Größe [kDa]	Reduktion	Antikörper	Hersteller	Verdünnung
SREBP1c =ADD1	125 Vorläufer 68 geschnitten	95°C	H-160 rabbit	Santa Cruz	1:250
Perilipin	A 62; B 46	40°C	ab3527 rabbit	abcam	1:1000
ApoE	34	95°C	rabbit	DAKO	1:1000
FAS	265	95°C	Clone 23 mouse	BD Transduction	1:1200
aP2	15	95°C	rabbit	Niederfellner	1:1000
Caveolin1	22	95°C	C13630 rabbit	BD Transduction	1:7500
β-Aktin	42	40°C	AC-15 mouse	Sigma	1:30.000
LDLR	160	40°C	61049 chicken	Progen	1:100
VLDLR	180	40°C	6A6 mouse	Heeren	1:200
LRP1	85	40°C	Dolly	Heeren	1:250
RAP	39	95°C	rabbit	Glieman, DK	1:10.000
IR (β-UE)	95	40°C	Sc-711 rabbit	Santa Cruz	1:1000
IRS-1	170	40°C	06-248 rabbit	Upstate	1:1000
IRS-2	170	40°C	06-506 rabbit	Upstate	1:1000
GAMPO			Goat anti mouse 115-035-146	Jackson/Dianova	1:5000
GARPO			Goat anti rabbit 111-035-144	Jackson/Dianova	1:5000
DACPO			Donkey anti chicken 703-035-155	Jackson/Dianova	1:2500
DASPO			Donkey anti sheep 713-035-147	Jackson/Dianova	1:5000

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper

## 2.7 Funktionale Charakterisierung des Zellmodells

### 2.7.1 <sup>3</sup>H-Desoxyglukoseaufnahme

#### Material

- 10x Krebs-Ringer-Puffer (KRP): 118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 mM MgSO<sub>4</sub>x 7H<sub>2</sub>O, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>x 2H<sub>2</sub>O
- KRPH (KRP-Hepes): 1x KRP, 15 mM Hepes pH 7,4
- KGD: 200 μM D-Glucose, 112 nM <sup>3</sup>H-Desoxyglukose in KRPH

#### Methode

Für die Messung der Glukoseaufnahme wird <sup>3</sup>H-markierte Desoxyglukose (2-Deoxy-D-[1-<sup>3</sup>H]-Glucose mit 250 μCi/250 μL TRK 383, Amersham) verwendet, die in der Zelle

aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe nicht weiter verstoffwechselt werden kann. Die Zellen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der Differenzierung genommen, für mindestens einen Tag auf Standardmedium gesetzt, um die Differenzierungszusätze auszuwaschen, und über Nacht gehungert. Die Zellen werden mit warmem KRPH gewaschen und die radioaktive Lösung KGD mit der entsprechenden Insulinkonzentration aufgegeben. Bei Differenzierungen in der 24well-Platte werden 500  $\mu\text{L}$  pro Well, bei Differenzierungen in der 96well-Platte 100  $\mu\text{L}$  pro Well eingesetzt. Die verschlossene Platte wird bei 37°C genau eine Stunde inkubiert. Anschließend wird die Radioaktivität abgenommen, gründlich gewaschen und die Zellen in 0,1 N NaOH lysiert. Das Lysat wird mit Szintillatorflüssigkeit gemischt und im  $\beta$ -Counter die Radioaktivität pro Probe bestimmt.

Die Aufnahmeversuche in 3T3-L1 und hMSC-Tert Adipozyten erfolgten mit 112 nM  $^3\text{H}$ -Desoxyglukose in Anwesenheit von 200  $\mu\text{M}$  nicht markierter D-Glukose. Die Experimente in differenzierten hMSC-Tert Zellen und primären Stammzellen wurden mit 45,5 nM  $^3\text{H}$ -Desoxyglukose in Anwesenheit von 200  $\mu\text{M}$  nicht markierter D-Glukose durchgeführt. Die Hemmung der Glukoseaufnahme durch Cytochalasin B wurde nach folgendem Versuchsaufbau untersucht: die Zellen wurden 10 min mit bzw. ohne 50 nM Insulin bei 37°C inkubiert, danach 10 min mit bzw. ohne 50 nM Insulin und mit bzw. ohne 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B, weiterhin 10 min mit bzw. ohne 50 nM Insulin und 56 nM  $^3\text{H}$ -Desoxyglukose.

### 2.7.2 $^{125}\text{I}$ -Lipoproteinaufnahme

Die Messung der Lipoproteinaufnahme erfolgte unter Verwendung von Low Density Lipoproteins (LDL), Chylomikronenremnants (CR) und Chylomikronen (CM). Diese werden mittels Ultrazentrifugation aus humanem postprandialem Plasma isoliert. Die Konzentration der hergestellten Lösung wird über die Proteinbestimmung im SDS-Lowry ermittelt. Mittels der Iodmonochloridmethode werden in den Partikeln die Proteinanteile mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markiert. Über die Vermessung im  $\gamma$ -Counter wird die spezifische Aktivität (cpm/ $\mu\text{g}$  Protein) der Probe bestimmt. Die spezifische Aufnahme wird ermittelt, indem die Aufnahme radioaktiv markierter Lipoproteine allein verglichen wird mit der Aufnahme markierter Partikel in Anwesenheit von einem mindestens 30fachen Überschuss nicht markierter Partikel (Kaltunterdrückung).

Für den Versuch werden Zellen verwendet, die mindestens einen Tag in Standardmedium ohne Differenzierungszusätze kultiviert und nachfolgend über Nacht gehungert werden. Die Zellen werden mit warmem Inkubationsmedium (siehe Punkt 2.6.7) gewaschen und – wenn die Messung der insulinabhängigen Aufnahme vorgesehen ist – für 10 min in Inkubationsmedium mit bzw. ohne 50 nM Insulin vorinkubiert. Anschließend wird Inkubationsmedium aufgegeben, welches die radioaktiv markierten

Lipoproteine bzw. radioaktiv markierte und nicht markierte Lipoproteine in der gewünschten Konzentration enthält und – bei Untersuchung der Insulinabhängigkeit – auch 50 nM Insulin. Nach 30 min wird die Radioaktivität abgenommen, mit PBS und PBS-Heparin (100 U/mL) gewaschen, die Zellen in 0,1 N NaOH lysiert und das Lysat im  $\gamma$ -Counter gemessen.

Die Untersuchung der Chylomikronenremnant-Aufnahme unter Einfluss von Rosiglitazon und Insulin wurde wie folgt durchgeführt: Differenzierte hMSC-Tert Zellen (Tag 19) wurden für 2 Tage in Standardmedium ohne Differenzierungszusätze kultiviert. Die differenzierten und die Kontrollzellen wurden über Nacht gehungert (siehe Punkt 2.6.7) in 4 verschiedenen Ansätzen: ohne Zusätze, mit 2  $\mu$ M Insulin, mit 1  $\mu$ M Rosiglitazon, mit 2  $\mu$ M Insulin und 1  $\mu$ M Rosiglitazon. Die Messung der  $^{125}$ I-Chylomikronenremnant-Aufnahme erfolgte am nächsten Tag in Hungermedium. Dafür wurden von den Zellen unter Beachtung der unterschiedlichen Ansätze Überstände abgenommen und vereinigt. Mit diesen abgenommenen Überständen wurde eine Lösung von radioaktiv markierten Partikeln in Hungermedium 1:6 verdünnt und wieder auf die gewaschenen Zellen aufgegeben. Die Endkonzentration der markierten Partikel betrug 10  $\mu$ g/mL, die Kaltunterdrückung erfolgte mit 66fachem Überschuss. Die Zellen wurden so eine Stunde bei 37°C inkubiert. Waschen und Vermessen der Proben erfolgte wie oben beschrieben.

### 2.7.3 Sekretionsmessungen im Zellkulturüberstand

Im Zellkulturüberstand wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung die Sekretion von Apolipoprotein E, Adiponektin und Interleukin 6 gemessen. Dabei wurden Zellen verglichen, die zwei Tage vor dem Experiment in Standardmedium mit Differenzierungszusätzen (mit Zusätzen) oder nur in Standardmedium (ohne Zusätze) kultiviert wurden. Für den Versuch wurden die Zellen über Nacht in Standardmedium mit bzw. ohne 1  $\mu$ M Rosiglitazon gehalten. Die Überstände wurden abgenommen und mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Konzentration des zu untersuchenden Proteins bestimmt. Diese Werte wurden auf den Zellproteingehalt normalisiert.

Für die Messung von Adiponektin und Interleukin 6 wurden kommerzielle Sandwich-ELISAs verwendet (Quantikine human Adiponectin DRP300 und Quantikine human IL-6 D6050, R&D Systems). Die Konzentration des Apolipoprotein E wurde mit einem im Labor Beisiegel entwickelten Sandwich-ELISA gemessen. Dabei dient der monoklonale EE7 [Havekes et al. 1987] als Köder-Antikörper, als 2. Antikörper ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (A0077, DAKO) in einer Endverdünnung von 1:7400 und als Detektions-Antikörper ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper aus der Ziege (GARPO 111-035-144, Jackson/Dianova) in einer Verdünnung von 1:60.000. Als Substrat wurde Tetramethylbenzidin verwendet, dessen Farbumschlag bei 450 nm detektiert wird. Die

Standardkurve wurde aus einem humanen Plasmapool in einer Konzentration von 0 bis 64 ng/mL erstellt, als Positivkontrolle wurde ein Kontrollserum der Firma Boehringer mitgeführt. Für die Messung von Apolipoprotein E wurden die Zellen über Nacht in Hungermedium mit bzw. ohne 1  $\mu$ M Rosiglitazon gehalten, da der Serumgehalt im Standardmedium (5%) einen zu hohen Hintergrund verursacht.

## 2.8 Untersuchung des Zellproteoms

### 2.8.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

#### Material

- alle verwendeten Chemikalien haben mindestens p.A. Qualität oder eine höhere Reinheitsstufe (PlusOne Produktschiene, Amersham)
- 2D-Lysispuffer: 8 M Harnstoff, 4% Chaps, 1% Pharmalyte 3-10 (17-0456-01, Amersham), 60 mM DTT, Protease Inhibitor Complete Mini
- Rehydrierungspuffer: 8 M Harnstoff, 0,5% Chaps, 0,5% IPG Puffer pH 4-7 (17-6000-86, Amersham), 15 mg/mL Destreak Reagenz (17-6003-18, Amersham)
- Equilibrierungspuffer: 6 M Harnstoff, 2% SDS, 30% Glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,001% Bromphenolblau
- 2D-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1% SDS
- Coomassielösung: 0,025% Coomassie R-350 (PhastGel Blue 17-0518-01, Amersham) in 10% Essigsäure
- 2D-Quant Kit (80-6486-22, Amersham)
- Immobiline Dry Strip pH 4-7 (17-6002-46, Amersham)

#### Methode

Für die Untersuchung des Gesamtzellproteins mittels Proteomanalyse wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung geerntet. Die Zellen werden gewaschen, in 2D-Lysispuffer abgelöst, mit einer Amplitude von 10% sonifiziert und für 10 min mit 12.000 rpm zentrifugiert. Da der hohe Lipidgehalt der Proben eine starke Trübung verursacht, werden die Proben vor der Verwendung delipidiert. Dafür werden 100  $\mu$ L der Probe mit 1 mL  $\text{CCl}_4/\text{MeOH}$  8:5 (w/w) gefällt, das Pellet mit Aceton gewaschen und in 2D-Lysispuffer wieder aufgenommen. Sorgfältiges und vollständiges Lösen des Pellets ist dabei essentiell. Die Proteinkonzentration wird mithilfe des 2D-Quant Bestimmungskits, der im System des Lysispuffers nicht gestört wird, ermittelt. Gleiche Proteinmengen der Proben werden mit Rehydrierungspuffer auf 450  $\mu$ L aufgefüllt. Die isoelektrische Fokussierung, die sogenannte erste Dimension, wird nach der Reswelling-Methode durchgeführt. Dabei wird das Probenvolumen von 450  $\mu$ L in einen speziellen Streifenhalter aus Keramik pipettiert, ein gefriergetrockneter Gelstreifen mit einem pH-Gradienten 4-7

mit der Gelseite nach unten aufgelegt und mit Mineralöl überschichtet. Das Einquellen der Probe in den Gelstreifen und die anschließende isoelektrische Fokussierung laufen bei einem Spannungsprotokoll mit 12 h 30 V, 1 h 500 V, 1 h 1000 V, 8.20 h 8000 V in der IPGphor ab. Der Gelstreifen mit den nach isoelektrischem Punkt aufgetrennten Proteinen wird danach umgepuffert, je 15 min in Equilibrierungspuffer mit 1% DTT zur Reduktion der Proteine und in Equilibrierungspuffer mit 2,5% Iodacetamid zur Acetylierung der reduzierten Gruppen. Der Gelstreifen wird auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgebracht und mit 0,5%iger Agarose in 2D-Laufpuffer luftdicht versiegelt. Die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt über Nacht in der Ettan DALTwelve Kammer mit einer Leistung von 1 W pro Gel im 2D-Laufpuffer. Anschließend werden die Gele 10 min in 90°C heißer Coomassielösung gefärbt, in 10%iger Essigsäure für 2 Stunden entfärbt und die Färbung über Nacht in 0,5% Essigsäure nachgeschärft. Die Gele werden durch Scannen dokumentiert.

## 2.8.2 Gelpunktverarbeitung und Massenspektrometrie

### Material

- alle verwendeten Lösungsmittel haben GC-Qualität
- Trypsin: Schweinetrypsin, Sequenzing Grade Modified Trypsin (GPR V5111, Promega)
- Matrix:  $\alpha$ -hydroxy-cyano Zimtsäure (M001, LaserBio Labs)

### Methode

Proteinpunkte von Interesse werden zur weiteren Verarbeitung mit dem Spotpicker als Gelpunkt mit 2 mm Durchmesser aus dem Gel ausgestochen und in eine 96well-Platte mit konisch zulaufendem Boden überführt. Der Verdau des im Gelpunkt enthaltenen Proteins zu einem Peptidgemisch erfolgt automatisiert mithilfe des Digesters. Dabei wird der Gelpunkt gewaschen, mit 50 mM Ammoniumbikarbonat in 50% Methanol entfärbt, mit 70% Acetonitril gespült und getrocknet und mit 20 ng/ $\mu$ L Trypsin in 25 mM Ammoniumbikarbonat für 4 h bei 37°C verdaut. Die über dem Gelpunkt stehende Flüssigkeit wird in eine frische 96well-Platte überführt, das Peptidgemisch aus dem Gelpunkt durch zweimalige Inkubation mit 0,1% Trifluoressigsäure in 50% Acetonitril extrahiert und die Lösungen mit dem Überstand vereinigt. Die Probe wird in der 96well-Platte eingedampft und ist in dieser Form bei -20°C lagerbar. Für die Massenanalyse wird die Probe in 2,5  $\mu$ L 0,5% Trifluoressigsäure in 50% Acetonitril gelöst. 1  $\mu$ L davon wird auf ein Stück Parafilm aufgebracht und dieser Tropfen mit 1  $\mu$ L Matrix gemischt. Diese besteht aus  $\alpha$ -hydroxy-cyano Zimtsäure, die mit einer Konzentration von 5 mg/mL in 0,5% Trifluoressigsäure in 50% Acetonitril gelöst ist und sich für die Identifikation von Peptidgemischen im MALDI besonders gut eignet. Von diesem Gemisch werden 0,3  $\mu$ L auf die runde Markierung (Target) eines speziellen Metallstreifens (Slide) aufgebracht und

getrocknet. Dieses Slide wird im Massenspektrometer MALDI-ToF mittels Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Analyse vermessen. Dabei generiert das MALDI mithilfe eines Lasers und der Matrix einfach positiv geladene Ionen, die über ein Hochspannungsfeld beschleunigt und dann im feldfreien Hochvakuum über die massenabhängige Flugzeit getrennt werden. Dabei wird ein Spektrum von Peptiden unterschiedlicher Masse generiert, das für jedes Protein je nach Lage der Trypsinschnittstellen spezifisch ist. Die Messung wird sowohl über den Zusatz interner Kalibrierungspeptide zur Matrix, die Vermessung eines externen Kalibrantengemisches als auch der Detektion autolytischer Trypsinfragmente innerhalb der Probe kalibriert. Das analysierte Protein wird über den Abgleich des im MALDI hergestellten Spektrums mit einer Proteindatenbank identifiziert.

## 3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind in 4 Kapitel gegliedert. Im ersten Teil (3.1) wird die Etablierung des humanen adipozytären Zellmodells beschrieben. Die unter Punkt 3.2 gezeigte molekulare Charakterisierung des Zellsystems beinhaltet die Expressionsanalyse adipozytärer Marker auf mRNA- und Proteinebene. Zur funktionalen Analyse (3.3) wurden die Insulinsensitivität, Glukose- und Lipoproteinaufnahme sowie die Sekretion von Adipozytokinen untersucht. Zur Identifizierung von potentiell regulatorisch wichtigen Proteinen wurde im letzten Teil der Arbeit (3.4) begonnen, eine differentielle Proteomanalyse der Zellen in undifferenzierten und differenzierten Zuständen durchzuführen.

### 3.1. Etablierung des Zellsystems

#### 3.1.1 Entwicklung des Differenzierungsprotokolls

Die Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle zum Adipozyten wird durch eine Vielfalt hormoneller Faktoren beeinflusst. Allgemein gilt, dass Mediatoren, die das Zellwachstum fördern, die Differenzierung hemmen. Die Erstbeschreibung der Zelllinie hMSC-Tert [Simonsen et al. 2002] demonstriert das Potential der Zelllinie zur adipozytären Differenzierung. Auf der Grundlage dieser Veröffentlichung und weiterer in der Literatur beschriebenen Differenzierungsprotokolle wurde ein Testprotokoll festgelegt, das eine Differenzierung der Zellen über drei Wochen in serumhaltigem Medium mit 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason, 450  $\mu\text{M}$  Isobuthylmethylxanthin (IBMX), 2  $\mu\text{M}$  Insulin, 1  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon und 1  $\mu\text{M}$  U0126 vorsah. Dabei kann das synthetische Glukokortikoid Dexamethason sowohl Einfluss auf die Regulation des Wachstums als auch auf die Differenzierung der Zelle nehmen. IBMX ist ein unspezifischer Inhibitor der cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen und bewirkt einen erhöhten Spiegel der zyklischen Nukleotidmonophosphate. Dexamethason und IBMX können ihre Wirkung am effektivsten bei kombiniertem Einsatz entfalten. Insulin spielt eine komplexe Rolle in der Differenzierung von Adipozyten. In der hier eingesetzten Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  aktiviert Insulin vornehmlich den Insulin-like Growth Factor (IGF)-I Rezeptor, welcher das Signal zur Differenzierung weiterleitet. Das Thiazolidindion Rosiglitazon ist ein Agonist des Transkriptionsfaktors Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)  $\gamma$ , der als zentrales Steuerglied der Adipogenese gilt. Die Substanz U0126 wirkt als spezifischer und nichtkompetitiver Inhibitor der Mitogen-Activated Kinase Kinasen (MAPK Kinasen) MEK1 und MEK2 primär proliferationshemmend und aktiviert in der Folge die Differenzierung.

In der ersten Phase der Etablierung und Charakterisierung wurde der Erfolg der Differenzierung anhand des Phänotyps der Zellen beurteilt. Dafür wurden Durchlichtaufnahmen von Zellen erstellt, die drei Wochen lang nach unterschiedlichen



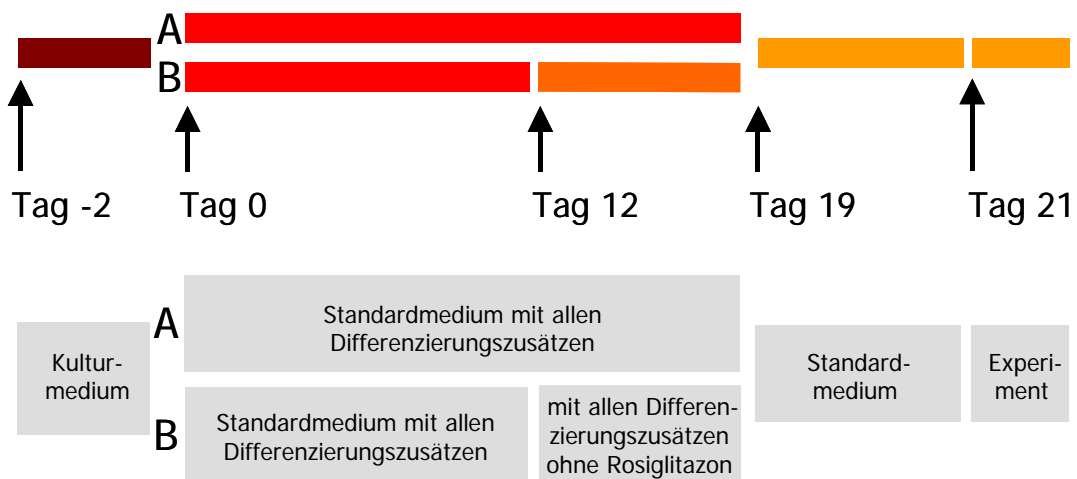
Protokollvarianten differenziert wurden. Übersichtsaufnahmen in 100facher Vergrößerung geben einen Eindruck davon, wie viele der Zellen sich infolge von Lipidakkumulationen abrunden, wie groß diese als stark lichtbrechende Strukturen erkennbaren Lipidvesikel sind und wie prominent der Hintergrund nicht differenzierter Zellen hervortritt.

In Abbildung 1 des Anhangs sind exemplarisch Zellbilder von Differenzierungen an Tag 21 dargestellt, die den Einfluss von IBMX, Rosiglitazon und U0126 auf die adipozytäre Differenzierung der hMSC-Tert Zellen verdeutlichen. Alle Ansätze erhielten für den Zeitraum der Differenzierung durchgehend Insulin und Dexamethason, die weiteren Zusätze wurden in folgenden Varianten eingesetzt: die Differenzierung ohne (- IBMX) und mit IBMX (+ IBMX) wurde verglichen; der Einsatz von Rosiglitazon wurde für die ersten 12 Tage (+ 12d Rosi) im Vergleich zu 21 Tagen (+ 21d Rosi) getestet; die Entwicklung der Zellen wurde ohne den Zusatz von U0126 (- U0126), mit dem Zusatz für die ersten 12 Tage (+ 12d U0126) bzw. für 21 Tage (+ 21d U0126) untersucht. Der Vergleich der Zellbilder zeigt, dass ohne den Zusatz von IBMX der Hintergrund undifferenzierter Zellen – als gleichmäßig dunkelgrauer Hintergrund zu erkennen (z. B. Anhang Abb. 1: g) – stark zunimmt und dass der Zusatz von IBMX dieser Proliferation deutlich entgegenwirkt. Die Differenzierungseffizienz wird durch die Gabe von U0126 sichtbar gesteigert, genauso wie durch eine durchgehende Gabe von Rosiglitazon. Die Kombination beider Zusätze erzielt die beste Differenzierungseffizienz (Anhang Abb. 1: i). Die Differenzierungsansätze mit der Kombination von U0126 für 21 Tage und Rosiglitazon für 12 Tage (Anhang Abb. 1: h) sowie in umgekehrter Anordnung von Rosiglitazon für 21 Tage und U0126 für 12 Tage (Anhang Abb. 1: f) sind in ihrem resultierenden Zellbild vergleichbar. Die durchgehende Gabe des MEK-Inhibitors U0126 ist jedoch vorzuziehen, da dies zur Entstehung größerer Lipidvesikel führt. Basierend auf den hier beschriebenen Ergebnissen wurde ein Differenzierungsprotokoll mit der durchgehenden Gabe von IBMX und U0126 und einer Gabe von Rosiglitazon für 12 Tage oder wahlweise 21 Tage genutzt.

hMSC-Tert Zellen wachsen nicht serumfrei und differenzieren wie alle anderen mesenchymalen Stammzellen nur unter Zusatz von Serum. Als Material biologischen Ursprungs enthält das Serum viele Faktoren, die per se einen nicht kontrollierbaren Einfluss auf die Differenzierung nehmen können. Um diesen Einfluss zu minimieren, wurde die Differenzierung der Zellen in Medium mit 5% FCS bzw. 10% FCS verglichen. Abbildung 2a des Anhangs stellt die mikroskopischen Aufnahmen dieser Zellen an Tag 21 dar. Das Senken der Serumkonzentration auf 5% beeinträchtigt die Effizienz der Differenzierung nicht. Der Zusatz unterschiedlicher Kombinationen von U0126 und Rosiglitazon zeigt wie schon in Abbildung 1 des Anhangs, dass die Gabe von U0126 für 21 Tage und von Rosiglitazon für 12 Tage (Anhang Abb. 2a: e, f) bei geringerer Proliferation der Zellen eine bessere Differenzierung erzielt als die umgekehrte Kombination (Anhang Abb. 2a: c, d mit U0126 für 12 Tage, Rosiglitazon für 21 Tage). Abbildung 2b des Anhangs präsentiert Bilder von Differenzierungen, die nach demselben Schema

durchgeführt wurden. Allerdings wurden hier die Zellen ab Tag 19 der Differenzierung in Medium ohne Differenzierungsagenzien kultiviert. Das Ergebnis ist ein der Abbildung 2a des Anhangs vergleichbares Zellbild. Es findet somit phänotypisch keine Dedifferenzierung der Zellen durch den Entzug der Differenzierungssubstanzen statt. Die Zellen sind folglich stabil differenziert. Weiterhin können vor der Durchführung eines Versuches an Tag 21 die Differenzierungszusätze über 2 Tage ausgewaschen werden, um ihre mittelfristige Einflussnahme auf den Versuch (z. B. die Proteinexpression bestimmter Marker, das Aktivieren von Signalwegen) zu verhindern.

Basierend auf den im Anhang dargestellten Ergebnissen wurde ein für alle weiteren Versuche standardmäßig verwandtes Protokoll abgeleitet. In Abbildung 6 ist dieses Protokoll zur adipozytären Differenzierung von hMSC-Tert Zellen schematisch dargestellt.



#### Abbildung 6: Schema des Protokolls zur adipozytären Differenzierung von hMSC-Tert Zellen

Die hMSC-Tert Zellen werden in Kulturmedium mit 10% FCS ausgesät. An Tag 0 ist der Zellteppich konfluent und die Differenzierung wird induziert. Dies geschieht durch Inkubation in Standardmedium mit 5% FCS und allen Differenzierungszusätzen (siehe Text). Ab Tag 12 der Differenzierung erhalten die Zellen des Protokolls B alle Zusätze außer Rosiglitazon, die des Protokolls A weiterhin alle Differenzierungsagenzien. An Tag 19 werden alle Zellen auf Standardmedium ohne Zusätze gesetzt, um die Differenzierungszusätze auszuwaschen. Die Differenzierung ist an Tag 21 abgeschlossen. In der weiteren Arbeit wird die Bezeichnung der Proben wie folgt vorgenommen: der Buchstabe d steht für Tag, der Zeitpunkt der Differenzierung, an dem die Probe genommen wurde, wird als Zahl dargestellt, das verwendete Differenzierungsprotokoll A bzw. B wird durch den Zusatz des Buchstaben A bzw. B gekennzeichnet (gilt für alle Proben nach Tag 12).

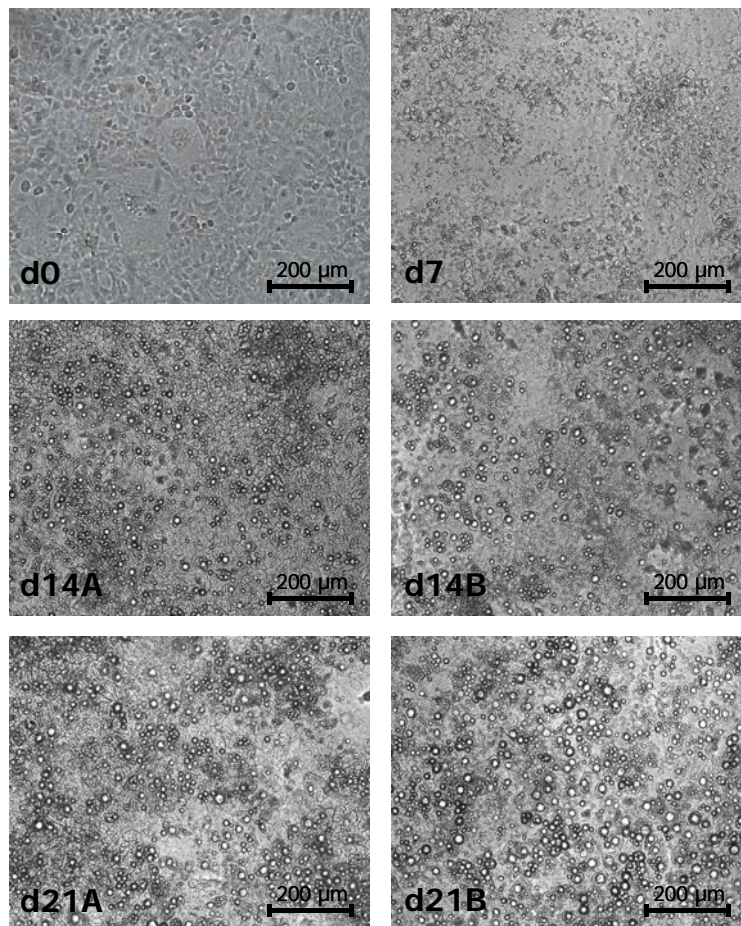
Für die in dieser Arbeit vorgenommene Charakterisierung des Zellmodells vergleicht zwei Differenzierungsprotokolle, bezeichnet als Protokoll A und Protokoll B. Die Zellen werden in Kulturmedium mit 10% FCS ausgesetzt und in zwei Tagen bis zur Konfluenz kultiviert. An Tag 0 beginnt die Induktion der Differenzierung in Standardmedium mit 5% FCS unter Zusatz aller Differenzierungssubstanzen: 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason, 2  $\mu\text{M}$  Insulin, 450  $\mu\text{M}$

IBMX, 1  $\mu\text{M}$  U0126 und 1  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon. Ab dem 12. Tag der Differenzierung werden die Zellen des Protokolls B mit allen Differenzierungssubstanzen außer Rosiglitazon inkubiert, während die Zellen des Protokolls A weiterhin alle Zusätze erhalten. An Tag 19 werden die Zellen beider Protokolle auf Standardmedium ohne Differenzierungszusätze gesetzt, um diese auszuwaschen. Die Differenzierung ist an Tag 21 abgeschlossen. Die Zellen können im Experiment verwendet werden. Je nach Fragestellung können die Zellen an unterschiedlichen Tagen der Differenzierung untersucht werden.

In der weiteren Arbeit wird die Bezeichnung der Proben wie folgt vorgenommen: der Buchstabe d steht für Tag, der Zeitpunkt der Differenzierung, an dem die Probe genommen wurde, wird als Zahl dargestellt, das verwendete Differenzierungsprotokoll A bzw. B wird durch den Zusatz des Buchstaben A bzw. B gekennzeichnet (gilt für alle Proben nach Tag 12).

### 3.1.2 Darstellung des adipozytären Zellmodells

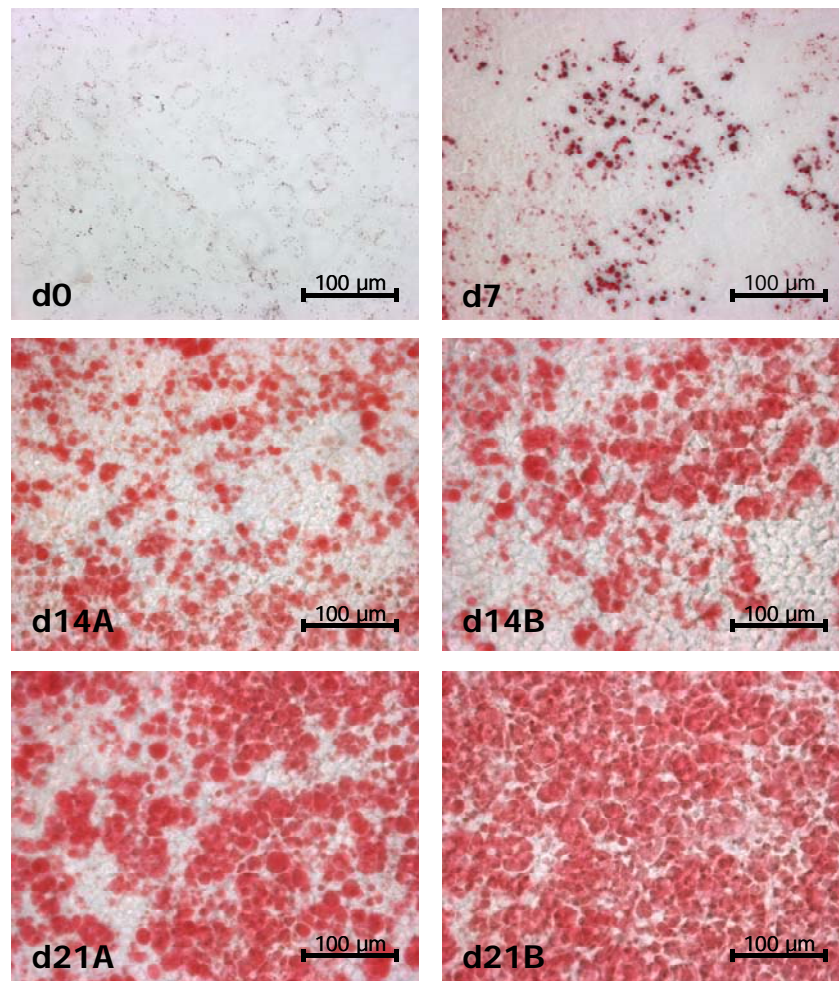
Wie schon während der Etablierung erfolgte die Evaluierung des Differenzierungsmodells im ersten Schritt über die Charakterisierung des Phänotyps der Zellen. Abbildung 7a dokumentiert die Entwicklung der Zellen im Verlauf der Differenzierung. Undifferenzierte hMSC-Tert Zellen (Abb. 7a: d0) adherieren flach an die Oberfläche der Kulturschale. Ihre Form ist dreieckig bis polygonal. Sie bilden eine kopfsteinpflasterartige Struktur. Eine Woche nach der Induktion der Differenzierung (Abb. 7a: d7) sind im noch dichter gewordenen Zellrasen erste kleine Lipidtröpfchen zu erkennen. Bis zum Tag 14 der Differenzierung (Abb. 7a: d14A, d14B) verdichten sich die Zellen noch etwas stärker, was an vermehrt auftretenden dunkelgrauen Strukturen zu erkennen ist. Die Anzahl der Lipidvesikel und ihre Größe nehmen zu. Diese Entwicklung setzt sich bis zum Ende der Differenzierung an Tag 21 fort. Das Zellbild weist nun vor allem große vereinzelte Lipidvakuolen, aber auch weiterhin Trauben kleinerer Lipidvesikel auf (Abb. 7a: d21A, d21B). Daraus lässt sich schließen, dass zu diesem Zeitpunkt ein großer Teil der Zellen zu reifen Adipozyten ausdifferenziert ist. Diese sind Teil einer heterogenen Zellpopulation, die aus einem noch undifferenzierten Zellhintergrund sowie Zellen in jedem möglichen Differenzierungsstadium besteht. Der Vergleich der Differenzierungsprotokolle A und B ergibt weder für Tag 14 noch für Tag 21 signifikante Unterschiede in der Entwicklung der Zellen.



**Abbildung 7a: Zellbild im Verlauf der adipozytären Differenzierung**

Die Aufnahmen wurden im Durchlicht mit Dic-Optik 5-14 in 100facher Vergrößerung angefertigt. Die Induktion der Differenzierung beginnt an Tag (d) 0, wenn die Zellen konfluent sind. Nach 7 Tagen sind die ersten kleinen Lipidtröpfchen als runde stark lichtbrechende Strukturen zu erkennen. Deren Anzahl und Größe nimmt im Verlauf der Differenzierung zu. Nach drei Wochen sind große vereinzelte Lipidvesikel neben Trauben kleinerer Lipidvakuolen zu sehen. Das Zellbild unterscheidet sich nicht zwischen den Zellen des Differenzierungsprotokolls A und B.

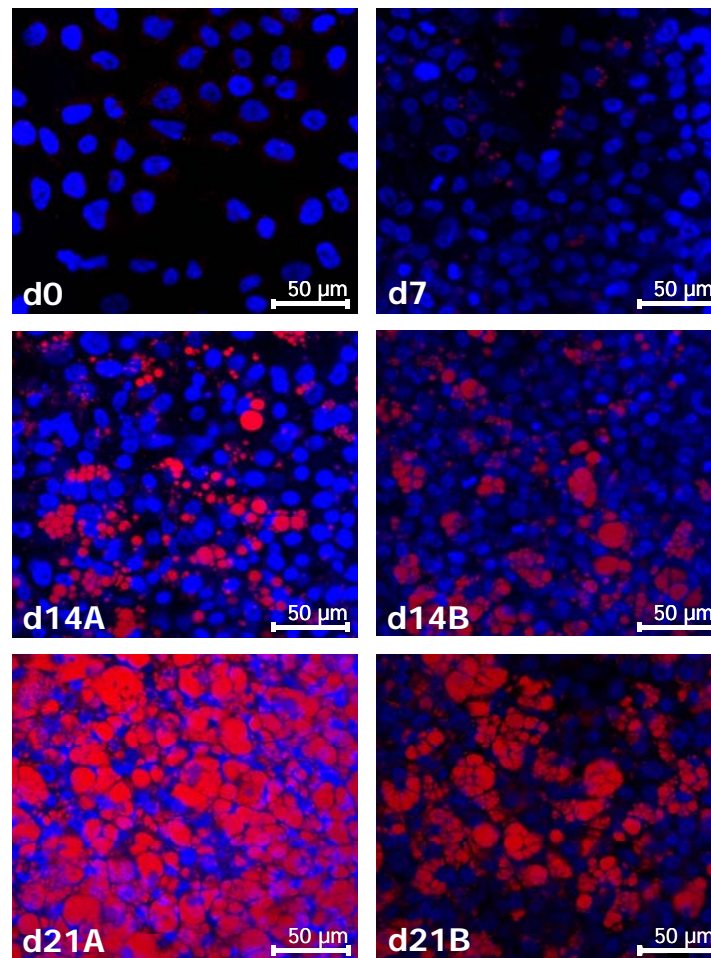
Um den Nachweis zu führen, dass es sich beim steigenden Auftreten der lichtbrechenden runden Vesikel tatsächlich um akkumulierende Triglyzeride handelte, wurde eine Fettrotfärbung von Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien durchgeführt (Abb. 7b). Die gezeigten Zellbilder verfolgen den Differenzierungsverlauf von Tag 0, über Tag 7, Tag 14A und Tag 14B bis zu Tag 21A und Tag 21B. Die Zunahme der rotgefärbten Fläche weist auf eine verstärkte Einspeicherung von Neutrallipiden in den Zellen hin. Der Zustand der Zellen der Differenzierungsprotokolle A und B ist dabei zu jedem Zeitpunkt vergleichbar. In Abbildung 3 des Anhangs sind zu jedem der beschriebenen Zeitpunkte zwei weitere Bilder fettrotgefärbter Zellen dargestellt, um die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses zu demonstrieren. Zur Kontrolle und zum Vergleich wurden murine 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten differenziert (Anhang Abb. 3: 3T3 d19). Im Vergleich zu den hMSC-Tert Zellen sind hier die Gruppen zusammenhängender Adipozyten kleiner, die einzelnen Zellen dagegen deutlich größer.



**Abbildung 7b: Zellbild im Verlauf der adipozytären Differenzierung nach Fettrotfärbung**

Die Aufnahmen wurden im Durchlicht in 200facher Vergrößerung angefertigt. Neutrallipide wurden mit Fettrot angefärbt und sind als dunkelrote Strukturen erkennbar. Erste Lipidvakuolen sind nach 7 Tagen sichtbar. Der steigende Anteil der gefärbten Fläche in den Präparaten der späteren Differenzierungszeitpunkte weist eine verstärkte Akkumulation von Neutrallipiden in den Zellen nach. Zwischen den Differenzierungsprotokollen A und B waren keine merklichen Unterschiede feststellbar.

Zur hochauflösenden visuellen Darstellung mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Nilrot eine Färbung der Neutralfette und mit DAPI eine Kernfärbung durchgeführt und Bilder als horizontaler Schnitt durch die Präparate angefertigt (Abb. 7c). Auch hier wird die schon beschriebene Zunahme intrazellulärer Neutrallipide über den Verlauf der Differenzierung und die vergleichbare Differenzierungseffizienz von Protokoll A und B beobachtet. Die Tatsache, dass die Anzahl der Lipidvesikel in der Nilrotfärbung teilweise geringer erscheint als in der Fettrotfärbung kann neben der biologischen Varianz zwischen den Präparaten mit der Schnitttechnik bei der Aufnahme konfokaler Bilder erklärt werden.



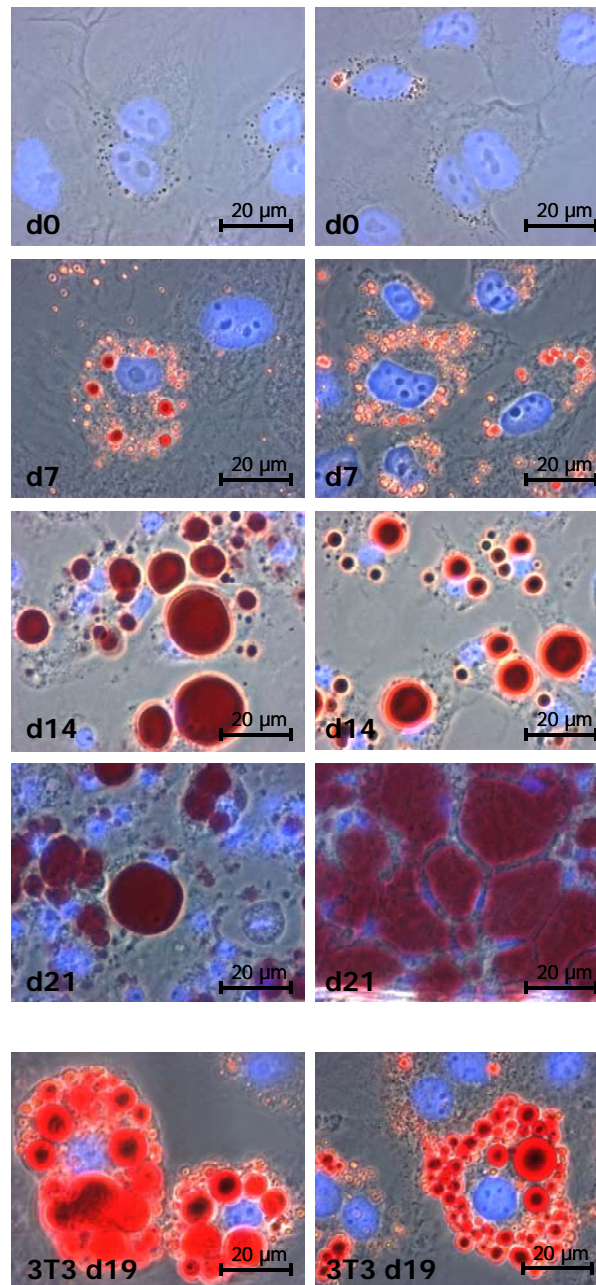
**Abbildung 7c: Zellbild im Verlauf der adipozytären Differenzierung nach Nilrot- und DAPI-Färbung**

Die konfokalen Aufnahmen wurden mit einer Schichtdicke von 2 µm in 630facher Vergrößerung angefertigt. Die mit Nilrot selektiv gefärbten Lipide erscheinen rot, die DAPI-gefärbten Zellkerne blau. Die Zunahme an rotgefärbten Strukturen weist auch hier eine steigende Akkumulation von Lipiden im Verlauf der Differenzierung nach.

Zusammenfassend konnte mittels mikroskopischer Aufnahmen ungefärbter, Fettrot- und Nilrot-gefärbter Präparate der Nachweis der intrazellulären Akkumulation Triglyzerid-gefüllter Vesikel erbracht werden. Diese phänotypische Veränderung bildet die Differenzierung von hMSC-Tert Zellen zu reifen Adipozyten ab. Aus der Vielzahl der hier nur exemplarisch vorgestellten Experimente lässt sich die durchschnittliche Differenzierungseffizienz auf 60-90% schätzen.

### 3.1.3 Zellmorphologie

Zur genauen morphologischen Untersuchung der differenzierten Zellen wurden Bilder Fettrot- und DAPI-gefärbter Präparate in 1000facher Vergrößerung aufgenommen.

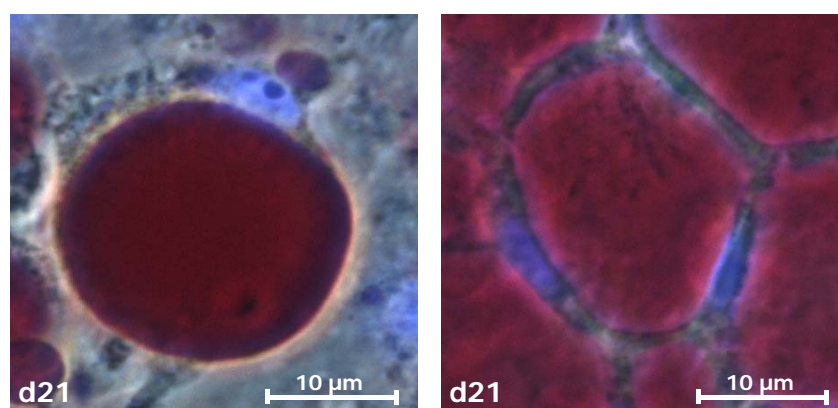


**Abbildung 8a: Zellmorphologie im Verlauf der adipozytären Differenzierung nach Fettrot- und DAPI-Färbung**

Die Aufnahmen wurden in 1000facher Vergrößerung angefertigt. Die undifferenzierten Stammzellen adherieren flach an die Oberfläche, das Kern/Zytoplasma-Verhältnis ist groß (d0). Nach einer Woche erscheinen in der Zellperipherie kleine Lipidtröpfchen (d7). An Tag 14 ist die Anzahl der Lipidvakuolen pro Zelle gesunken und ihre Größe gestiegen. Die Kerne sind deutlich kleiner, die Zellen runden sich ab. Diese Entwicklung verstärkt sich bis zum Tag 21. Differenzierte murine 3T3-L1 Zellen sind im Vergleich viel größer, die Zellkerne bleiben im Verhältnis zum Zytoplasma größer und die Lipidvakuolen sind bedeutend kleiner.

Abbildung 8a stellt die Entwicklung der Morphologie von hMSC-Tert Zellen im Verlauf der Differenzierung (Abb. 8a: d0 - d21) und von differenzierten 3T3-L1 Zellen (Abb. 8a: 3T3 d19) dar. Die undifferenzierten hMSC-Tert Zellen an Tag 0 sind fest angeheftet und haben einen großen, zentral liegenden Zellkern. Natürlicherweise vorhandene Lipidvesikel sind als dunkel verdichtete, punktförmige Strukturen im Zytoplasma einiger Zellen zu sehen. Nach einwöchiger Differenzierung (Abb. 8a: d7) sind eine Vielzahl kleinerer Lipidvesikel im Zytoplasma vorhanden, die sich in der Zellperipherie kreisförmig um den Kern anordnen. An Tag 14 der Differenzierung (Abb. 8a: d14) ist die Anzahl der Vesikel deutlich gesunken, deren Größe jedoch stark gestiegen. Das Verhältnis von Zellkern und Zytoplasma hat sich klar in Richtung des Zytoplasmas verschoben. Die ganze Zelle rundet sich aufgrund des Auftretens immer größer werdender Lipidvesikel ab. Diese Entwicklung verstärkt sich bis zum Tag 21 der Differenzierung. Terminal ausdifferenzierte Adipozyten besitzen nur noch eine Fettvakuole, die das Zytoplasma beinahe vollständig ausfüllt. Dieser Zustand wird als monolokulär oder auch unifokal bezeichnet. Diese Adipozyten treten entweder vereinzelt oder im Verbund mit anderen ausdifferenzierten Zellen auf (Abb. 8a: d21). Die dargestellten differenzierten 3T3-L1 Zellen (Abb. 8a: 3T3 d19) sind insgesamt sehr viel größer als die hMSC-Tert Adipozyten. Sie runden sich ebenfalls ab. Allerdings enthalten sie nach 19 Tagen der Differenzierung noch eine Vielzahl von Lipidvesikeln unterschiedlicher Größe. Die Zellkerne verändern ihre Größe im Vergleich zu undifferenzierten 3T3-L1 Zellen nicht wesentlich (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4 des Anhangs sind weitere Bilder zur Zellmorphologie zusammengestellt, die die hier ausgeführten Beobachtungen in Mehrfachwerten dokumentieren.

Zur detaillierten Ansicht sind in Abbildung 8b Ausschnitte aus Abbildung 8a d21 dargestellt.



#### **Abbildung 8b: Zellmorphologie terminal differenzierter Adipozyten**

Diese Abbildung ist ein Detailausschnitt aus der Abbildung 8a d21. Die terminal differenzierte hMSC-Tert Zelle weist eine große monolokuläre Lipidvakuole auf. Die Zelle ist abgerundet. Das Zytoplasma und der peripher positionierte Zellkern liegen eng an der Vakuole. Das Kern/Zytoplasma-Verhältnis ist klein. Diese Morphologie entspricht der eines primären humanen Adipozyten.



Abbildung 8b zeigt die Morphologie eines abgerundeten terminal differenzierten Adipozyten mit einem monolokulären Lipidvesikel. Das Zellkern/Zytoplasma-Verhältnis ist klein. Der Zellkern ist peripher positioniert und liegt wie das verbleibende Zytoplasma um den Vesikel herum. Im Verbund mit anderen ausdifferenzierten Zellen sind lediglich große rotgefärbte Flächen erkennbar, in deren Zwischenräumen die Zellkerne als kleine ovale Strukturen „klemmen“. Dieses Erscheinungsbild sowohl des einzelnen Adipozyten als auch des Zellverbandes entspricht der Morphologie einer primären Fettzelle.

### 3.1.4 Intrazelluläre Lipidparameter

Die Akkumulation von Lipiden während der Differenzierung wurde quantifiziert, indem die wichtigsten Lipidklassen über enzymatisch gekoppelte Bestimmungen erfasst wurden. Es wurden intrazelluläre Triglyzeride, Gesamtcholesterol und Phospholipide gemessen und diese Werte auf das Gesamtzellprotein der Probe normalisiert. In Tabelle 6 werden exemplarisch Messwerte aus zwei unabhängigen Experimenten aufgeführt.

	Triglyzeride [µg/mg Zellprotein]		Gesamtcholesterol [µg/mg Zellprotein]		Phospholipide [µg/mg Zellprotein]	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
d0	8	16	36	15	74	115
d7	61	41	27	21	82	217
d14A/B	175/124	137/134	51/51	30/32	163/157	223/199
d21A/B	346/331	241/177	85/78	32/28	245/174	235/213
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2

**Tabelle 6: Entwicklung intrazellulärer Lipidkonzentrationen im Verlauf der adipozytären Differenzierung**

Die intrazellulären Konzentrationen der Lipide wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung bestimmt und auf das Gesamtzellprotein normiert. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängig durchgeführter Versuche Experiment 1 und Experiment 2. Die Triglyzeridwerte steigen bis zum Ende der Differenzierung mindestens auf das 13fache an. Der Gehalt der Phospholipide verdoppelt sich im Minimum, genauso wie der Wert des Gesamtcholesterols.

Im Verlauf der Differenzierung steigen wie erwartet die intrazellulären Triglyzeride um ein Vielfaches an (mindestens 13fach). Dies entspricht den Ergebnissen der morphologischen Untersuchungen. Der Gehalt an Gesamtcholesterol verdoppelt sich ungefähr in den beiden dargestellten Versuchen. Der Phospholipidgehalt der Zellen weist ebenfalls ca. eine Verdoppelung auf. Die in beiden dargestellten Experimenten gemessenen Werte zeigen Abweichungen in ihrer Ausgangskonzentration und im Faktor ihrer Zunahme über den

Differenzierungsverlauf. Neben der natürlichen Varianz einer Messung von zwei biologischen Proben ist dies mit Unterschieden in der Differenzierungseffizienz zu erklären. Hierbei kann sich die Anzahl der insgesamt in die Differenzierung eingetretenen, der terminal differenzierten Zellen und die Stärke des Hintergrunds aus undifferenzierten Zellen unterscheiden. Bei gleicher Anzahl differenzierter Zellen kann so etwa ein ausgeprägter Zellhintergrund den relativen Wert des Triglyzeridgehalts pro Gesamtzellprotein senken. Weiterhin zeigt die Betrachtung der Werte für die Proben des Protokolls A leicht höhere Werte im Vergleich zu Protokoll B. Dies gilt insbesondere für Tag 21 der Differenzierung. Dieses Ergebnis kann auf die beschriebene Varianz des Systems zurückzuführen sein. In der Tendenz zeigen alle präsentierten Daten einen mit der Zellmorphologie konsistenten Anstieg der intrazellulären Lipide.

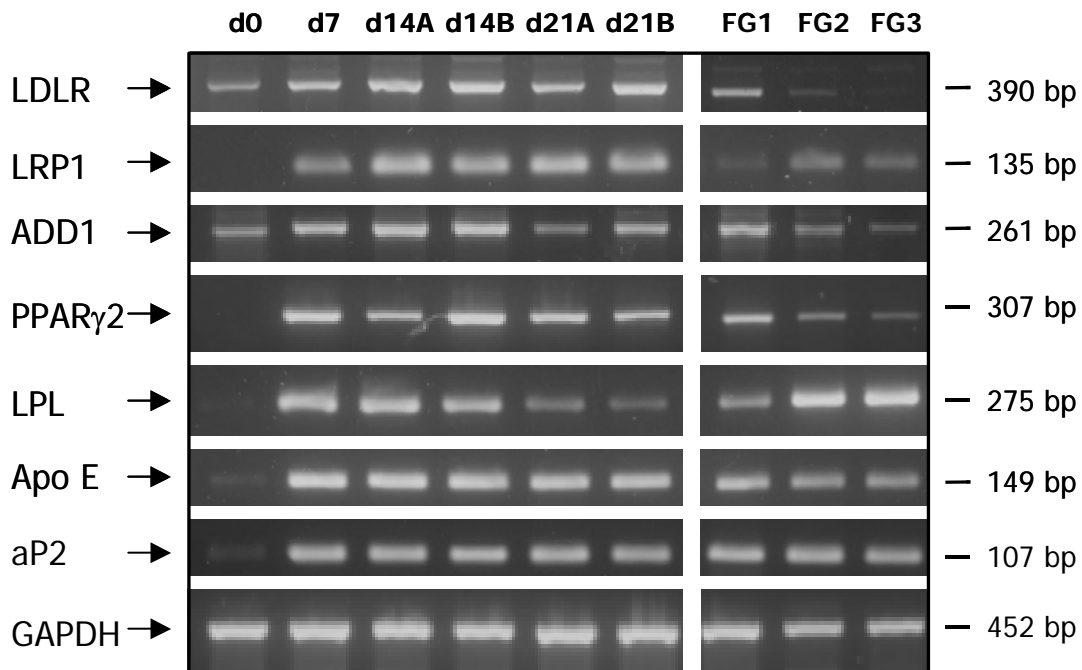
## **3.2 Molekulare Charakterisierung**

Nach der erfolgreichen Entwicklung eines Differenzierungsprotokolls, welches morphologisch beurteilt reife Adipozyten generiert, wurde das Modell auf die Expression adipozytärer Marker getestet.

### **3.2.1 Expression von adipozytären Markern und Lipoproteinrezeptoren auf mRNA-Ebene**

Im ersten Schritt erfolgten mittels RT-PCR semiquantitative Expressionsanalysen auf Ebene der mRNA. Dabei wurden Zellproben verschiedener Differenzierungszeitpunkte mit primären humanen Fettgewebsbiopsien verglichen. Für alle Versuche wurden gleiche cDNA-Mengen eingesetzt und das untersuchte Gen auf das der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

Abbildung 9a zeigt eine selektive Zusammenstellung der Ergebnisse der RT-PCR-Analyse. Betrachtet wurden als Marker der frühen adipozytären Differenzierung die Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$ 2 und Adipocyte Determination and Differentiation Factor (ADD) 1 (auch SREBP1c). Als Marker für Präadipozyten und reife Fettzellen wurde Lipoproteinlipase (LPL), Apolipoprotein E (ApoE) und Adipocyte Lipid Binding Protein (aP2) detektiert. Untersucht wurden außerdem die Lipoproteinrezeptoren Low Density Lipoprotein-Rezeptor (LDLR) und LDLR-related Protein (LRP) 1. Die Expression des ADD1-Gens wurde hier schon in undifferenzierten Zellen nachgewiesen, die des PPAR $\gamma$ 2-Gens erst ab Tag 7 der Differenzierung (Abb. 9a). Die Gene von LPL, ApoE und aP2 wurden an Tag 7 und allen späteren Zeitpunkten der Differenzierung exprimiert. Alle diese Marker wurden auch in den primären Fettgewebsproben exprimiert. Die Banden für LPL sind am Tag 21A und 21B im Vergleich zu Tag 14A und 14B etwas schwächer.



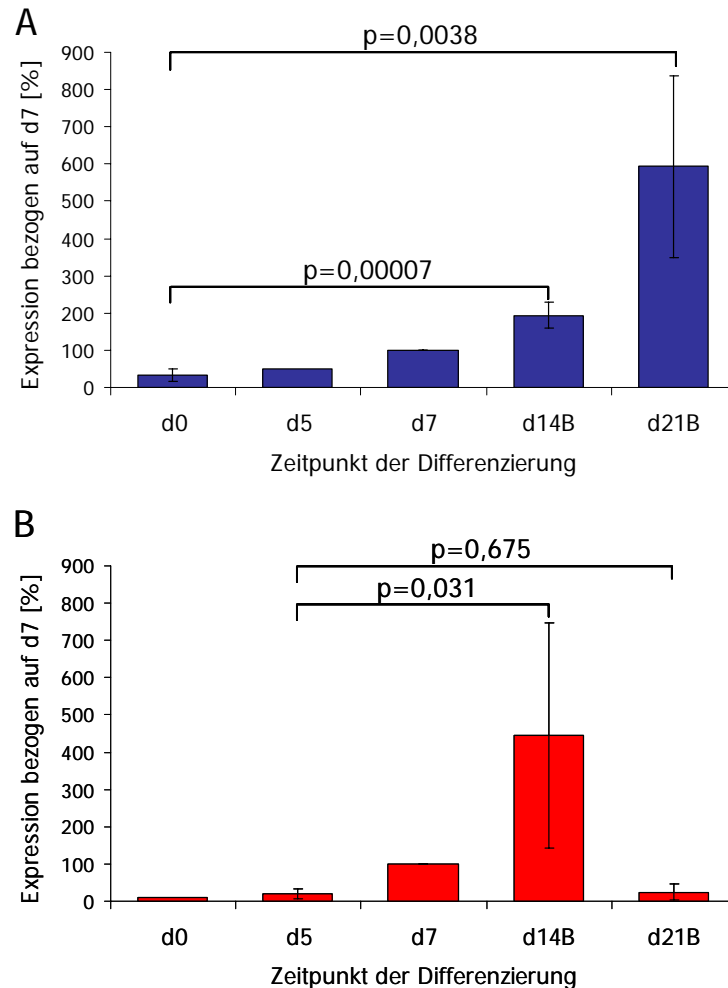
**Abbildung 9a: mRNA-Expression von adipozytären Markern und Lipoproteinrezeptoren im Verlauf der Differenzierung**

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung wurde in Zellen beider Differenzierungsprotokolle A und B mittels RT-PCR die Expression der wichtigsten adipozytären Marker untersucht. Als Positivkontrolle wurden Proben mitgeführt, die aus primärem humanem Fettgewebe hergestellt wurden (FG1, FG2, FG3). Für alle untersuchten Marker wird die Expression innerhalb der ersten Woche der Differenzierung induziert.

Die Genexpression der analysierten Lipoproteinrezeptoren konnte in allen Proben ab Tag 7 der Differenzierung gezeigt werden. Das LDLR-Gen wurde schon in undifferenzierten Zellen exprimiert. Die Bande des LRP1-Produktes ist in den Proben des Fettgewebes etwas schwächer. Dies könnte, sollte das Ergebnis mit quantitativen Methoden bestätigt werden, tatsächlich auf den Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Ursprung der Proben zurückzuführen sein. Der LDLR konnte in einer von 3 der Fettgewebeproben gar nicht und in einer nur sehr schwach detektiert werden.

Die mit dieser Methode klar darstellbaren Änderungen der Expression sind primär zwischen undifferenzierten und einer Woche differenzierten Zellen festzustellen. Um die Feinheiten in der Staffelung der verschiedenen Induktionszeitpunkte aufzuzeigen, müssten mehr Messpunkte zwischen Tag 0 und Tag 7 gewählt werden. Für die hiesige Fragestellung ist die Feststellung wichtig, dass hinsichtlich des Expressionsmusters auf RNA-Ebene die Zellen ab Tag 7 der Differenzierung als stabil differenziert angesehen werden können. Die hier untersuchten Marker umfassen auch ausschließlich im Fettgewebe exprimierte Gene (PPAR $\gamma$ 2 und aP2).

Da im weiteren Verlauf der funktionalen Analyse die Glukoseaufnahme untersucht wurde, wurden die Glukosetransporter (GLUT) 1 und 4 mit der Methode der quantitativen real time PCR analysiert.



#### Abbildung 9b: Expression der Glukosetransporter 1 und 4 im Verlauf der adipozytären Differenzierung

Die relative Expression von GLUT1 (A) und GLUT4 (B) wurde mithilfe der quantitativen real time PCR zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung untersucht. Wegen der aufwendigen Methode wurden nur Proben des Differenzierungsprotokolls B analysiert. Als Referenzgen diente  $\beta_2$ -Microglobulin. Die jeweilige Expression wurde auf den Wert an Tag 7 bezogen, da zu diesem Zeitpunkt die Expression beider Transporter stabil nachweisbar war. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student's T-Test errechnet und wegen der Normierung aller Proben auf Tag 7 auf den Wert an Tag 0 bzw. Tag 5 bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mehrerer Experimente, von denen mindestens drei unabhängig sind ( $1 < n < 6$ ).

Es wurden Proben von Zellen zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten verglichen. Die Expression der Transporter wurde innerhalb einer Probe jeweils auf die Expression des Referenzgens  $\beta_2$ -Microglobulin normalisiert. Dieser Wert wurde auf die Expression an Tag 7 der Differenzierung bezogen, da zu diesem Zeitpunkt im Gegensatz zu Tag 0 beide Transporter stabil detektierbar waren. Abbildung 9b zeigt die wie beschrieben ermittelte

Expression der Glukosetransporter als Mittelwerte aus mehreren Experimenten ( $1 < n < 6$ ), von denen maximal drei unabhängig sind.

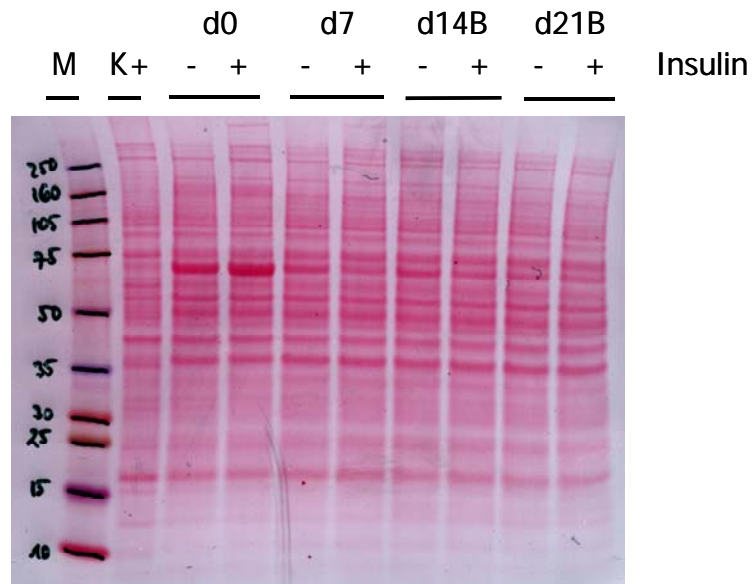
Wie in Abbildung 9b A gezeigt, steigt die relative Expression des GLUT1 sukzessive im Verlauf der Differenzierung an. Diese Zunahme findet insbesondere nach der ersten Differenzierungswoche statt. Von Tag 0 auf Tag 14 erhöht sich die Expression signifikant um den Faktor 6, von Tag 0 auf Tag 21 um den Faktor 18. Die Signifikanz wurde bezogen auf Tag 0 nicht auf Tag 7 berechnet, da alle Messpunkte als relative Werte von Tag 7 dargestellt wurden, dieser Wert also immer 100% beträgt. Die Expression von GLUT4 (Abb. 9b B) steigt im Verlauf der Differenzierung bis Tag 14 signifikant um Faktor 22 an und fällt bis Tag 21 wieder bis fast auf den Ausgangswert ab. Dieser Vergleich wurde in Bezug auf die Expression an Tag 5 erstellt, da an Tag 0 die Expression des Transporters so gering ist, dass sie nur in einem von drei unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden konnte. Die reproduzierbar größeren  $C_T$ -Werte für GLUT4 bei gleicher Menge eingesetzter cDNA lassen eine geringere Menge an GLUT4-Transkript im Vergleich zu GLUT1 vermuten. Um jedoch eine Aussage über die Aufnahme von Glukose in die Zelle machen zu können, ist die Erhebung funktioneller Daten unerlässlich (siehe Punkt 3.3.2).

### 3.2.2 Expressionsanalysen auf Proteinebene

Im zweiten Schritt wurde die Expression adipozytärer Marker im Verlauf der Differenzierung auf Proteinebene betrachtet. Der Nachweis erfolgte mithilfe spezifischer Antikörper im Western Blot. Dafür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung Gesamtzellprotein oder membranproteinangereicherte Proben hergestellt. Alle Spuren eines Gels wurden standardisiert mit der gleichen Menge Protein beladen. Während der Durchführung der Versuche stellte sich heraus, dass die üblicherweise als interne Standards verwendeten Proteine in diesem System reguliert werden. Deshalb wurde die gleichmäßige Beladung der Spuren kontrolliert, indem die Proteine auf der geblotteten Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt wurden.

Abbildung 10a stellt beispielhaft eine Ponceau-gefärbte Membran dar. Die gleichmäßige Farbtintensität der Spuren weist auf die Beladung mit einer vergleichbaren Proteinmenge hin. Ganz links ist der Proteinmarker aufgetragen, daneben eine Positivkontrolle (HEK-Zellen, K+) und Proteinlysate aus einem Versuch zur insulin-abhängigen Phosphorylierung, der zur funktionalen Charakterisierung der Zellen durchgeführt wurde (siehe Punkt 3.3.1). An diesem Punkt wurde ein Bild aus dieser Versuchsreihe gewählt, um neben der Erläuterung der Beladungskontrolle gleichzeitig zu zeigen, dass die Stimulation der Zellen über 15 min mit 50 nM Insulin keine Verschiebungen im Gesamtzellprotein bewirkt, dass also kein Effekt des Insulins auf die Proteinsynthese gemessen wurde. Das Muster der angefärbten Proteinbanden in den Proben ist uneingeschränkt vergleichbar. Lediglich eine Bande bei ca. 70 kDa sticht in den

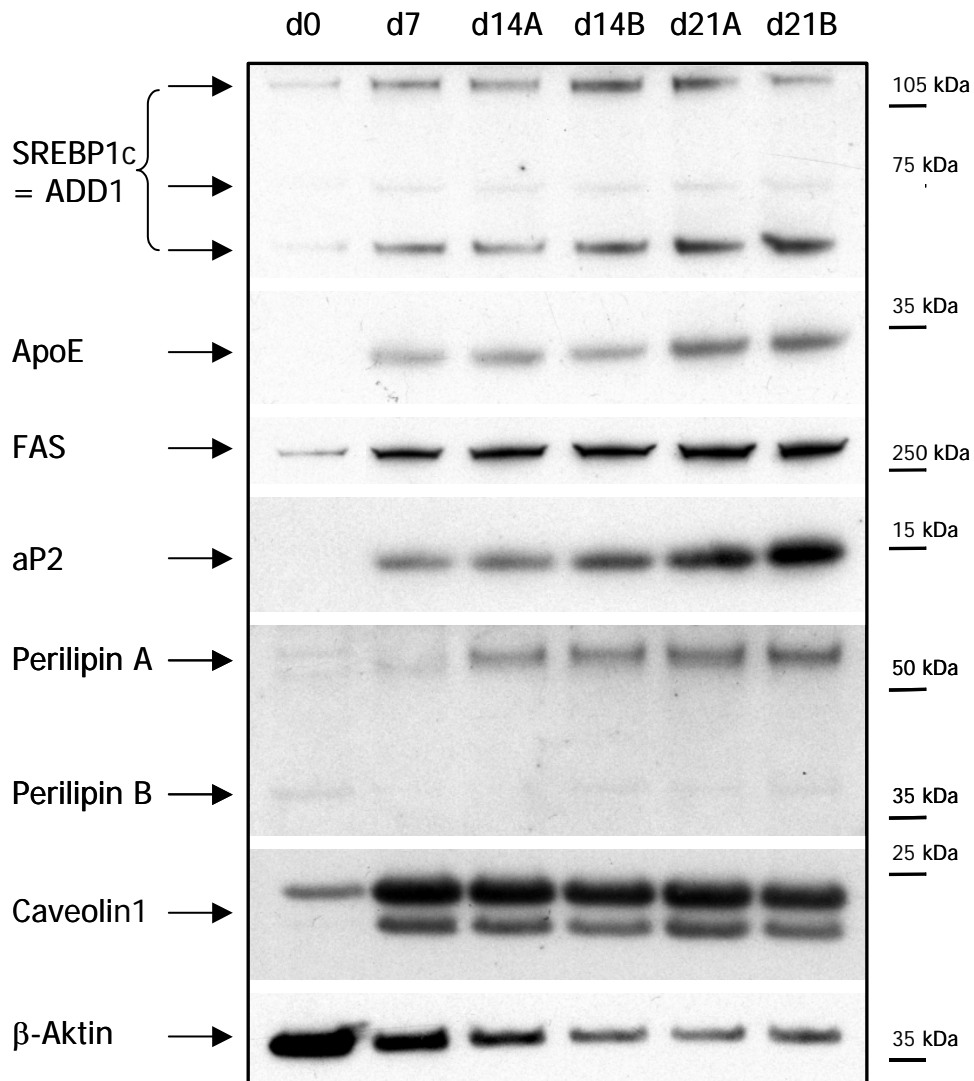
an Tag 0 generierten Proben deutlich stärker hervor. Dabei könnte es sich zum Beispiel um ein Protein des Zytoskeletts handeln, das in den flach adherierten undifferenzierten Zellen in viel ausgeprägterem Maße benötigt wird als in differenzierenden Zellen, die sich abrunden.



**Abbildung 10a: Beispielhafte Darstellung der Standardisierung der Proteinbeladung**

Zur Normalisierung wurde die gleiche Menge Protein pro Spur aufgetragen. Die Beladung wurde mithilfe einer Ponceau-Färbung der Membran kontrolliert. Das abgebildete Beispiel zeigt Proteinlysate aus einem Versuch zur insulinabhängigen Phosphorylierung (siehe Punkt 3.3.1) wie sie zur funktionellen Charakterisierung der Zellen durchgeführt wurden.

Das Expressionsmuster der untersuchten Marker ist in Abbildung 10b zusammengestellt. Verglichen wurde die Expression in undifferenzierten und entsprechend der beiden Differenzierungsprotokolle A und B behandelten Zellen. Die Proteinexpression des Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) 1c (auch ADD1) bestätigt das Ergebnis der mithilfe der PCR ermittelten Daten. Im Western Blot werden zwei Banden für SREBP1c detektiert, das membranständige Vorläuferprotein mit einer Größe von 125 kDa und das N-terminale Spaltprodukt mit einer Größe von 68 kDa. Die Proteinexpression der reifen Form ist an Tag 0 relativ schwach. Ab Tag 7 wird es mit steigender Intensität detektiert. Die aktive Form des SREBP1c wird sehr schnell abgebaut und ist deshalb auch nur als sehr schwache Bande zu erkennen. Die Identität der dritten detektierten Bande bei ca. 55 kDa ist unbekannt.



**Abbildung 10b: Expression adipozytärer Marker auf Proteinebene im Verlauf der Differenzierung**

Die Expression adipozytärer Marker auf Proteinebene wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung mittels Western Blot analysiert. SREBP1c ist synonym zu ADD1 und wird als Vorläuferform mit 125 kDa und als geschnittene Form mit 68 kDa detektiert. Weitere Adipozytenmarker sind Perilipin A (62 kDa), Apolipoprotein E (34 kDa), Fatty Acid Synthetase FAS (265 kDa), Adipocyte Lipid Binding Protein aP2 (15 kDa) und Caveolin1 (22 kDa). Das Strukturprotein β-Aktin (42 kDa) ist als Beispiel für einen klassischen internen Standard abgebildet, der in diesem System reguliert wird.

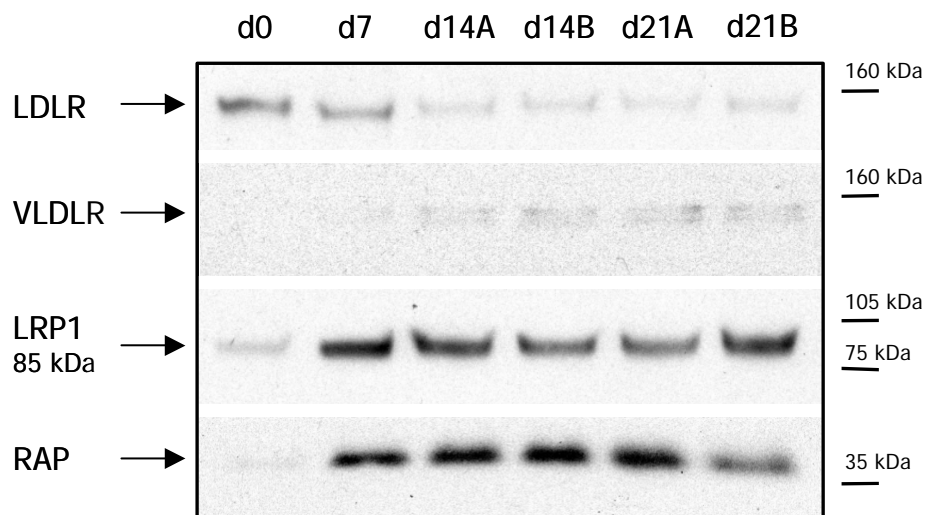
Apolipoprotein E (ApoE) gilt als Marker reifer Fettzellen. Es wird hier auf Proteinebene in Übereinstimmung mit den PCR-Daten erst in Proben differenzierter Zellen an Tag 7 detektiert, in undifferenzierten Zellen ist es nicht nachweisbar. Die Expression steigt mit dem Fortschreiten der Differenzierung an. Das Protein der Fettsäuresynthetase (FAS) wird hier schon in undifferenzierten Zellen, deutlich stärker aber ab Tag 7 der Differenzierung detektiert. Die Expression nimmt über den Differenzierungsverlauf weiter zu. Das fettzellspezifische aP2 wurde im hier untersuchten Zellsystem in undifferenzierten Zellen –

wie auf der Grundlage der mRNA-Expression erwartet – nicht exprimiert. Die Expression ist in Zellen von Tag 7 der Differenzierung an detektierbar und nimmt kontinuierlich bis Tag 21 zu. Dieses Ergebnis veranschaulicht sehr schön den steigenden Anteil an terminal differenzierten Fettzellen innerhalb der Probe. Ein weiterer Marker, der ausschließlich im Fettgewebe exprimiert wird, ist Perilipin A. Im Western Blot wurde das 62 kDa große Protein ab Tag 14 als klare Bande detektiert, die an Tag 21 noch etwas kräftiger ist. Die Expression von Perilipin B wurde nicht nachgewiesen. Caveolin 1 mit einem Molekulargewicht von 22 kDa ist vor allem als Strukturprotein der Caveolae der Plasmamembran bekannt. Seine Expression ist hier schon in undifferenzierten Zellen nachweisbar. Diese ist in allen Proben späterer Differenzierungszeitpunkte noch stärker. Als letztes ist in der Abbildung 10b das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin abgebildet, dessen Expression mit Fortschreiten der Differenzierung deutlich abnimmt. Aufgrund dieser Regulation kann es in diesem System nicht als interner Standard verwendet werden. Die Abnahme dieses Strukturproteins macht wie oben bereits dargestellt unter Berücksichtigung der Entwicklung der Zellmorphologie Sinn.

Die bisherige Expressionsanalyse der differenzierten Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigt, dass spätestens mit dem Tag 7 der Differenzierung eine präadipozytäre Zellpopulation vorliegt. Dies wird durch den Nachweis ausschließlich im Fettgewebe exprimierter Marker wie aP2 und Perilipin A untermauert. In den bisher dargestellten Analysen konnte im Vergleich der Zellen, die nach Protokoll A bzw. B differenziert wurden, kein Unterschied festgestellt werden. Vor allem die vergleichbare Expression von PPAR $\gamma$ -regulierten Proteinen in Zellen aus Tag 21 A und Tag 21 B weist darauf hin, dass in diesem System kein direkter Effekt des Rosiglitazons gemessen wird, sondern dass die Zellen tatsächlich stabil ausdifferenzieren.

Als ein bisher wenig untersuchter Aspekt wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster von Lipoproteinrezeptoren während der adipozytären Differenzierung untersucht. Die in Abbildung 10c dargestellten Western Blots zeigen für die Expression des LDLRs eine über den Verlauf der Differenzierung abnehmende Entwicklung. Ab Tag 14 ist nur noch eine schwache Bande zu erkennen. Der Very Low Density Lipoprotein-Rezeptor (VLDLR) zeigt aufgrund eines technischen Problems mit dem Antikörper nur eine sehr schwache Bande in den untersuchten Proben. An Tag 0 ist die Expression noch nicht nachweisbar, ab Tag 14 ein klarer Anstieg zu erkennen. Die kleine Untereinheit des LRP1 mit einem Molekulargewicht von 85 kDa ist entsprechend den PCR-Daten an Tag 0 nur ganz leicht, ab Tag 7 dann sehr deutlich exprimiert. Das Chaperon Receptor-associated Protein (RAP) mit einem Molekulargewicht von 39 kDa zeigt in diesem System ebenfalls eine steigende Expression über den Verlauf der Differenzierung, wird also mit LRP1 und dem VLDLR koreguliert.





**Abbildung 10c: Expression von Lipoproteinrezeptoren auf Proteinebene im Verlauf der adipozytären Differenzierung**

Die Expression der Lipoproteinrezeptoren wurde im Western Blot zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung untersucht. Der LDL-Rezeptor wird bei 120 kDa detektiert und mit fortschreitender Differenzierung abnehmend exprimiert. Die Expression des VLDL-Rezeptors (180 kDa), des LDLR-related Proteins LRP1 (85 kDa Untereinheit) und des Receptor-associated Proteins RAP (39 kDa) steigt im Verlauf der Differenzierung an.

### 3.3 Funktionale Charakterisierung

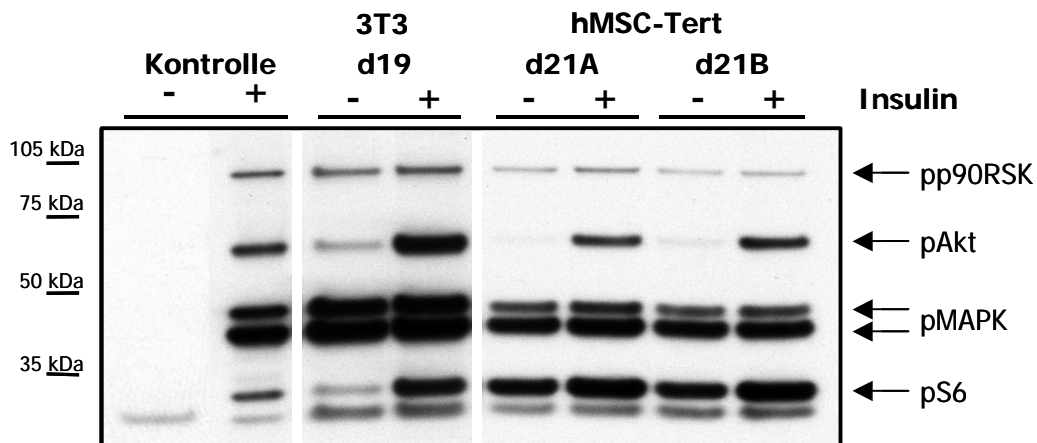
Ein Überangebot an Nahrungsstoffen wird im Fettgewebe in Form von Lipiden gespeichert und diese Energiereserve bei Nahrungskarenz in Form von Fettsäuren mobilisiert. Dieser fein regulierte Prozess wird postprandial maßgeblich durch Insulin gesteuert. Insulin bindet in physiologischen Konzentrationen an der Oberfläche der Fettzelle an den Insulinrezeptor. Dieser kann nachfolgend eine Reihe von Signalwegen aktivieren. Am bedeutendsten für die Vermittlung der metabolischen Wirkung von Insulin ist die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase (PI3K) mit anschließender Aktivierung der Phosphatidylinositol-abhängigen Kinase (PDK) 1 und der Akt-Kinase (auch Proteinkinase B). Diese Proteinserin- oder Proteinthreoninkinasen geben das Signal in verschiedene Richtungen weiter. Zum Beispiel ist eine Beteiligung von Akt an der Auslösung der GLUT4-Translokation neben dem ebenfalls durch Insulin aktivierten CAP/Cbl-Weg beschrieben. Weiterhin vermittelt sie die Aktivierung der Glykogensynthese über die Hemmung der Glykogensynthase Kinase (GSK) 3, die Induktion der Fettsäuresynthese und Wirkungen auf die Proteinbiosynthese über den Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)/p70 S6 Ribosomal Protein Kinase (p70S6K)-Weg. Insulin aktiviert unter Beteiligung der Insulinrezeptor Substrate (IRS) den Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg, der auch durch andere Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Diese

Signalkaskade ist für eine allgemeine mitogene Wirkung des Insulins von Bedeutung und spielt keine Rolle bei der Vermittlung der metabolischen Antwort. Zur funktionalen Charakterisierung des adipozytären Zellsystems wurde die insulinvermittelte Signalübertragung untersucht.

### 3.3.1 Untersuchungen zur Insulinsensitivität

Die Reaktion der Zellen auf einen Insulinstimulus wurde anhand des Phosphorylierungszustandes einer Auswahl von Signalproteinen untersucht. Dafür wurden über Nacht gehungerte Zellen für 15 min einer Konzentration von 50 nM Insulin ausgesetzt. Das gewonnene Gesamtzellprotein wurde im Western Blot mit einem Gemisch von Antikörpern inkubiert, das jeweils die phosphorylierte Form der Akt-Kinase, des S6 Ribosomal Proteins (S6), der p42/p44MAP-Kinasen und der p90 Ribosomal S6 Kinase (p90RSK) erkennt. Die getroffene Auswahl an Proteinen ermöglicht es, den Aktivierungszustand des PI3K/Akt-Signalweges mit Akt im oberen und S6 im unteren Bereich und des MAPK-Wegs mit der p90RSK unterhalb der beiden MAP-Kinasen zu dokumentieren. Die Normalisierung erfolgte wie schon in Punkt 3.2.2 und Abbildung 10a dargestellt über die Angleichung der Proteinkonzentration der Proben und eine Kontrolle mittels Ponceau-Färbung. Wie dort bereits erwähnt, wurde in keinem der Versuche ein Einfluss des Insulins auf die Proteinsynthese festgestellt.

Abbildung 11a stellt das Ergebnis der Untersuchung differenzierter 3T3-L1 und hMSC-Tert Zellen dar.

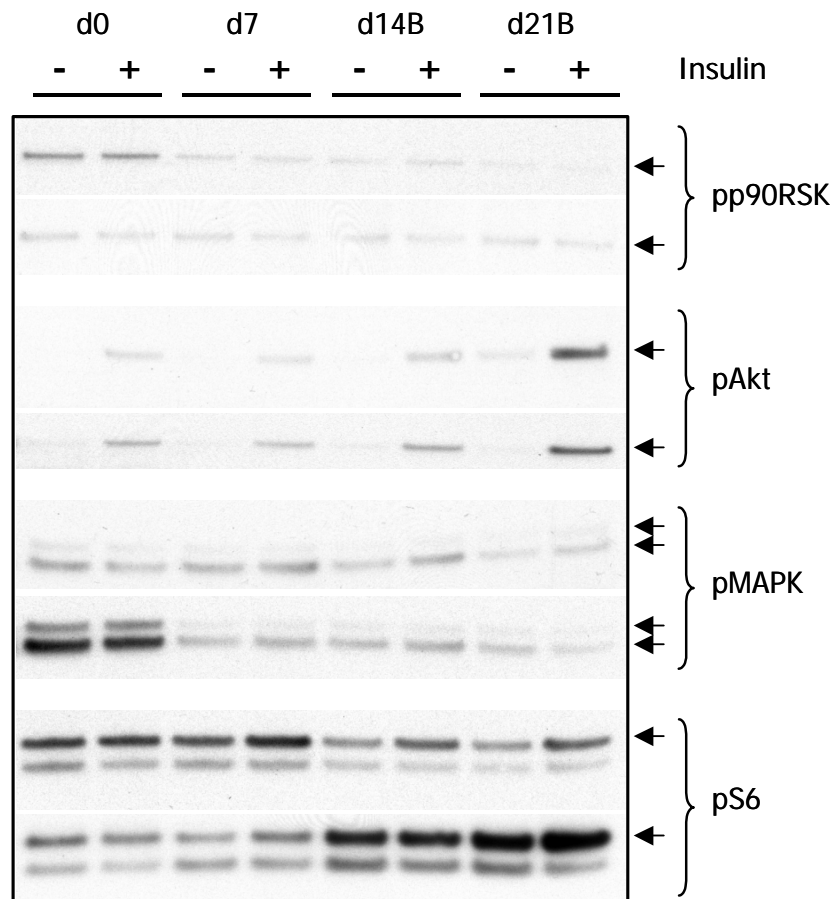


**Abbildung 11a: Insulinabhängige Phosphorylierung in differenzierten 3T3-L1 und hMSC-Tert Adipozyten**

Über Nacht gehungerte differenzierte Zellen wurden 15 min lang mit 50 nM Insulin stimuliert und das Gesamtzellprotein mit einem Antikörpergemisch auf eine Auswahl phosphorylierter Proteine des Akt- und des MAPK-Signalwegs getestet. Als Kontrollen wurde Lysat unstimulierter und Platelet Derived Growth Factor-stimulierter HEK-Zellen mitgeführt. Die murinen 3T3-L1 Adipozyten zeigen als Antwort auf den Insulinstimulus eine starke Phosphorylierung von Akt (60 kDa) und S6 Ribosomal Protein (32 kDa). Die hMSC-Tert Adipozyten weisen ebenfalls eine starke Phosphorylierung von Akt auf. Die MAP-Kinasen (42 kDa, 44 kDa) und die p90 Ribosomal S6 Kinase (90 kDa) liegen unabhängig von der Insulineinwirkung in phosphorylierter Form vor.

Zur Kontrolle wurde im abgebildeten Versuch ein kommerzielles Lysat unbehandelter und stimulierter Zellen mitgeführt (Kontrolle -/+). In beiden Zelllinien erfolgt klar erkennbar die Phosphorylierung der Akt-Kinase, detektiert auf einer Höhe von 60 kDa, in Reaktion auf den Insulinstimulus. In den 3T3-L1 Adipozyten ist dieser Effekt noch ausgeprägter als in den differenzierten hMSC-Tert Zellen. Die Aktivierung des Akt-Signalweges unter Insulineinfluss ist in den 3T3-L1 Zellen weiterführend als Phosphorylierung von S6 zu beobachten. Im Gegensatz dazu weisen die hMSC-Tert Zellen im unbehandelten Zustand schon eine sehr starke Phosphorylierung von S6 auf, die sich unter Insulineinfluss nur noch unwesentlich steigert. Die p42/p44MAPK liegen sowohl in den 3T3-L1 als auch in den hMSC-Tert Adipozyten unabhängig vom Insulinstimulus in phosphorylierter Form vor. In den hMSC-Tert Zellen ist dabei die Bande der p42MAPK prominenter als die der größeren p44MAPK. Die Beobachtung eines aktivierten basalen Zustandes ist in der Phosphorylierung der p90RSK wiederzuerkennen. Diese im Signalweg unterhalb der MAPK liegende Kinase zeigt in ihrem Phosphorylierungsgrad ebenfalls keinen Unterschied zwischen dem unbehandelten und dem stimulierten Zustand. In den hMSC-Tert Zellen verhalten sich alle untersuchten Signalproteine unabhängig vom verwandten Differenzierungsprotokoll (A oder B) gleich.

In nachfolgenden Versuchen wurde die Phosphorylierung in hMSC-Tert Zellen über den Verlauf der Differenzierung untersucht. Undifferenzierte und Zellen an Tag 7, Tag 14 und Tag 21 der Differenzierung wurden wie beschrieben mit Insulin stimuliert und analysiert. In Abbildung 11b sind für jedes untersuchte Signalprotein zwei unabhängig voneinander durchgeführte Western Blots dargestellt. Die Akt-Kinase wird in allen untersuchten Zellproben, das heißt im undifferenzierten Zustand so wie zu jedem Zeitpunkt der Differenzierung, durch den Einfluss von Insulin phosphoryliert. Ohne Stimulation ist kein phosphoryliertes Protein nachweisbar. Dieser Effekt ist in den voll ausdifferenzierten Zellen an Tag 21 am stärksten zu erkennen. Das in der Signalkaskade unterhalb der Akt liegende S6 ist in allen Proben schon ohne Insulinreiz phosphoryliert. In den Proben von Tag 14 und Tag 21 ist eine leichte Steigerung der Phosphorylierung bei Insulinzusatz zu erkennen. Auch die MAPK und p90RSK liegen unabhängig von der Behandlung in allen Proben – zwar teilweise nur schwach aber immer eindeutig – in phosphorylierter Form vor. Die präsentierten Versuche zeigen eine klare insulinabhängige Phosphorylierung von Akt in undifferenzierten und differenzierenden hMSC-Tert Zellen. Dieser Effekt konnte reproduzierbar gezeigt werden und ist in voll ausdifferenzierten Adipozyten (Abb. 11b: Tag 21) am stärksten messbar. Das der Akt-Kinase im Signalweg nachgeschaltete S6 ist dagegen schon in unbehandelten Proben aktiviert. Auch die MAPK sind in unbehandelten Zellen bereits aktiviert.

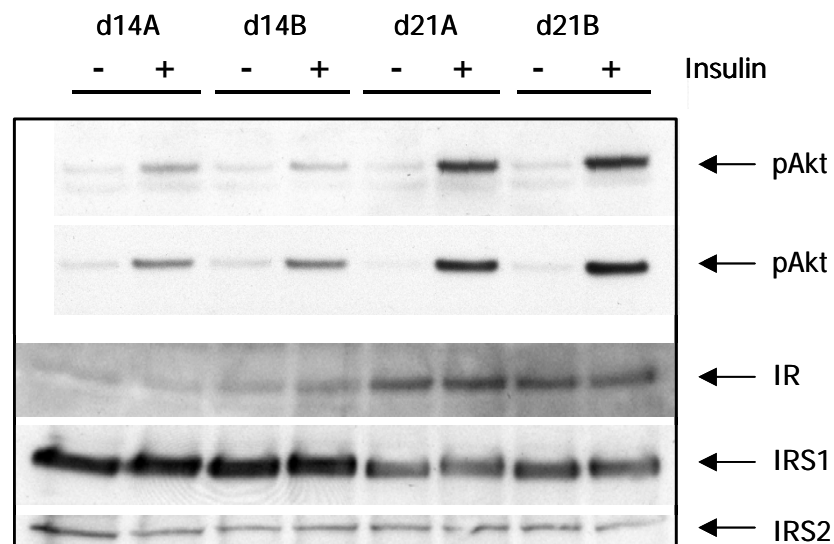


### Abbildung 11b: Insulinabhängige Phosphorylierung im Verlauf der adipozytären Differenzierung

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung wurden hMSC-Tert Zellen über Nacht in serumfreiem Medium gehungert und für 15 min mit 50 nM Insulin stimuliert. Das Lysat wurde im Western Blot auf phosphorylierte Signalproteine getestet. Für jedes der untersuchten Proteine werden zwei Blots aus unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt. Die Akt-Kinase ist zu jedem getesteten Zeitpunkt der Differenzierung mit Insulin stimulierbar. Die anderen Signalproteine sind bereits basal aktiviert und zeigen keine nennenswerte Reaktion auf den Insulinstimulus.

Abbildung 11c vergleicht die insulinabhängige Phosphorylierung von Akt in Zellen differenziert nach Protokoll A bzw. Protokoll B. Dabei wurden die Zeitpunkte Tag 14 und Tag 21 gegenübergestellt. Die Aktivierung von Akt unterscheidet sich zwischen den Proben des Differenzierungsprotokolls A und B nicht, aber die Insulinantwort ist – wie bereits beobachtet – in den Zellen des Tag 21 deutlich stärker. Die darunter abgebildeten Western Blots dokumentieren die Expression von nicht phosphoryliertem Insulinrezeptor (IR) sowie IRS1 und IRS2. Die Expression des Insulinrezeptors steigt von Tag 14 auf Tag 21 an. Sollte sich die Zunahme der Expression in einer vermehrten Aktivierbarkeit der Zelle durch Insulin widerspiegeln, könnte dieser Sachverhalt die verstärkte Akt-Aktivierung als Antwort auf Insulin erklären. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste die Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors unter diesen Bedingungen untersucht werden. IRS1, welches tatsächlich für die Vermittlung der metabolischen Insulinantwort

wichtig ist, ist an Tag 21 weniger stark exprimiert als an Tag 14. Die Expression von IRS2 ist dagegen unverändert. Um die Beteiligung von IR, IRS1 und IRS2 an der Vermittlung der verstärkten Akt-Phosphorylierung genau darzustellen, muss deren Phosphorylierungszustand untersucht werden.



**Abbildung 11c: Vergleich der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt in hMSC-Tert Zellen differenziert nach Protokoll A und B**

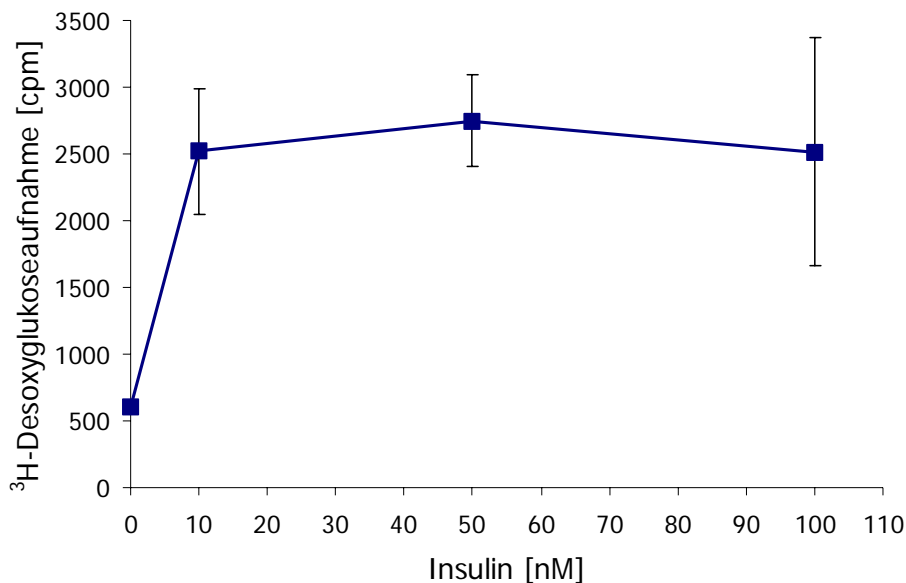
An Tag 14 und Tag 21 der Differenzierung wurden hMSC-Tert Zellen die nach Protokoll A bzw. B differenziert wurden, über Nacht gehungert und 15 min lang mit 50 nM Insulin stimuliert. Das Lysat wurde im Western Blot auf phosphoryliertes Akt und auf die Expression von Insulin Rezeptor (IR) und Insulin Rezeptor Substrat (IRS) 1 und 2 untersucht. Die Phosphorylierung von Akt (60 kDa) ist in den Zellen beider Differenzierungsprotokolle detektierbar, an Tag 21 deutlich stärker als an Tag 14. Eine mögliche Erklärung dafür ist die verstärkt erscheinende Expression des Insulinrezeptors (95 kDa) an Tag 21. Das IRS1 (170 kDa) ist an Tag 21 schwächer exprimiert als an Tag 14. Die Expression von IRS2 (170 kDa) ist unverändert.

### 3.3.2 Insulinabhängige Glukoseaufnahme

In einer umfassenden Versuchsreihe wurde die funktionale Aktivität des Zellmodells anhand der insulinabhängigen Glukoseaufnahme getestet. Gehungerte Zellen wurden dafür eine Stunde mit Insulin und radioaktiv markierter 2-Desoxyglukose inkubiert, die aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe intrazellulär nicht verstoffwechselt werden kann. Folglich entspricht die nach dem Versuch im Gesamtzelllysat gemessene Radioaktivität der aufgenommenen Menge an Glukose. Die Anwesenheit von 200  $\mu$ M nicht markierter Glukose sorgt dafür, dass die Aufnahme der markierten Glukose mit großer Wahrscheinlichkeit über spezifische Wege erfolgt.

Um den Versuchsaufbau zu testen, wurde das etablierte Adipozytenmodell der 3T3-L1 Zellen verwendet, für das die insulinabhängige Glukoseaufnahme vielfach beschrieben ist.

Die Zellen wurden über 19 Tage differenziert und die Glukoseaufnahme in Abhängigkeit einer steigenden Insulinkonzentration im Dreifachwert gemessen.

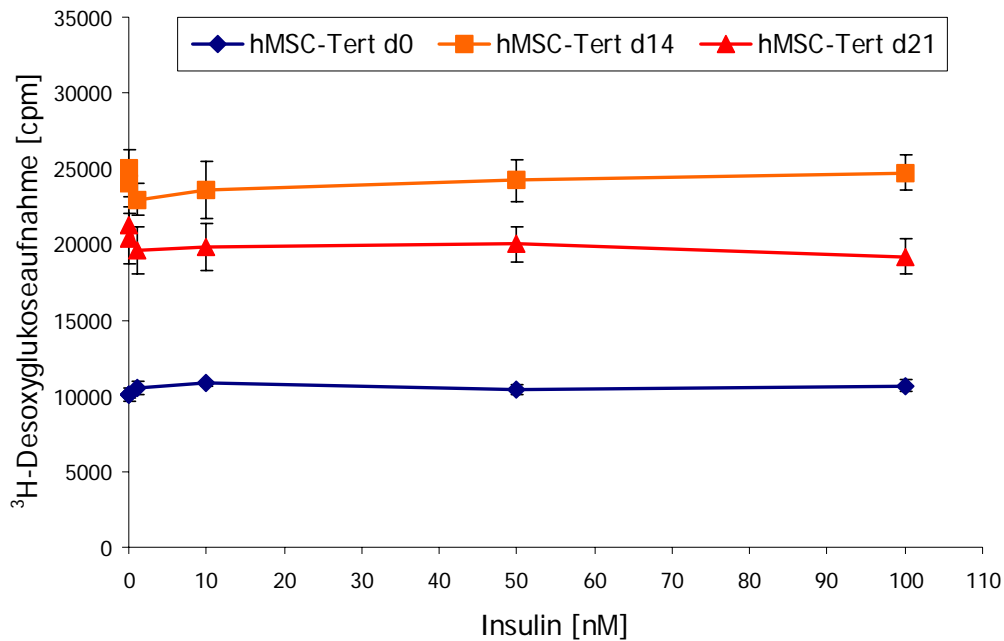


**Abbildung 12a: <sup>3</sup>H-Desoxyglucoseaufnahme in differenzierten 3T3-L1 Zellen**

Differenzierte 3T3-L1 Zellen (Tag 19) wurden über Nacht in serumfreiem Hungermedium kultiviert und eine Stunde lang mit 112 nM <sup>3</sup>H-Desoxyglukose in Anwesenheit von 200 µM nicht markierter Glukose und verschiedenen Insulinkonzentrationen inkubiert. Die Aufnahme von <sup>3</sup>H-Desoxyglukose nimmt abhängig von der Insulinkonzentration zu (n=3).

Wie in Abbildung 12a dargestellt, ist schon bei der Gabe von 10 nM Insulin ein massiver Anstieg über die insulinunabhängige Aufnahme zu messen. Spätestens ab einer Insulinkonzentration von 50 nM befindet sich die Kurve der Aufnahme in der Sättigung. Der maximal gemessene Anstieg liegt bei Faktor 4,6. Relativ große Standardabweichungen z. B. im Wert für 100 nM Insulin sind auf Varianzen in der Differenzierung zwischen den Proben der Mehrfachwerte zurückzuführen. Die murinen 3T3-L1 Adipozyten zeigen in diesem Experiment also eine erwartungsgemäß ausgeprägte Insulinantwort in Form einer gesteigerten Aufnahme extrazellulärer Glukose.

Der Versuch wurde mit demselben Ablauf in hMSC-Tert Zellen im undifferenzierten Zustand, nach 14 Tagen und nach 21 Tagen Differenzierung durchgeführt. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 12b als Mittelwert von jeweils 5 Proben dargestellt. Die Zellen zeigen weder undifferenziert noch differenziert eine Insulinabhängigkeit der Glukoseaufnahme. Das gilt für alle getesteten Insulinkonzentrationen. Die Glukoseaufnahme differenzierter Adipozyten ist deutlich höher als die undifferenzierter hMSC-Tert Zellen. Dabei liegt der Mittelwert an Tag 14 2,3fach über dem an Tag 0, während die Zunahme an Tag 21 (1,9fach) nicht ganz so hoch ist.



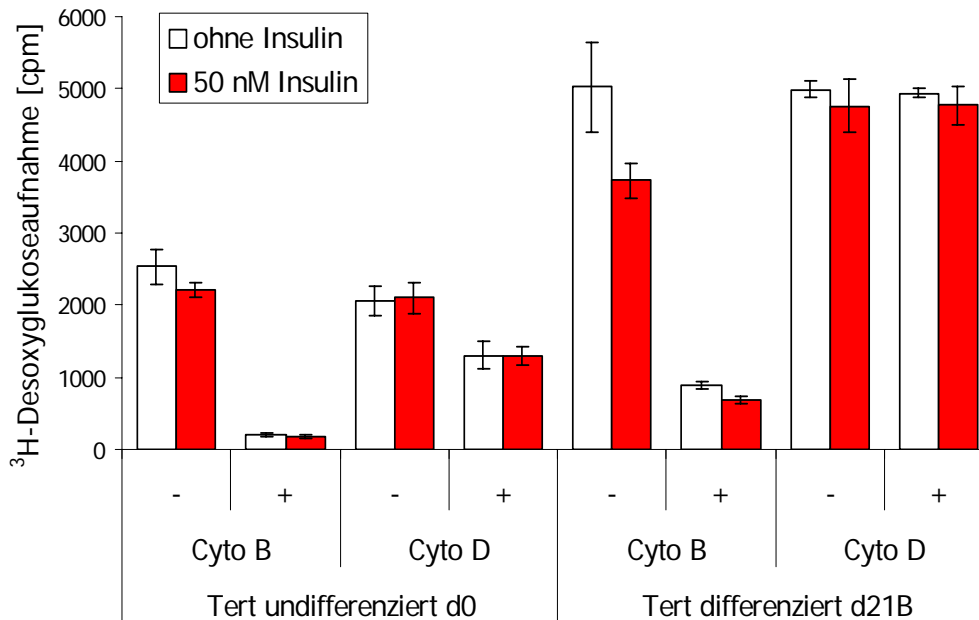
#### Abbildung 12b: <sup>3</sup>H-Desoxyglucoseaufnahme in hMSC-Tert Zellen

Die Glukoseaufnahme wurde wie in Abbildung 12a beschrieben durchgeführt. Die basale Aufnahme ist an Tag 14 am höchsten, für undifferenzierte Zellen (Tag 0) am niedrigsten. Die Aufnahme ist unabhängig von der verwendeten Insulinkonzentration (n=5).

Zusammengefasst ist in hMSC-Tert Zellen weder in den undifferenzierten Stammzellen, noch in Präadipozyten oder Adipozyten im Verlauf der Differenzierung eine insulinvermittelte Glukoseaufnahme zu sehen. Die insulinunabhängige Aufnahme ist in undifferenzierten Zellen bereits sehr hoch und steigt mit Fortschreiten der Differenzierung weiter an.

In einem leicht abgeänderten Versuchsprotokoll wurde untersucht, ob die messbare Glukoseaufnahme mit Cytochalasin B und Cytochalasin D hemmbar ist. Diese aus Pilzen isolierten Metabolite inhibieren den Glukosetransport in die Zelle. Cytochalasin B hemmt spezifisch die rezeptorvermittelte Aufnahme über eine direkte Bindung an die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4. Das Cytochalasin D dagegen hat nur eine sehr geringe Affinität zu den Glukosetransportern. Stattdessen wirkt es in viel stärkerem Maße als das Cytochalasin B auf das Aktinskelett der Zelle, indem es dessen durch Insulin ausgelöste Verdichtung rückgängig macht. Dies verhindert die Translokation sowohl von GLUT4 als auch von GLUT1 in die Plasmamembran als Antwort auf einen Insulinstimulus und hemmt so die insulinvermittelte Glukoseaufnahme. Undifferenzierte und terminal differenzierte hMSC-Tert Zellen wurden 10 min mit Insulin, weitere 10 min mit Insulin und Cytochalasin B bzw. Cytochalasin D vorinkubiert und dann die Aufnahme von 2-Desoxyglukose über 10 min gemessen. Die Messung wurde in differenzierten Zellen des Tag 21B durchgeführt, da wie in Abbildung 12b dargestellt die Glukoseaufnahme weder

an Tag 14 noch an Tag 21 insulinabhängig war, die Zellen aber gemessen an der Morphologie und den weiteren bestimmten Charakteristika an Tag 21 eher ausdifferenzierte Adipozyten darstellen. Abbildung 12c zeigt die Mittelwerte aus drei Einzelwerten.



**Abbildung 12c: <sup>3</sup>H-Desoxyglucoseaufnahme in hMSC-Tert Zellen in Anwesenheit von Cytochalasin B oder Cytochalasin D**

Die Glukoseaufnahme wurde in undifferenzierten (d0) und differenzierten (d21B) hMSC-Tert Zellen gemessen. Diese wurden über Nacht in Hungermedium inkubiert, 10 min ohne/mit 50 nM Insulin vorinkubiert, weitere 10 min ohne/mit 50 nM Insulin und 10 µM Cytochalasin B bzw. Cytochalasin D und nachfolgend für 10 min 56 nM <sup>3</sup>H-Desoxyglukose in Anwesenheit von 50 µM nicht markierter Glukose ausgesetzt (n=3).

Auch in diesem experimentellen Aufbau war kein Einfluss von Insulin auf die Glukoseaufnahme messbar. In differenzierten Zellen (Tag 21) ist die Aufnahme ungefähr doppelt so hoch wie in undifferenzierten (Tag 0). Dieses Ergebnis stimmt mit den vorherigen Messungen überein. Die Aufnahme der Glukose ist zu beiden untersuchten Zeitpunkten der Differenzierung durch 10 µM Cytochalasin B hemmbar. In undifferenzierten Zellen wird die Aufnahme fast komplett unterdrückt (Reduktion auf 8%), an Tag 21 erfolgt eine Reduktion auf 18%. Die Inkubation mit Cytochalasin D bewirkt eine Reduktion der Aufnahme auf 63% in undifferenzierten und keine Inhibition in differenzierten hMSC-Tert Zellen.

Um zu untersuchen, ob der fehlende Insulineffekt auf die Glukoseaufnahme im hMSC-Tert Modell auf die Natur der Zellen als Knochenmarkstammzellen zurückzuführen ist, wurden als physiologischer Vergleich primäre humane mesenchymale Stammzellen



herangezogen. Diese wurden ebenfalls aus dem Knochenmark isoliert und entwickeln sich bei Anwendung des etablierten adipozytären Differenzierungsprotokolls entsprechend den hMSC-Tert Zellen. Die Glukoseaufnahme wurde über eine Stunde in Anwesenheit von 50 nM Insulin und 200  $\mu$ M nicht markierter Glukose gemessen. In Abbildung 12d ist das Ergebnis des Vergleichs von differenzierten primären Stammzellen (Tag 22) mit undifferenzierten und über 14 Tage bzw. 21 Tage differenzierten hMSC-Tert Zellen dokumentiert. Die Abbildung stellt exemplarisch das Ergebnis eines Versuchs von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar.



**Abbildung 12d:  $^3$ H-Desoxyglukoseaufnahme in differenzierten hMSC-Tert Zellen und differenzierten primären humanen Stammzellen**

Primäre humane Stammzellen aus dem Knochenmark wurden über 22 Tage nach demselben Protokoll adipozytär differenziert wie die hMSC-Tert Zellen. Die Glukoseaufnahme wurde durchgeführt wie in Abbildung 12a beschrieben. In dieser Abbildung sind exemplarisch für drei unabhängig durchgeführte Versuche Ergebnisse aus einem Experiment dargestellt. Die differenzierten Zellen wurden dabei in unabhängigen Vierfachansätzen ( $n=4$ ) und die undifferenzierte hMSC-Tert Kontrolle im Doppelwert bestimmt ( $n=2$ ).

Die Glukoseaufnahme zeigte in keiner der untersuchten Proben eine Insulinabhängigkeit. Auch in undifferenzierten primären Stammzellen konnte kein Insulineffekt gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die Werte sind bereits ohne Insulingabe relativ hoch und steigen mit dem Fortschreiten der Differenzierung – wie schon in den vorherigen Versuchen gesehen – weiter an (4,2fach auf Tag 21). Die Glukoseaufnahme in den differenzierten primären Stammzellen ist deutlich niedriger als in den entsprechenden differenzierten hMSC-Tert Zellen (3,2fach). Dieses Experiment demonstriert, dass sich zu Adipozyten ausdifferenzierte primäre Stammzellen nicht anders verhalten als die aus hMSC-Tert Zellen entwickelten Adipozyten. Keines der beiden Zellsysteme zeigt unter diesen Bedingungen eine insulinabhängige Glukoseaufnahme.

Die Untersuchungen zur insulinabhängigen Glukoseaufnahme haben reproduzierbar gezeigt, dass es eine starke insulinunabhängige Glukoseaufnahme in undifferenzierten und differenzierten hMSC-Tert Zellen gibt. Unter den hier verwandten Bedingungen konnte keine Insulinwirkung auf die Aufnahme gemessen werden. In diesem Verhalten unterscheidet sich das entwickelte Zellmodell vom 3T3-L1 System eines Mausadipozyten, jedoch nicht von primären humanen Knochenmarksstammzellen, die adipozytär differenziert wurden.

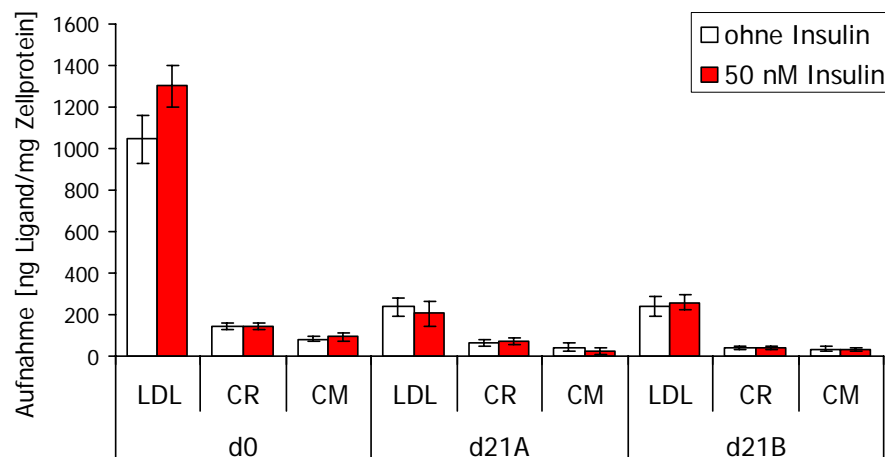
### 3.3.3 Lipoproteinaufnahme

Wie in Abbildung 10c (Punkt 3.2.2) dargestellt, wurde die Expression von Lipoproteinrezeptoren in differenzierenden hMSC-Tert Zellen bestimmt. Deren Funktionalität wurde in Versuchen zur Aufnahme von Lipoproteinen getestet. Das Apolipoprotein B<sub>100</sub> humaner Low Density Lipoproteins (LDL) bzw. vornehmlich das ApoE der Chylomikronenremnants (CR) und Chylomikronen (CM) wurde mit <sup>125</sup>I markiert und die Aufnahme der Partikel in die Zellen über 30 min gemessen. Vorher wurden die Zellen für 10 min mit 50 nM Insulin inkubiert. Dies dient der Detektion eines möglichen Einflusses von Insulin auf diesen vornehmlich postprandial ablaufenden Vorgang.

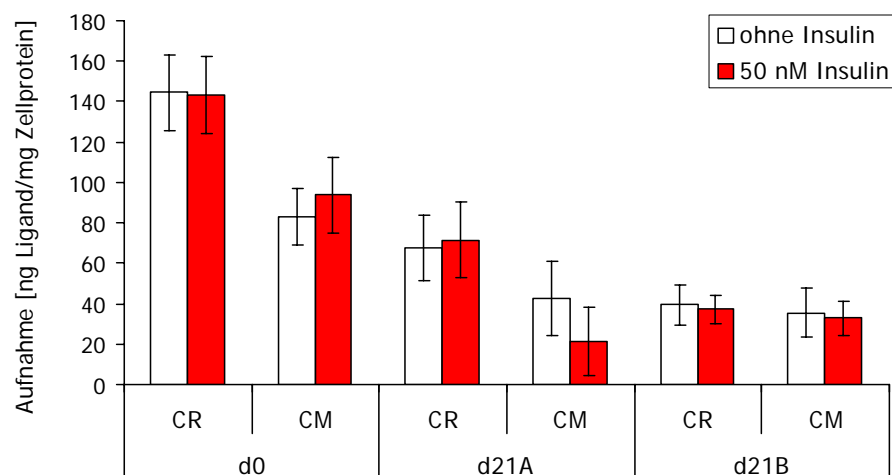
Abbildung 13a zeigt das Ergebnis der Lipoproteinaufnahme. Das obere Diagramm (A) stellt die Aufnahme von LDL, CR und CM in undifferenzierten und differenzierten hMSC-Tert Zellen dar. Abbildung 13a B bildet als Ausschnitt davon nur die Aufnahme von CR und CM mit größerem Maßstab auf der Ordinate ab. Die Aufnahme der markierten Lipoproteine ist als ng Ligand pro mg Zellprotein aufgetragen. Die Aufnahme der LDL ist in allen untersuchten Zuständen am höchsten. Im Verlauf der Differenzierung sinkt sie von Tag 0 auf Tag 21A bzw. Tag 21B ca. um das Sechsfache ab. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der gemessenen Abnahme des LDL-Rezeptor Proteins.

Die Aufnahme von CR bzw. CM ist wie oben erwähnt deutlich niedriger als die der LDL, in undifferenzierten Zellen ungefähr 12fach, in differenzierten Zellen im Mittel ca. 5fach. Dabei werden die CR besser aufgenommen als die CM. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da CM in der Peripherie zu CR abgebaut werden und diese quasi die physiologische Form der CM sind, die in die Zelle aufgenommen werden. Die Aufnahme sowohl der CR als auch der CM sinkt von Tag 0 auf Tag 21 ab (CR: 2x auf Tag 21A, 3,6x auf Tag 21B; CM: 3x auf Tag 21A und B). Die CR-Aufnahme ist in nach Protokoll B differenzierten Zellen geringfügig niedriger (Faktor 1,74) als in denen des Protokolls A. Keine der untersuchten Partikel zeigt einen konsistenten Insulineffekt bei der Aufnahme durch die Fettzelle.

A



B

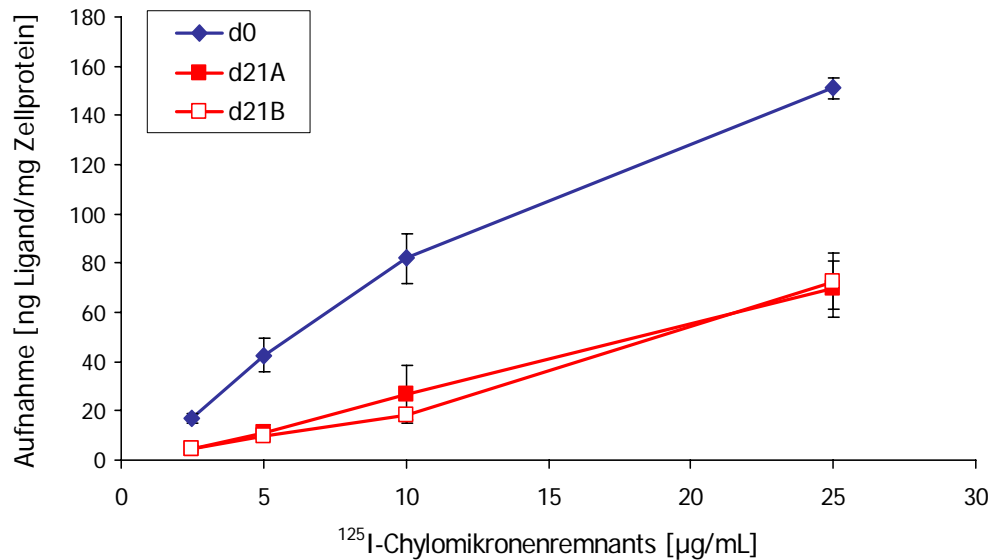


### Abbildung 13a: $^{125}\text{I}$ -Lipoproteinaufnahme in differenzierten hMSC-Tert Zellen

Undifferenzierte (d0) und differenzierte (d21A, d21B) hMSC-Tert Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium gehungert, für 10 min ohne/mit 50 nM Insulin vorinkubiert und mit 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LDL, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chylomikronenremnants (CR) bzw. 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chylomikronen (CM) inkubiert. In A ist die Aufnahme aller Partikel dargestellt, in B als Ausschnitt die Aufnahme von Chylomikronenremnants und Chylomikronen ( $n=4$ ).

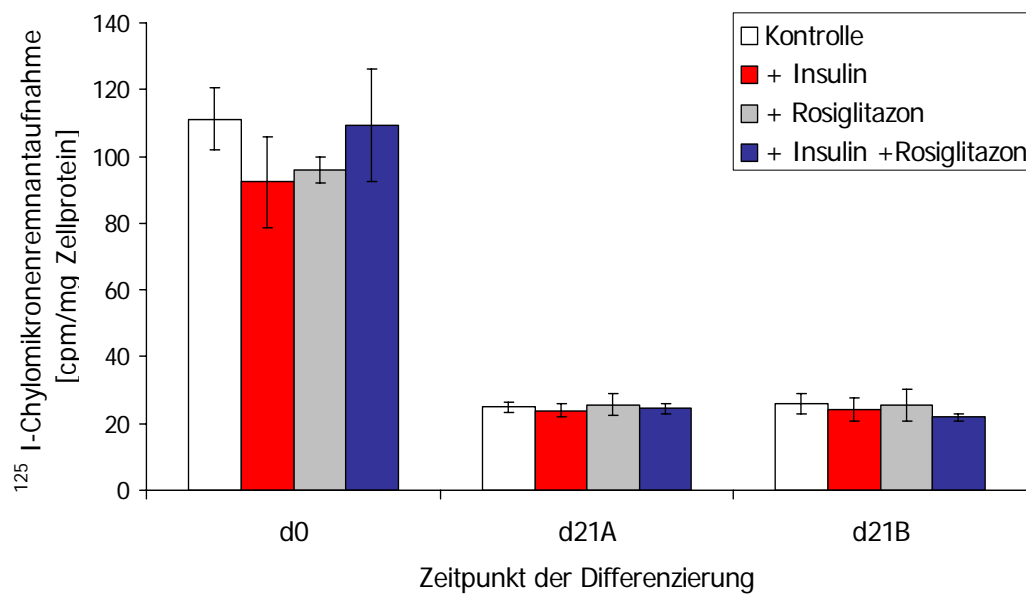
In Abbildung 13b ist die spezifische Aufnahme von Chylomikronenremnants in undifferenzierte und differenzierte hMSC-Tert Zellen in Abhängigkeit der  $^{125}\text{I}$ -CR Konzentration dargestellt. In diesem Versuch wurde eine Kaltunterdrückung mit nicht markierten Partikeln im 30fachen Überschuss durchgeführt, was eine Abschätzung der Aufnahme über spezifische Wege ermöglicht. Das Ergebnis zeigt das Mittel aus vier Einzelwerten. Die Aufnahme steigt in allen untersuchten Zuständen konzentrationsabhängig an. Für alle getesteten Partikelkonzentrationen ist sie in undifferenzierten Zellen mindestens 2fach höher als in differenzierten. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $^{125}\text{I}$ -CR beträgt der Unterschied Faktor 4. Das entspricht dem in Abbildung 13a dargestellten

Ergebnis. Die gemessene rezeptorvermittelte Aufnahme lässt ein Erreichen der Sättigung in höheren Konzentrationen erwarten.



**Abbildung 13b: Spezifische  $^{125}\text{I}$ -Chylomikronenremnantaufnahme in hMSC-Tert Zellen**  
Undifferenzierte (d0) und differenzierte (d21A, d21B) hMSC-Tert Zellen wurden über Nacht in Hungermedium kultiviert und über 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von  $^{125}\text{I}$ -Chylomikronenremnants inkubiert. Die Kaltunterdrückung wurde mit 30fachem Überschuss im Protein nicht markierter Chylomikronenremnants durchgeführt (n=4).

Um den Einfluss einiger der Differenzierungszusätze auf die Lipoproteinaufnahme zu untersuchen, wurde die spezifische  $^{125}\text{I}$ -CR Aufnahme mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/mL}$  CR in undifferenzierten und differenzierten hMSC-Tert Zellen untersucht, die 24 h vor dem Versuch mit entweder Insulin oder Rosiglitazon oder beiden Zusätzen inkubiert worden waren. Wie in Abbildung 13c dokumentiert, nimmt keiner der Zusätze einen Einfluss auf die Lipoproteinaufnahme. Das Absinken der spezifischen Aufnahme von Tag 0 auf Tag 21 konnte reproduziert werden. Das Maß der Abnahme (ungefähr 4fach) entspricht dem in Abbildung 13b präsentierten Ergebnis für 10  $\mu\text{g/mL}$   $^{125}\text{I}$ -CR.



**Abbildung 13c: Spezifische  $^{125}\text{I}$ -Chylomikronremnantaufnahme in hMSC-Tert Zellen unter Einfluss von Insulin und Rosiglitazon**

Undifferenzierte (d0) und differenzierte (d21A, d21B) hMSC-Tert Zellen wurden über eine Stunde mit  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$   $^{125}\text{I}$ -Chylomikronremnants in Anwesenheit von  $2\ \mu\text{M}$  Insulin und/oder  $1\ \mu\text{M}$  Rosiglitazon inkubiert. Die Kaltunterdrückung wurde mit 66fachem Überschuss durchgeführt (n=3).

Zusammenfassend ist in undifferenzierten Stammzellen und differenzierten Adipozyten des hMSC-Tert Systems die Aufnahme von LDL effektiver als die von CR und CM. Es ist keine Insulinabhängigkeit dieses Prozesses messbar. Für alle drei Partikelgruppen nimmt die Aufnahme im Verlauf der Differenzierung deutlich ab. Weiterhin ist die spezifische Aufnahme von CR sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Zellen ein konzentrationsabhängiger und wahrscheinlich sättigbarer Prozess.

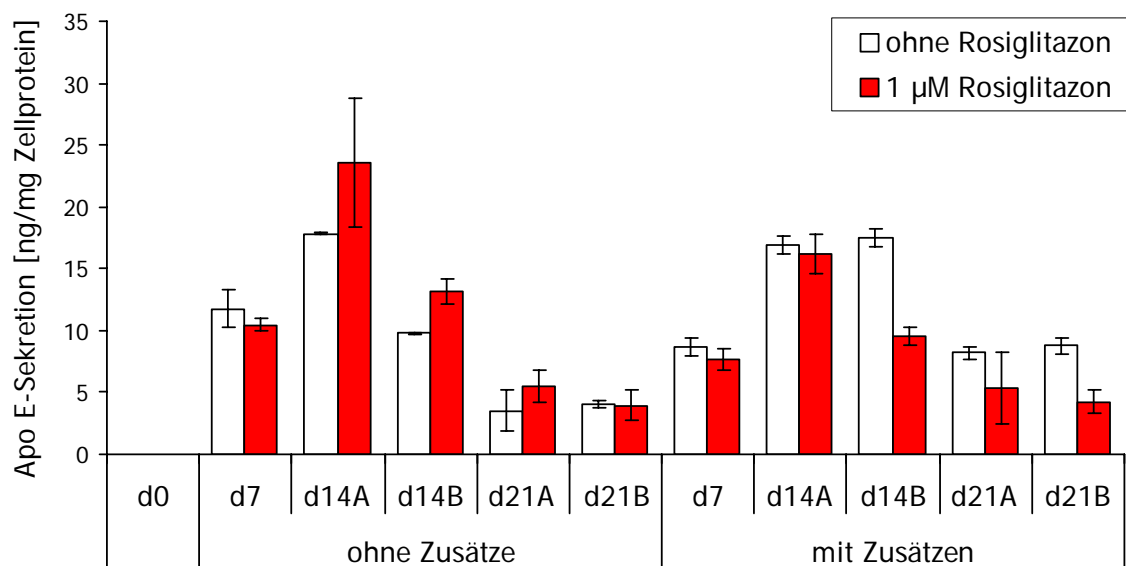
### 3.3.4 Sekretion von Proteinen

Das Fettgewebe wird auch als endokrines Organ bezeichnet. Diese Benennung rührt von der Eigenschaft der Adipozyten her, eine Reihe von Peptidhormonen und Proteinen zu synthetisieren und sekretieren, die entweder in ihrer nahen Umgebung (autokrin oder parakrin) oder aber systemisch (endokrin) Einfluss auf die Steuerung der Nahrungsaufnahme, den Energie- und Lipidstoffwechsel oder das Immunsystem nehmen.

Die Expression des ApoE wurde schon auf Proteinebene untersucht und mit Fortschreiten der Differenzierung ein Anstieg festgestellt (siehe Abbildung 10b in Punkt 3.2.2). ApoE besitzt ein 18-Aminosäuren langes Signalpeptid, das der Kennzeichnung als sekretorisches Protein dient. Es wurden hMSC-Tert Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung über Nacht in Hungermedium mit und ohne Rosiglitazon kultiviert und

in diesen Überständen mittels ELISA die ApoE-Konzentration bestimmt. Die Inkubation erfolgte in Hungermedium, da der Serumanteil von 5% FCS im Standardmedium einen zu hohen ApoE-Hintergrund in der nachfolgenden ELISA-Messung verursachte. Um einen eventuellen Einfluss der Differenzierungszusätze auf die ApoE-Sekretion zu testen, wurden in diesem Versuch zwei Probengruppen verglichen. Die Zellen der ersten Gruppe (ohne Zusätze) wurden vor dem Versuch zwei Tage lang auf Standardmedium gesetzt, um die Differenzierungszusätze auszuwaschen. Die Vergleichsgruppe (mit Zusätzen) wurde bis zur Versuchsdurchführung auf Medium mit Differenzierungszusätzen gehalten.

Abbildung 14a stellt das Ergebnis des beschriebenen Versuches dar. Die ApoE-Sekretion ist angegeben in ng ApoE pro mg Zellprotein.



#### Abbildung 14a: Apolipoprotein E-Sekretion in Anwesenheit von Rosiglitazon

Die Sekretion von ApoE wurde in hMSC-Tert Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung gemessen. Die Zellen einer Probengruppe wurden vor dem Versuch für 2 Tage auf Standardmedium gesetzt, um die Differenzierungszusätze auszuwaschen (ohne Zusätze). Die Zellen der anderen erhielten weiterhin Standardmedium mit Differenzierungszusätzen (mit Zusätzen). Alle Zellen wurden über Nacht auf serumfreies Medium ohne/mit 1 µM Rosiglitazon gesetzt. In diesem Überstand wurde mittels Elisa die Konzentration des ApoE bestimmt (n=2).

Wie aufgrund der Expressionsdaten erwartet, wird an Tag 0 kein ApoE sekretiert. Die Sekretion in den beiden analysierten Probengruppen zeigt ein vergleichbares Muster. Von Tag 7 steigt der Wert auf ein Maximum an Tag 14 und sinkt auf Tag 21 wieder ab. Dabei verhalten sich die Zellen des Protokolls A und B bis auf die Probe des Tag 14B in der Gruppe „ohne Zusätze“ in allen Ansätzen gleich. Hier ist die Sekretion deutlich niedriger als an Tag 14A. Rosiglitazon verstärkt die ApoE-Sekretion nur an Tag 14A und Tag 14B,

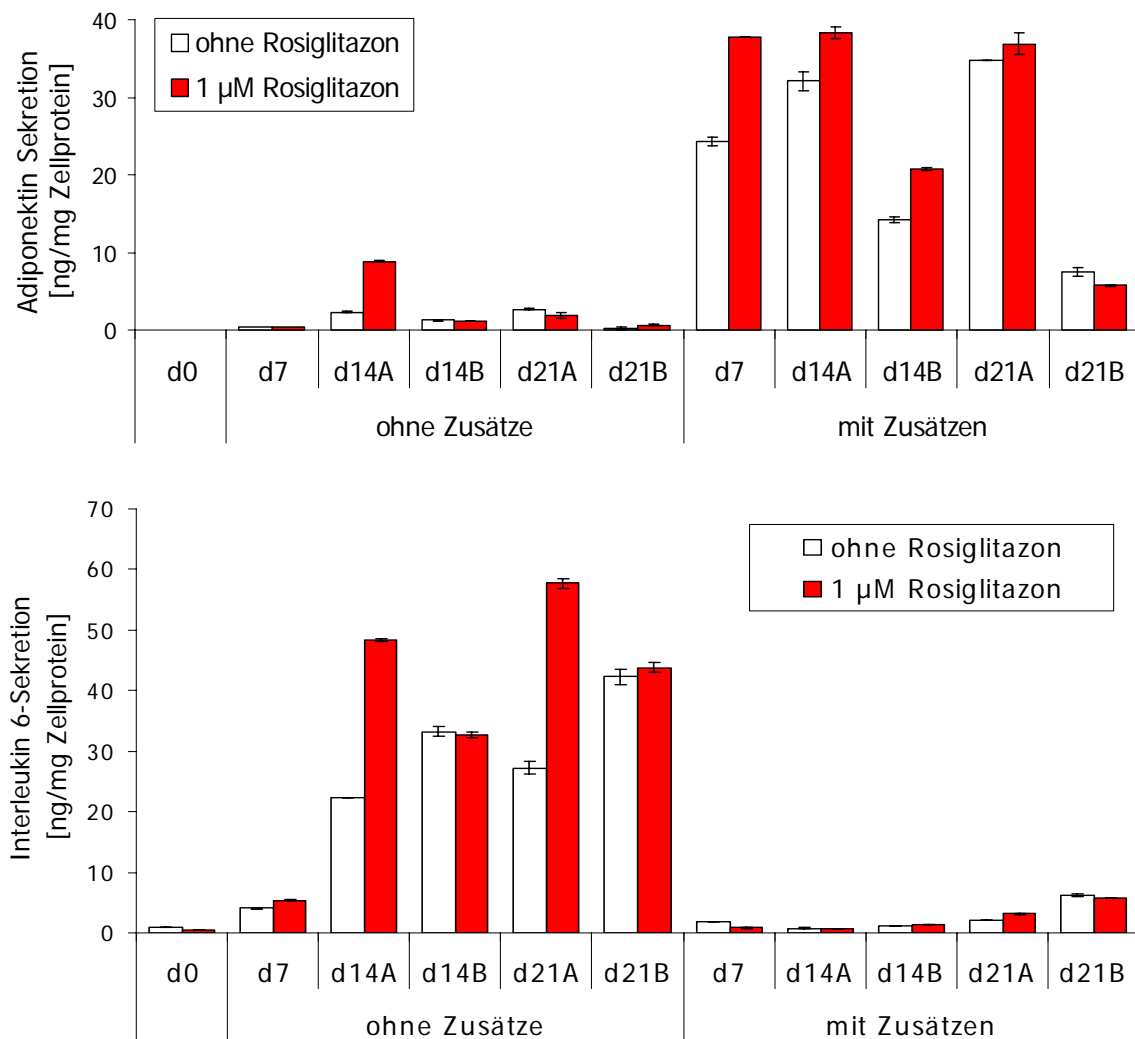
wenn die Zusätze vorher ausgewaschen wurden. In keinem der untersuchten Ansätze ist ein konsistenter Einfluss der Übernachtinkubation mit Rosiglitazon festzustellen.

Zu den klassischen Adipozytokinen, das heißt hormon- oder zytokinähnlichen Substanzen, die vom Fettgewebe ausgeschüttet werden, gehören u. a. Leptin, Adiponektin, Tumornekrose Faktor (TNF)  $\alpha$  und Interleukin (IL) 6. Leptin konnte im Überstand der hMSC-Tert Zellen zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Detektion von TNF $\alpha$  war nicht möglich, weder unter Standardkulturbedingungen noch bei Belastung der Zellen mit oxidierten Lipoproteinen (Daten nicht gezeigt). Um der Ursache für diese Resultate auf den Grund zu gehen, müssen Expressionsdaten auf mRNA- und Proteinebene erhoben werden. Die Sekretion von Adiponektin und IL6 wurde im gleichen Versuchsaufbau wie die ApoE-Sekretion gemessen, außer dass Standardmedium statt Hungermedium verwendet wurde.

Die in Abbildung 14b A dargestellten Daten der Adiponektin-Sekretion zeigen einen drastischen Unterschied für die Sekretion in den beiden Proben Gruppen „ohne Zusätze“ und „mit Zusätzen“. Der Entzug der Differenzierungszusätze für zwei Tage vor der Versuchsdurchführung drückt die Adiponektin-Sekretion in allen Proben ca. um das 14fache, was auf einen starken Einfluss einer der Zusätze oder einer Kombination der Zusätze auf die Adiponektin-Expression bzw. -Sekretion hinweist. Der Zusatz von Rosiglitazon über Nacht zeigt kein eindeutiges Ergebnis, tendenziell ist eine ansteigende Sekretion zu erkennen. Werden nur die Werte der Proben betrachtet, die über Nacht ohne Rosiglitazon inkubiert wurden, ergibt sich ein Anstieg der Sekretion von Tag 7 über Tag 14A (1,3fach) und Tag 21A (1,4fach). Die Zellen des Protokolls B verhalten sich dazu entgegengesetzt. Die Sekretion sinkt über Tag 14B (1,7fach) und Tag 21B (3,3fach) ab. Da sich das Protokoll B vom Protokoll A nur durch den Entzug von Rosiglitazon ab Tag 12 der Differenzierung unterscheidet, weist dieser gegenläufige Effekt in den Proben A und B auf eine aktivierende Wirkung des Rosiglitazons auf die Proteinexpression von Adiponektin hin. Je länger das Rosiglitazon entzogen wird, desto geringer ist die Adiponektin-Sekretion (Tag 21B < Tag 14B).

In Abbildung 14b B ist die Sekretion von IL6 abgebildet. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben Gruppen „ohne Zusätze“ und „mit Zusätzen“ zu erkennen. Allerdings verhält sich die IL6-Sekretion genau entgegengesetzt zur Adiponektin-Sekretion. Hier zeigt die Gruppe „ohne Zusätze“ eine massiv erhöhte und die „mit Zusätzen“ eine sehr geringe Sekretion. Für IL6 ist kein konsistenter Effekt einer Übernacht-Inkubation mit Rosiglitazon zu erkennen. Nur die Proben Tag 14A und Tag 21A der Proben Gruppe „ohne Zusätze“ zeigen unter dieser Bedingung eine starke Erhöhung der IL6-Konzentration. In der Gruppe „ohne Zusätze“ steigt die IL6-Konzentration über den Verlauf der Differenzierung kontinuierlich an: auf Tag 7 4,4fach, auf Tag 14A 24,3fach, auf Tag 21A 29,7fach. Die IL6-Konzentration ist dabei in den Proben des Protokolls B sowohl an Tag 14 wie auch an Tag 21 1,5fach höher als in denen des

Protokolls A. Im Falle von IL6 hat Rosiglitazon also eine inhibierende Wirkung auf die IL6-Sekretion bzw. -Expression. In den Proben der Gruppe „mit Zusätzen“ ist ebenfalls ein Anstieg der IL6-Sekretion zu beobachten (auf Tag 21A 2,3fach). Auch hier zeigen die Zellen des Protokolls B etwas höhere Werte.



#### Abbildung 14b: Sekretion von Adipozytokinen in Anwesenheit von Rosiglitazon

Die Sekretion von Adiponektin und Interleukin 6 wurde in Proben bestimmt, die genau wie in Abbildung 14a beschrieben hergestellt wurden. Anstatt des serumfreien Mediums wurde hier Standardmedium verwendet (n=2).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hMSC-Tert Zellen in differenziertem Zustand sowohl Adiponektin als auch IL6 sekretieren. Dabei ist auf beide Proteine ein starker Einfluss der Differenzierungs-substanzen festzustellen. Werden den Zellen die Differenzierungs-substanzen für zwei Tage entzogen, ist die Sekretion von IL6 hoch und von Adiponektin niedrig. Bleiben die Zellen unter dem Einfluss der Differenzierungs-

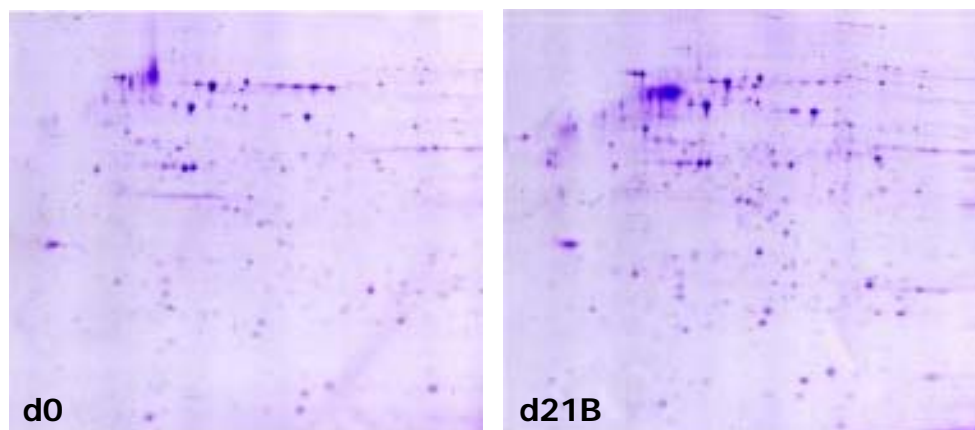


substanzen, ist die Sekretion von IL6 niedrig und von Adiponektin hoch. Rosiglitazon zeigt beim Vergleich der Zellen des Protokolls A und B einen stimulierenden Einfluss auf die Sekretion von Adiponektin und einen inhibierenden auf die von IL6. Um den Einfluss von Rosiglitazon auf diese beiden Adipozytokine genau herauszuarbeiten und eine mögliche Einflussnahme der beiden Sekretionsproteine aufeinander festzustellen, müssen umfassende weitere Studien durchgeführt werden, die auch Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene einschließen.

### 3.4 Proteomanalyse

Zur Charakterisierung des entwickelten Adipozytenmodells ist in dieser Arbeit eine Vielzahl von Einzelaspekten des Systems unter Verwendung sehr spezifischer Methoden beleuchtet worden. Dabei hat sich bestätigt, dass aus dem komplexen Verhalten der Zellen bei der Simulation physiologischer Stoffwechselsituationen immer nur ein Ausschnitt betrachtet werden kann. Um globalere Fragestellungen untersuchen zu können, wurde die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit anschließender Verarbeitung der getrennten Proteine und deren Identifizierung im Massenspektrometer etabliert.

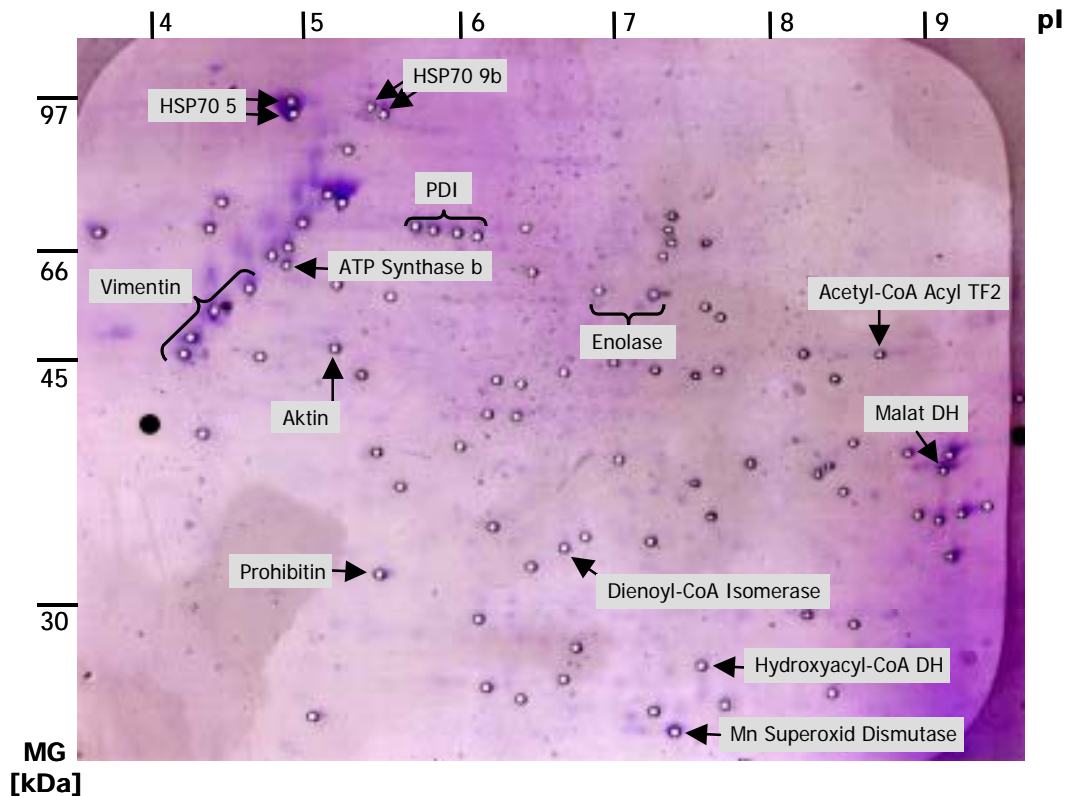
Die Abbildung 15a vergleicht Bilder von zweidimensionalen Gelen undifferenzierter (d0) und differenzierter (d21B) hMSC-Tert Zellen. Bei Ladung gleicher Proteinmengen entsteht ein fast identisches Bild des Gesamtzellproteoms.



**Abbildung 15a: 2D-Gelelektrophorese undifferenzierter und differenzierter hMSC-Tert Zellen**

Gesamtzelllysat undifferenzierter (d0) und differenzierter (d21B) hMSC-Tert Zellen wurde im pH-Gradienten von pH 4-7 isoelektrisch fokussiert und im 10%igen Acrylamidgel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt.

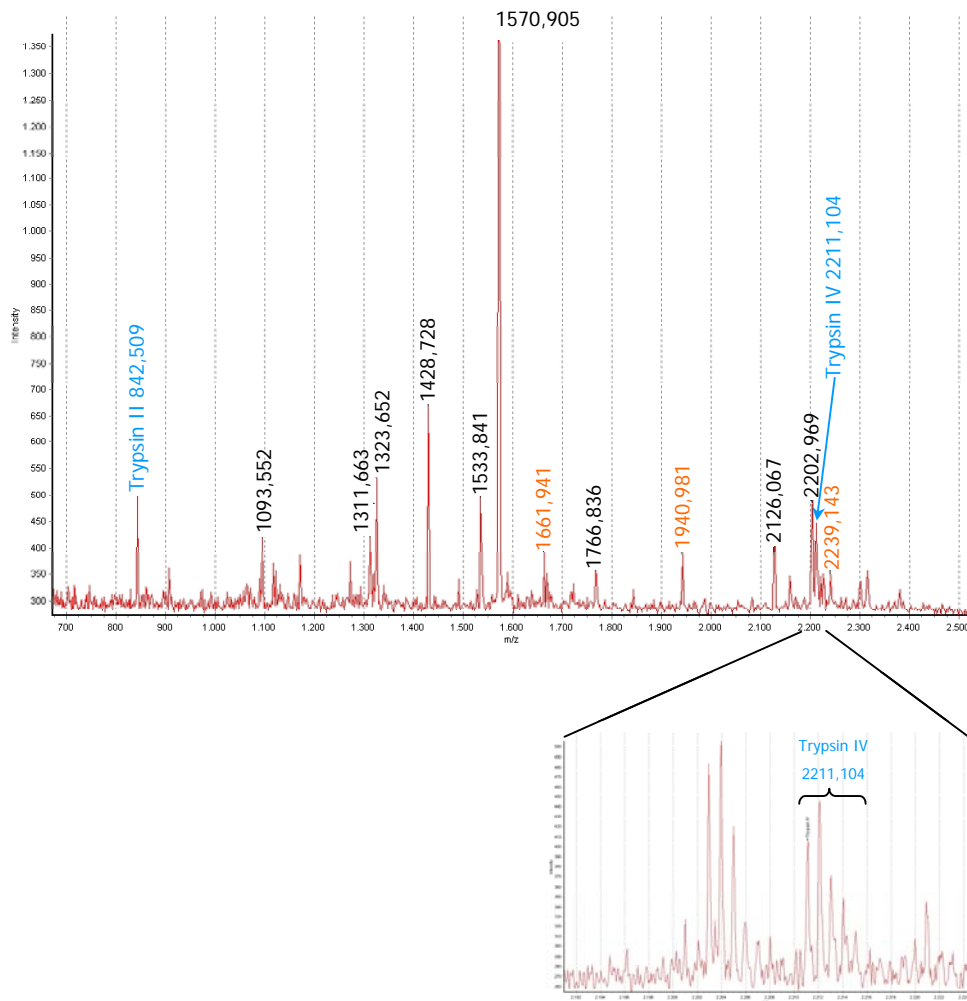
Abbildung 15b zeigt exemplarisch ein weiterverarbeitetes Gel mit einer Auswahl von Proteinpunkten, die mittels eines im MALDI-ToF generierten Peptid-Fingerabdrucks identifiziert wurden. In der Tabelle 1 des Anhangs findet sich eine genaue Auflistung ihrer Eigenschaften.



#### Abbildung 15b: Gelpunktanalyse eines Coomassie-gefärbten 2D-Gels

Das Lysat undifferenzierter hMSC-Tert Zellen wurde im Bereich von pH 3-10 fokussiert. Nach der Größentrennung im Acrylamidgel erfolgte die Färbung der Proteine mit Coomassie. Eine Auswahl von Proteinpunkten wurde mithilfe des Spotpickers ausgestochen, das Protein im Digester tryptisch verdaut und im MALDI identifiziert. HSP=Heat Shock Protein, PDI=Protein-Disulfid-Isomerase, TF=Transferase, DH=Dehydrogenase, CoA=Coenzym A, Mn=Mangan

Als Beispiel eines im MALDI-Tof generierten Massenspektrums ist in Abbildung 15c der Peptidfingerabdruck von Vimentin dargestellt, wie er durch den Verdau mit Trypsin entsteht. Aufgetragen wird die Intensität des detektierten Signals gegen die Masse des Peptides in Relation zur Ladung.



### Abbildung 15c: Beispiel für einen Peptidfingerabdruck

Im MALDI-ToF wurde das Massenspektrum einer tryptisch-verdauten Probe aufgenommen. Dabei wird die Intensität des Signals im Detektor gegen das Verhältnis aus Masse/Ladung ( $m/z$ ) der Peptide aufgetragen. Da im MALDI einfach geladenen Ionen produziert werden, entspricht die  $m/z$  der Masse der Peptide. Hier dargestellt ist das Spektrum von Vimentin. Die schwarz geschriebenen Massen sind die für die Identifizierung des Proteins verwendeten Peptide, die orange geschriebenen wurden nicht für die Identifizierung verwendet, die blau geschriebenen Massen sind die zur Kalibrierung der Messung verwendeten autolytischen Trypsinfragmente. Im kleinen Diagramm genauer aufgezoomt ist das typische Muster eines Peaks, hier für das Trypsinfragment IV.

Zusammenfassend konnten mit vergleichenden Coomassie-Färbungen keine differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden. Da zwischen dem undifferenzierten und differenzierten Zustand der Zellen Proteine unterschiedlich exprimiert werden (siehe Punkt 3.2.2), soll in Zukunft eine sensitivere differentielle Methode, z. B. 2D-DIGE (Differential In Gel Electrophoresis), benutzt werden, um Gesamtzelllysate, Fraktionen oder phosphorylierte Proben aus verschiedenen metabolischen Zuständen der ausdifferenzierten Adipozyten zu vergleichen und gegebenenfalls relevante Signalproteine und Stoffwechselwege zu identifizieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Adipozytäre Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Protokoll für die adipozytäre Differenzierung mesenchymaler Stammzellen etabliert werden. Durch Färbung der Neutralfette wurde eine Differenzierungseffizienz von 60-90% bestimmt (Abb. 7b und Anhang Abb. 3). Dieser Wert war für die insgesamt fünfzig durchgeführten Differenzierungen stabil. Im Vergleich zum hMSC-Tert Modell differenziert die humane Liposarcoma-Zelllinie LiSa-2 serumfrei unter Zusatz eines Hormoncocktails innerhalb von 20 Tagen mit 70% Effizienz zu adipozytären Zellen mit multiplen kleinen Vakuolen [Wabitsch et al. 2000]. In LS14 Liposarcomazellen humanen Ursprungs wird nach 10 Tagen Differenzierung eine Effizienz von 50-70% erreicht, allerdings nur unter Zusatz von Fettsäuren und Triglyzeriden [Hugo et al 2006]. Die humanen präadipozytären SGBS-Zellen differenzieren unter Bedingungen, die dem hier entwickelten Protokoll vergleichbar sind. In der 50. Generation wird eine Effizienz von 78% erzielt, die mit steigendem Alter der Zelllinie sinkt [Wabitsch et al. 2001]. Im Vergleich zu den zitierten Zellsystemen liegt die im hMSC-Tert Zellmodell beobachtete Effizienz etwas höher. Dies ist vermutlich auf die Zugabe des MEK-Inhibitors U0126 zu erklären, der die Proliferation der Stammzellen hemmt und somit die Differenzierung induziert (Anhang Abb. 1, genauere Diskussion s. u.) [Favata et al. 1998]. Neben dem Anteil ausdifferenzierter Adipozyten existiert eine heterogene Population, die Zellen in jedem Stadium der Differenzierung enthält sowie einen Anteil undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen. Diese Heterogenität ist in jeder durchgeführten Differenzierung etwas unterschiedlich, was leichte Varianzen in bestimmten Messwerten erklärt, z. B. im Triglyzeridgehalt der Zellen (Tab. 6). Diese Abweichungen haben bei keiner der durchgeführten Charakterisierungen das Maß der natürlichen biologischen Varianz überstiegen.

Die Morphologie der Zellen entspricht im terminal differenzierten Stadium der eines primären humanen Adipozyten. Die Zellen weisen eine große Lipidvakuole und ein kleines Kern/Zytoplasma-Verhältnis auf (Abb. 8a und Abb. 8b). Dieser Phänotyp ist deswegen besonders hervorzuheben, weil gerade die für humane Adipozyten verfügbaren Zellmodelle großteils multilokuläre Fettzellen generieren. Das entspricht nicht dem phänotypischen Stadium einer voll ausgereiften Fettzelle, sondern dem eines Präadipozyten [Ailhaud und Hauner 1998]. Bezüglich der Morphologie stellen die hMSC-Tert Zellen nach 14 Tagen Induktion einen Präadipozyten dar, während nach 21 Tagen ein terminal differenzierter Adipozyt vorliegt (Abb. 8a).

Das hier etablierte Differenzierungsprotokoll wurde auf der Grundlage des aktuellen Wissensstandes entwickelt. Entsprechend in der Literatur beschriebener Protokolle für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen [Kelly und Gimble 1998, Nuttall et al. 1998,

Zuk et al. 2002, D'Ippolito et al. 2004, Tang et al. 2004] differenzieren die hMSC-Tert Zellen in Anwesenheit von Serum über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen unter fortlaufender Stimulation durch entsprechende Differenzierungszusätze. Die Verwendung von Glukokortikoiden, Isobuthylmethylxanthin (IBMX) und Insulin kann als Standardverfahren bezeichnet werden. Die prodifferenzierende Eigenschaft von Dexamethason wurde in primären humanen Präadipozytenkulturen gezeigt [Hauner et al. 1989]. In murinen 3T3-L1 Zellen wurde dargestellt, dass dieser Effekt über die Induktion von CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP)  $\delta$  vermittelt wird und dass weiterhin IBMX C/EBP $\beta$  aktiviert [Yeh et al. 1995]. Beide C/EBPs zusammen induzieren die Expression von Peroxisome Proliferator-activated Protein (PPAR)  $\gamma$  [Wu et al. 1996], dessen Transkript im hier entwickelten Modell der differenzierenden hMSC-Tert Zellen nach einer Woche nachgewiesen werden konnte (Abb. 9a). Hauner zeigte, dass sowohl IBMX als auch Dexamethason nur in Anwesenheit von Insulin adipogen wirken. In präadipozytären Systemen kann Insulin alleine die Differenzierung induzieren [Hauner 1990]. In hohen Konzentrationen, wie im hier verwendeten Protokoll, bindet es nicht nur an den Insulinrezeptor, sondern auch an den Insulin-like Growth Factor (IGF)-I Rezeptor. Ein Präadipozyt exprimiert weit mehr IGF-I Rezeptoren als Insulinrezeptoren. Dieses Verhältnis kehrt sich im ausdifferenzierten Adipozyten um, der etwa 25x mehr Insulin- als IGF-I Rezeptoren hat und auf physiologische Insulinkonzentrationen mit der Aktivierung lipogener Enzyme reagiert [Smith et al. 1988]. Beispiele dieser Induktion wurden im hMSC-Tert Modell etwa über die Expression der Fettsäuresynthetase (FAS) demonstriert (Abb. 10b). In 3T3-L1 Zellen führt die Bindung von Insulin an den IGF-I Rezeptor zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase (PI3K)/Akt (Proteinkinase B)-Signalweges. [Xu und Liao 2004]. Entingh-Pearsall und Kahn beschreiben in braunen Präadipozyten, dass sowohl der Insulin- als auch der IGF-I Rezeptor unterschiedliche Signale an gemeinsame intrazelluläre Signalwege weiterleiten [Entingh-Pearsall und Kahn 2004]. Neu im hier etablierten Differenzierungsprotokoll ist die Verwendung des MAPK-Kinase (MEK)-Inhibitors U0126, der stark prodifferenzierend wirkt. Dieser Effekt führte reproduzierbar zu einem Zellbild, das einen erhöhten Anteil an Zellen mit ausgeprägtem terminal differenziertem, monolokulärem Phänotyp aufwies (Anhang Abb. 1). Ob diese Wirkung direkt durch eine Stimulation der Differenzierung oder indirekt durch Inhibition des Wachstums vermittelt wird, ist im Einzelnen nicht untersucht worden. Der Einfluss des Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweges und damit auch dessen Inhibitoren auf die adipozytäre Differenzierung wird kontrovers diskutiert. Prusty et al. finden durch Aktivierung der MEK eine verstärkte Adipogenese in 3T3-L1 Zellen [Prusty et al. 2002]. Dagegen beschreiben Font de Mora et al., dass eine MAPK-Aktivierung der Adipogenese entgegen wirkt [Font de Mora et al. 1997]. Als direkter Mechanismus für die Inhibition ist eine MAPK-vermittelte Phosphorylierung von PPAR $\gamma$  vorgeschlagen worden [Hu et al. 1996]. In hMSC-Tert Zellen fanden Kratchmarova et al. eine Inhibition der osteoblastären

Differenzierung durch U0126 [Kratchmarova et al. 2005]. Dessen Effekt auf die adipogene Differenzierung wurde nicht getestet, aber viele Studien schlagen eine gegensätzliche Regulation der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und Adipozyten vor [Dang und Lowik 2004, Ichida et al. 2004, Hong et al. 2005, Übersicht von Gimble et al. 2006]. Da hier die Hemmung des MAPK-Signalweges durch U0126 eine prodifferenzierende Wirkung ausübt, wird im hMSC-Tert Zellmodell eine Inhibition der adipogenen Differenzierung durch den MAPK-Signalweg vermutet. Thiazolidindione werden in vielen Protokollen als PPAR $\gamma$ -Agonisten zur adipozytären Differenzierung von mesenchymalen und präadipozytären Zellsystemen eingesetzt [Kletzien et al. 1991, Gimble et al. 1996]. Das hier verwandte Rosiglitazon vermittelt die Induktion einer Vielzahl adipozytärer Marker wie Adipocyte Lipid Binding Protein (aP2) [Tontonoz et al. 1994a], Apolipoprotein (Apo) E [Yue et al. 2004], Glukosetransporter (GLUT) 4 [Armoni et al. 2003] und LDLR-related Protein (LRP) 1 [Gauthier et al. 2003], deren Expression im Verlauf der hMSC-Tert Differenzierung nachgewiesen werden konnte (Abb. 9a, Abb. 9b, Abb. 10b, Abb. 10c). Um zu vermeiden, dass Rosiglitazon durch seine starke lipogene Wirkung falschpositive Ergebnisse hervorruft, wurden bei der Charakterisierung des Zellmodells die Differenzierungsprotokolle A und B verglichen. Die Zellen des Protokolls B, die ab Tag 12 ohne den Zusatz von Rosiglitazon differenzieren, erzielten in allen Experimenten den Zellen des Protokolls A vergleichbare Ergebnisse. Hervorzuheben ist die fortlaufende Expression von direkten PPAR $\gamma$ -Targets, wie aP2 [Tontonoz et al. 1994a] oder ApoE [Yue et al. 2004] (Abb. 10b). Im Western Blot konnte auch in den Zellen des Protokolls B eine zunehmende Stärke der Expression mit Fortschreiten der Differenzierung detektiert werden (Abb. 10b). Wie die ausführlichen morphologischen Studien zeigen, ist der Phänotyp der Zellen beider Protokolle ebenfalls völlig vergleichbar (Abb. 7b).

Das entwickelte Differenzierungsprotokoll zeichnet sich somit dadurch aus, dass bei hoher Differenzierungseffizienz phänotypisch betrachtet nicht nur präadipozytäre Zellen, sondern auch reife Adipozyten generiert werden.

## 4.2 Analyse der adipozytären Expression

Auf mRNA- und Proteinebene wurde eine repräsentative Auswahl der insbesondere in murinen Zellsystemen beschriebenen adipozytären Marker untersucht. Dabei konnte das Ergebnis der morphologischen Untersuchungen, die Entstehung reifer Adipozyten durch die Anwendung des entwickelten Differenzierungsprotokolls, bestätigt werden. Von den neun mittels RT-PCR untersuchten Genen wurden zwei (Adipocyte Determination and Differentiation Factor (ADD) 1, Low Density Lipoprotein-Rezeptor (LDLR)) schon in undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen detektiert, die Expression aller anderen wurde innerhalb der ersten Differenzierungswoche induziert (Abb. 9a). Da der Fokus dieser Arbeit auf der Herstellung eines differenzierten Endpunktes lag und nicht in der Untersuchung des Differenzierungsablaufes, wurde die genaue zeitliche Staffelung der

Expression in den frühen Tagen der Differenzierung nicht weiter untersucht. In vielen Studien wird die Expression der adipozytären Markertranskripte innerhalb der ersten Tage einer Differenzierung als erfolgreiche Differenzierung gewertet. Dabei wird vernachlässigt, dass sich ein reifer Adipozyt insbesondere über den Phänotyp definiert. Nach wenigen Tagen wird jedoch das Auftreten Triglyzerid-gefüllter monolokulärer Lipidvakuolen bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen nicht gefunden und auch in präadipozytären Modellen innerhalb dieses Zeitfensters meist nicht zufriedenstellend vorgewiesen [z. B. Yeh et al. 1995, Gimble et al. 1996, Font de Mora et al. 1997, Kelly et al. 1998, Ichida et al. 2004]. Die auf Proteinebene untersuchten Marker waren im hier entwickelten Zellmodell nach einer oder spätestens zwei Wochen der Differenzierung nachzuweisen, wobei die Expression meistens im Verlauf der Differenzierung vom Präadipozyten zum Adipozyten noch merklich anstieg (Abb. 10b). Unter diesen Markern ist das Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) 1c (auch ADD1) in den hMSC-Tert Zellen nach einer Woche stabil exprimiert (Abb. 10b). SREBP1c wird als Vorläuferprotein mit einer Größe von 125 kDa synthetisiert und in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Zellnukleus verankert. Diese Form ist inaktiv. Bei Absinken der intrazellulären Sterolkonzentration wird das Protein in einem zweistufigen Prozess enzymatisch geschnitten. Dabei entsteht ein N-terminales 68 kDa großes aktives Fragment, das sogenannte nukleäre SREBP, das in den Zellkern wandert und dort die Transkription entsprechender Zielgene aktiviert [Wang et al. 1999]. Die aktive Form des SREBP1c wird sehr schnell abgebaut und ist deshalb auch nur als sehr schwache Bande zu erkennen (Abb. 10b). Dieser Transkriptionsfaktor ist vor allem für die Induktion von Genen der Fettsäurebiosynthese verantwortlich z. B. FAS [Tontonoz et al. 1993] oder Srearoyl-CoA Desaturase 1 und 2 [Tabor et al. 1999]. Die FAS-Expression wurde hier im Western Blot bereits nach einer Woche mit zunehmender Stärke nachgewiesen (Abb. 10b). Das entspricht der Beschreibung einer verstärkten FAS-Expression und einer erhöhten Enzymaktivität in 3T3-L1 Adipozyten [Student et al. 1980]. *In vivo* ist die Bedeutung der de novo Synthese von Fettsäuren aus Glukose verschwindend gering [Goldrick 1967]. Unter den hier *in vitro* angewandten Bedingungen – geringe Lipidzufuhr durch das Serum bei hoher Glukosekonzentration im Zellkulturmedium – trägt die FAS-Aktivität maßgeblich zur Akkumulation von Triglyzeriden in der Zelle bei. *In vitro* wird auch die Lipoproteinlipase (LPL) durch SREBP1c transkriptionell reguliert [Kim et al. 1996, Schoonjans et al. 2000]. *In vivo* wird LPL im postprandialen Stoffwechsel im Fettgewebe insulinvermittelt induziert [Übersicht von Mead et al. 2002], um aus Triglyzerid-reichen Lipoproteinen in der Blutbahn Fettsäuren freizusetzen, die in die Adipozyten aufgenommen werden. In diesem Zellmodell wurde eine starke LPL-Expression an Tag 7 und Tag 14 gemessen mit einer nachfolgenden Abschwächung an Tag 21 (Abb. 9a). In 3T3-L1 Zellen wurde ein vergleichbares Expressionsmuster mit einem Maximum und anschließendem Abfall im Verlauf der Differenzierung beschrieben [Zechner et al. 1991].

Vor dem Hintergrund der phänotypischen Entwicklung der hMSC-Tert Adipozyten ist dieses Expressionsmuster plausibel. Eine stark lipidgefüllte Zelle am Tag 21 der Differenzierung hat keinen nennenswerten Bedarf an der Zufuhr exogener Fettsäuren und benötigt damit auch keine LPL-Aktivität. Die Expression von PPAR $\gamma_2$  konnte auf mRNA-Ebene demonstriert werden (Abb. 9a). Auch nach dem Entzug von Rosiglitazon in den Zellen des Protokolls B konnte PPAR $\gamma_2$  nachgewiesen werden, was auf eine stabile Differenzierung hindeutet. Die Expression der direkt durch PPAR $\gamma_2$  regulierten Marker LPL [Lefebvre et al. 1997], ApoE [Yue et al. 2004], LRP1 [Gauthier et al. 2003], aP2 [Tontonoz et al. 1994a] und Perilipin A [Arimura et al. 2004] in diesem System weisen die Funktionalität des Transkriptionsfaktors nach (Abb. 9a, Abb. 10b, Abb. 10c). Für das fettzellspezifisch exprimierte aP2 ist eine starke Regulation während der Adipogenese beschrieben worden [Spiegelman et al. 1983, Hunt et al. 1986]. Seine Expression wird neben PPAR $\gamma$  auch durch Fettsäuren induziert [Amri et al. 1991]. Neben der Funktion als lipidbindendes Protein im Zytoplasma, aktiviert aP2 die HSL [Shen et al. 2001, Coe et al. 1999] und fördert so die Lipolyse. In adipösen Probanden ist die aP2-Expression erhöht [Fisher et al. 2001]. Ein bestimmter Polymorphismus im Bereich des humanen aP2-Promotors korreliert mit reduzierter aP2-Expression und verringertem Risiko für die Entstehung von koronarer Herzkrankheit und Diabetes Typ II [Tuncman et al. 2006]. In Mäusen konnte aP2 ebenfalls als Verbindungsglied zwischen Adipositas und Insulinresistenz ermittelt werden [Hotamisligil et al. 1996, Scheja et al. 1999, Uysal et al. 2000]. Das Protein scheint also an der Entstehung von Erkrankungen des Stoffwechsels beteiligt zu sein. Neben PPAR $\gamma$  und aP2 konnte als ein weiteres adipozytenspezifisches Protein im hier entwickelten Zellmodell Perilipin A nachgewiesen werden. Perilipin B wurde erwartungsgemäß nicht gefunden [Kern et al. 2004]. Als Teil des Proteinkomplexes, der die Lipid Droplets umgibt, nimmt das Perilipin A wichtige regulatorische Funktionen in der Lipidspeicherung wahr [Brasaemle et al. 2000]. Wie aP2 ist seine Expression im humanen Fettgewebe bei Adipositas erhöht [Kern et al. 2004]. Außerdem ist es ebenfalls an der Pathogenese Übergewichts-induzierter Insulinresistenz beteiligt [Martinez-Botas et al. 2000]. Die in diesem Zellsystem stark nachweisbare Expression von Caveolin 1 ist ein weiteres Charakteristikum des Fettgewebes (Abb. 10b). Hier wird es nachweislich stärker exprimiert als in anderen Geweben und der Anstieg seiner Expression wurde während der Adipogenese von 3T3-L1 Zellen demonstriert [Scherer et al. 1994]. Die hohe Caveolin 1-Expression korreliert mit einer hohen Anzahl von Caveolae im Fettgewebe, die so die Zelloberfläche bis zu 50% vergrößern [Thorn et al. 2003]. Auch die Anzahl der Caveolae nimmt während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu [Fan et al. 1983]. Caveolin 1 hat wahrscheinlich neben der Funktion in der Plasmamembran noch andere Aufgaben. Unter bestimmten Bedingungen ist eine Translokation von Caveolin 1 auf die Oberfläche der intrazellulären Lipid Droplets nachweisbar [Ostermeyer et al. 2001, Pol et al. 2005,



Brasaemle et al. 2004], was eine Rolle beim Transport von Lipiden ins Zellinnere bzw. bei der Anlegung oder der Mobilisierung der Lipidspeicher vermuten lässt.

Die umfassende Expressionsanalyse der differenzierenden hMSC-Tert Zellen hat die Anwesenheit eines breiten Spektrums adipozytärer Marker gezeigt, die an einer Vielfalt von Funktionen der reifen Fettzelle beteiligt sind. Bezeichnend ist die Detektion von Markern wie aP2, Perilipin A (Abb. 10b) und PPAR $\gamma_2$  (Abb. 9a), die ausschließlich im Adipozyten exprimiert werden. Dies erbringt den biochemischen Nachweis der erfolgreichen Differenzierung von hMSC-Tert Zellen zu reifen Adipozyten. Zur Identifizierung weiterer potentieller adipozytenspezifischer Proteine wurde das Proteom undifferenzierter und differenzierter hMSC-Tert Zellen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Dabei konnte die reproduzierbare Erstellung zweidimensionaler Gelbilder dieses Zellsystems (Abb. 15a) sowie die Weiterverarbeitung und Identifizierung der Proteinpunkte (Abb. 15b, Abb. 15c) etabliert werden. Die Identifizierung einer Auswahl von Coomassie-angefärbten Proteinpunkten mittels Massenspektrometrie ließ eine Reihe von Enzymen des Energie- und Intermediärstoffwechsels erkennen (Abb. 15b, Anhang Tabelle 1). Außerdem wurde mit Vimentin ein Protein detektiert, das als gerüstbildendes Filament an den Lipid Droplets lokalisiert ist [Franke et al. 1987]. Die Detektion von zellulären Proteinen ist mit dieser Methode also auch aus lipidreichen Adipozyten möglich. Allerdings konnten mittels der Coomassie-Färbung noch keine differentiellen Unterschiede zwischen den Zuständen ermittelt werden (Abb. 15a). Um dies zu erreichen, sollen in Zukunft andere Methoden wie die fluoreszenzbasierte 2D-DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) Färbung ausgebaut und die Auftrennung subzellulärer Fraktionen im 2D-System durchgeführt werden.

### 4.3 Funktionalität des humanen Adipozytensystems

Die funktionale Charakterisierung des Zellmodells wurde zunächst mit der Untersuchung der Insulinsensitivität begonnen. Dafür wurden Signalproteine betrachtet, die innerhalb der in Folge eines Insulinreizes angeschalteten Signalwege liegen (Abb. 5, S. 35). Die insulinvermittelte Aktivierung der Akt-Kinase, die unterhalb der PI3K liegt, konnte in differenzierten hMSC-Tert Adipozyten des Protokolls A und B gezeigt werden (Abb. 11a). Die PI3K/Akt-Signalkaskade ist der Hauptweg, über den Insulin postprandial seine den Stoffwechsel betreffende Wirkung auf zellulärer Ebene vermittelt [Übersicht von Saltiel und Kahn 2001]. Die Aktivierung von Akt konnte reproduzierbar über den gesamten Verlauf der Differenzierung detektiert werden mit dem stärksten Effekt in den Proben des Tag 21 (Abb. 11b). Die Fortsetzung der Akt-Aktivierung durch Phosphorylierung des nachgeschalteten S6 Ribosomal Protein, welches über die Kontrolle der Proteinsyntheserate an der Regulation des Zellwachstums beteiligt ist [Shigemitsu et al. 1999], konnte vor allem in 3T3-L1 Adipozyten, in hMSC-Tert Zellen nicht im gleichen Maße gefunden werden (Abb. 11a). Hier liegt das S6 unabhängig von der Insulingabe in

aktivierter Form vor. Das S6 ist direktes Substrat der p70 S6 Ribosomal Protein Kinase (p70S6K). Dieses Enzym funktioniert als negativer Regulator der Insulinwirkung, indem es durch Serinphosphorylierungen des Insulinrezeptor Substrates (IRS) 1 dessen Aktivierung hemmt [Um et al. 2004]. Mäuse mit einem Defekt im Gen von p70S6K sind aufgrund erhöhter  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren gegen Diät-induzierte Adipositas geschützt [Um et al. 2004]. Dagegen ist in Mausmodellen für Adipositas, wie der ob/ob und der K/KAy Maus, die Aktivität von p70S6K erhöht [Um et al. 2004]. Um die Ursache für die basale S6-Aktivierung in diesem Zellmodell zu erklären (Abb. 11a, Abb. 11b), müssen weitere Signalproteine wie die Kinase Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) und die p70S6K untersucht werden, die sich in der Kaskade zwischen Akt und S6 befinden. mTOR wird insulinvermittelt über Akt aktiviert und phosphoryliert nachfolgend die p70S6K [Navé et al. 1999, Übersicht von Thomas und Hall 1997], welche auch unter Umgehung von Akt über die PI3K, die Phosphatidylinositol-abhängige Kinase (PK) 1 [Alessi et al. 1997, Pullen et al. 1998] und die Proteinkinase C (PKC)  $\zeta$  [Romanelli et al. 1999] aktiviert werden kann. Der mTOR-Inhibitor Rapamycin blockiert in 3T3-L1 Adipozyten die insulinvermittelte Aktivierung der p70S6K vollständig [Fingar et al. 1993]. Die Verwendung von Rapamycin in hMSC-Tert Adipozyten könnte Aufschluss über eine Transaktivierung von p70S6K und damit S6 durch Akt-unabhängige Signalwege, z. B. durch PDK1 oder den MEK/MAPK-Signalweg [Mukhopadhyay et al. 1992, Wang et al. 2001], geben. Um auszuschließen, dass die offensichtliche Aktivierung von p70S6K Einfluss auf die Insulinsensitivität der Zelle nimmt, sollte der Phosphorylierungsstatus (Verhältnis von Serin- zu Tyrosinphosphorylierungen) des Insulinrezeptors und IRS1 analysiert werden. Allerdings ist eine Insulindesensitivierung des Systems unwahrscheinlich, da die intakte Phosphorylierung von Akt in Antwort auf einen Insulinreiz gezeigt werden konnte (Abb. 11a - 11c). Weiterhin ist im hier entwickelten Zellsystem unklar, in welchem Signalweg die offensichtliche Aktivierung durch Insulin mündet und wo eine dementsprechende Weiterführung des Signals zu detektieren ist. Dafür müssen weitere Signalwege wie die mTOR-Kaskade [Sarbasov et al. 2005], Glykogensynthase Kinase (GSK) 3 [Sutherland et al. 1993, Shepherd et al. 1995, Cross et al. 1995] oder der MEK/MAPK-Weg [Übersicht von Saltiel und Kahn 2001], die von Insulin beeinflusst werden können, untersucht werden.

Auch die p42/p44MAPK, die den mitogenen Effekt von Insulin vermitteln [Übersicht von Pirola et al. 2004], sind unabhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle und dem einwirkenden Insulinreiz aktiviert (Abb. 11a). Dieses Ergebnis zeigt das erfolgreiche Auswaschen des MEK-Inhibitors U0126 aus den Zellen, welches vor jedem Versuch über zwei Tage durchgeführt wurde. Würde die Hemmung der MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 noch bestehen, wäre keine Phosphorylierung ihrer Substrate detektierbar. Die konstitutive Aktivierung bestimmter Signalproteine *in vitro* stellt möglicherweise ein Artefakt der Zellkultur dar und somit eine Abweichung von der Situation *in vivo*. Bezüglich der

Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges erfüllen die hMSC-Tert Adipozyten den Anspruch an ein Adipozytenmodell. Die Insulinsensitivität des Modells wurde mit diesen Experimenten eindeutig belegt.

Die Gegenüberstellung von Zellen des Protokolls A und B ergab keine Unterschiede in der Fähigkeit, Akt nach Insulinreiz zu phosphorylieren (Abb. 11c). Allerdings wurde bei diesem Vergleich wiederholt die zunehmende Stärke der Signalantwort von Tag 14 auf Tag 21 deutlich. Gleichzeitig wurde eine Zunahme des Insulinrezeptorproteins mit Fortschreiten der Differenzierung gezeigt (Abb. 11c). Das entspricht den Angaben der Literatur, die eine massive Zunahme des Insulinrezeptors bei der Entwicklung eines Präadipozyten zum Adipozyten beschreiben [Smith et al. 1988]. Dieses Verhalten veranschaulicht, dass die Differenzierung zwischen Tag 14 und Tag 21 noch weiter voranschreitet. Weiterhin wurde eine Abnahme des IRS1-Proteins bei unverändertem IRS2-Protein gefunden (Abb. 11c). Diese beiden Proteine sind an der intrazellulären Weiterleitung des Insulinsignals beteiligt, z. B. über eine Aktivierung der PI3K [Übersicht von Thirone et al. 2006]. Die Regulation von IRS1 während der adipozytären Differenzierung ist nicht bekannt. Fasshauer et al. stellten die Notwendigkeit von IRS1 für die vollständige Differenzierung brauner Adipozyten fest [Fasshauer et al. 2001]. In weißen Adipozyten wurde eine vorübergehend verstärkte Bindung des IRS1 und des IRS2 an die PI3K beschrieben, die ebenfalls für die Differenzierung erforderlich ist [Sakaue et al. 1998]. Eine Abnahme des IRS1-Proteins ist lediglich bei Insulinresistenz beschrieben. So ist IRS1 in Adipozyten von Patienten mit Diabetes Typ II sehr stark reprimiert mit der Folge, dass IRS2 die Bindung der PI3K übernimmt [Rondinone et al. 1997]. Für diese Aktivierung sind allerdings viel höhere Insulinkonzentrationen notwendig. *In vitro* bewirkt die ausgedehnte Gabe höherer Insulinkonzentrationen ebenfalls eine Abnahme des IRS1-Proteins [Danielsson et al. 2006]. Diese wird durch eine verstärkte proteasomale Degradation hervorgerufen, ausgelöst durch eine erhöhte Phosphorylierung am Serin 312 des IRS1 [Rice et al. 1993, Sun et al. 1999]. Ein solcher Zustand der Insulinresistenz ist jedoch durch eine abgeschwächte Phosphorylierung der Akt in Antwort auf Insulin gekennzeichnet. Da hier eine Verstärkung dieser Sensitivität gemessen wurde, muss die Abnahme des IRS1-Proteins in diesem Fall andere Gründe haben.

Eine physiologisch wichtige Funktion des Fettgewebes im postprandialen Stoffwechsel ist die insulinvermittelte Aufnahme von Glukose über GLUT4. Im Zuge der Expressionsmessungen wurden die Transkripte der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 quantitativ vermessen. Dabei stieg die Menge der GLUT1-mRNA über den Verlauf der Differenzierung stetig an, während die Entwicklung des GLUT4 einen maximalen Wert an Tag 14 und einen drastischen Abfall auf Tag 21 aufwies (Abb. 9b). Dieses Ergebnis ließ für die funktionale Untersuchung der Glukoseaufnahme einen Anstieg der insulinunabhängigen Aufnahme mit Fortschreiten der Differenzierung neben einem Maximum der insulinabhängigen Aufnahme an Tag 14 vermuten. Allerdings muss bei der Interpretation der

mRNA-Daten beachtet werden, dass diese keine Auskunft über das Verhältnis der Expressionshöhen von GLUT1 und GLUT4 zueinander geben. Außerdem muss die Expression des Proteins aufgrund posttranskriptioneller oder posttranslationaler Regulationen nicht der mRNA-Expression entsprechen. Bei der Messung der Glukoseaufnahme konnte weder für undifferenzierte noch für differenzierte hMSC-Tert Zellen eine Insulinabhängigkeit des Prozesses festgestellt werden (Abb. 12b). Dies wurde in verschiedenen Zeitfenstern und für unterschiedliche Insulinkonzentrationen beobachtet. 3T3-L1 Adipozyten wiesen im Gegensatz dazu eine 5fache Steigerung der Glukoseaufnahme auf (Abb. 12a). Humane Zellsysteme zeigen in der Regel eine Steigerung der Glukoseaufnahme in Abhängigkeit von Insulin. Diese liegt allerdings deutlich unter der im allgemeinen in 3T3-L1 Adipozyten gemessenen Zunahme und wird schon bei geringeren Insulinkonzentrationen detektiert. Hauner et al. messen etwa eine 2-4fache Steigerung der Glukoseaufnahme in *in vitro* ausdifferenzierten primären humanen Präadipozyten [Hauner et al. 1998]. Isolierte primäre humane Adipozyten weisen einen insulinvermittelten Anstieg der Glukoseaufnahme in vergleichbarer Größenordnung auf, der schon bei Insulinkonzentrationen von 0,1 nM bis 10 nM erreicht wird [Lundgren et al. 2004, Westergren et al. 2005]. In hMSC-Tert Adipozyten wurde die Glukoseaufnahme nach Literaturangaben bei 50 nM gemessen. Die Aufnahme war an Tag 14 maximal, höher als an Tag 21 der Differenzierung und deutlich über der in undifferenzierten hMSC-Tert Zellen (Abb. 12b). Aufgrund des im begrenzten Maße weiter proliferierenden undifferenzierten Zellhintergrundes sind an Tag 14 der Differenzierung mehr Zellen vorhanden als an Tag 0. Die Aufnahme muss hier folglich erhöht sein. Da aber der Wert für Tag 21 unter dem für Tag 14 liegt, kann die Anzahl der vorhandenen Zellen den Umfang des Anstiegs über den Verlauf der Differenzierung nicht vollständig erklären. Das Expressionsmuster von GLUT1 und GLUT4 ist also als Ursache des Ergebnisses in Betracht zu ziehen. Die Expression des insulinabhängigen GLUT4 liegt auf Proteinebene wahrscheinlich so massiv unter der GLUT1-Expression, dass in diesem Zellsystem kein Insulineffekt auf die Glukoseaufnahme messbar ist.

Die Glukoseaufnahme konnte in undifferenzierten fast vollständig und terminal differenzierten hMSC-Tert Zellen sehr stark durch Cytochalasin B gehemmt werden. Dieser Pilzmetabolit hemmt spezifisch die rezeptorvermittelte Aufnahme von Glukose über die direkte Bindung an die Transporter GLUT1 und GLUT4 [Kletzien et al. 1972, Axelrod und Pilch 1983, Hellwig und Joost 1991]. Folglich findet die Glukoseaufnahme in undifferenzierten Zellen über Glukosetransporter statt. An Tag 21 ist der Anteil der nicht transportervermittelten Glukoseaufnahme an der Gesamtaufnahme etwas größer als an Tag 0. Cytochalasin D dagegen bewirkte eine Reduktion der Aufnahme ca. um ein Drittel undifferenzierten und gar keine Inhibition in differenzierten hMSC-Tert Zellen. Cytochalasin D wirkt bei sehr geringer Affinität zu den Glukosetransportern sehr stark auf das Aktinskelett der Zelle, indem es dessen durch Insulin ausgelöste Verdichtung

rückgängig macht. Das verhindert die Translokation von GLUT4 und GLUT1 in die Plasmamembran und hemmt so die insulinvermittelte Glukoseaufnahme [Tsakiridis et al. 1994]. Das Muster dieses Inhibitionsexperimentes lässt also darauf schließen, dass die Glukoseaufnahme in hMSC-Tert Zellen fast ausschließlich transportervermittelt geschieht (Cytochalasin B hemmbar ist), aber nur zu einem Bruchteil bzw. in ausdifferenzierten Adipozyten gar nicht mehr insulinstimuliert (Cytochalasin D hemmbar).

Eine weitere Ursache für den fehlenden Insulineffekt könnte die basale MAPK-Aktivierung in den hMSC-Tert Zellen sein (Abb. 11a, Abb. 11b). In 3T3-L1 Adipozyten ist eine erhöhte insulinunabhängige Glukoseaufnahme durch eine exogene MEK-Aktivierung und damit der MAPK beschrieben worden [Bosch et al. 2004]. Der Anstieg des basalen Glukosetransportes ist dabei auf eine Zunahme der GLUT1-Expression und eine erhöhte Translokation des Transporters in die Plasmamembran zurückzuführen. Eine andere Studie zeigt über die konstitutive Aktivierung der MEK in 3T3-L1 Zellen ein vergleichbares Ergebnis. Dort geht eine verstärkte Expression von GLUT1 mit einer gesteigerten Präsentation von sowohl GLUT4 als auch GLUT1 in der Plasmamembran einher. Das führt insgesamt zu einer reduzierten Insulinabhängigkeit der Glukoseaufnahme [Yamamoto et al. 2000]. Vor diesem Hintergrund könnte in den hMSC-Tert Zellen die basale MAPK-Aktivierung in einer erhöhten Expression und vermehrten Präsentation des GLUT1 in der Plasmamembran resultieren. Die in der Folge ansteigende basale Glukoseaufnahme überdeckt dann den insulinabhängigen, GLUT4-vermittelten Prozess. Um diese Vermutung zu überprüfen, muss die Glukoseaufnahme bei akuter Hemmung der MAPK betrachtet werden. Weiterhin sollte die Proteinexpression der beiden Glukosetransporter genau analysiert und ihre exakte intrazelluläre Lokalisation bestimmt werden.

In vielen Veröffentlichungen wird die Verschiebung des Verhältnisses von GLUT1 zu GLUT4 mit einer nachfolgend abnehmenden insulinvermittelten Glukoseaufnahme als Zeichen der Insulinresistenz gewertet [Kozka et al. 1991, Tebbey et al. 1994, Stephens et al. 1997]. Im hMSC-Tert System ist jedoch zu allen Zeitpunkten der Differenzierung eine insulinvermittelte Akt-Aktivierung zu messen (Abb. 11b), was den vollständig insulinresistenten Zustand in diesem Modell ausschließt. Möglicherweise wird das Insulinsignal in den für die GLUT4-Translokation verantwortlichen Signalwegen nicht weitergeleitet. Die insulinvermittelte Translokation des GLUT4 wird über den PI3K-Weg vermittelt, in dessen Folge PDK1 und 2 aktiviert werden, die das Signal entweder über die atypischen PKC Isoformen  $\lambda$  und  $\zeta$  weiterleiten oder über Akt und sein Substrat AS160. Im Adipozyten ist weiterhin ein PI3K-unabhängiger Weg über die Rekrutierung von Cbl/CAP und das G-Protein TC10 möglich [siehe Überblick von Ishiki und Klip 2005]. Die genaue Charakterisierung dieser potentiellen Signalwege wäre notwendig, um die nicht insulinabhängige Glukoseaufnahme im hMSC-Tert Zellsystem zu erklären.

Die Regulation der in der Plasmamembran präsenten Anzahl an GLUT4-Transportern wird nicht nur auf der Ebene der Auslösung der Translokation diskutiert. Martin et al.

postulieren als regulatorisches Kernelement die Retention von GLUT4 in intrazellulären Kompartimenten unter basalen Bedingungen. Diese Retention wird als dynamisches Gleichgewicht zwischen langsamer Exozytose und schneller Internalisierung des GLUT4 verstanden. Steigende Insulinkonzentrationen können dieses Gleichgewicht verschieben und die Anzahl der Transporter an der Zelloberfläche erhöhen [Martin et al. 2006]. Eine Dysregulation in diesem Retentionsgleichgewicht kommt folglich auch als Ursache der hier fehlenden insulinabhängigen Glukoseaufnahme in Frage.

In der letzten Versuchsreihe zur insulinabhängigen Glukoseaufnahme wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass die hMSC-Tert Stammzelllinie ihren Ursprung im Knochenmark hat. Dort sind ebenfalls ausdifferenzierte Fettzellen, die medullären Adipozyten, zu finden. Der Anteil dieser Zellen erhöht sich mit zunehmendem Lebensalter durch steigende Zellanzahl und -größe [Rozman et al. 1989, Justesen et al. 2001]. Eine vermehrte Zunahme der Adipozyten tritt bei bestimmten Dysregulationen des Knochenstoffwechsels auf, z. B. bei Osteoporose [Justesen et al. 2001]. Auch Diabetiker leiden häufig unter Osteoporose und einer entsprechend erhöhten Frakturrate [Ivers et al. 2001, Rakic et al. 2006]. Möglicherweise entsteht im Knochen aus einer mesenchymalen Stammzelle eine depotspezifische Form der Fettzelle mit eingeschränkter Reaktion auf Insulin, weil ihre primäre Aufgabe nicht im Zusammenhang mit der Speicherung von Nahrungslipiden steht. Um diese Hypothese zu testen, wurden primäre humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark vergleichbar den hMSC-Tert Zellen zu Adipozyten differenziert und die Glukoseaufnahme gemessen (Abb. 12d). Auch in diesem Zellsystem war keine Abhängigkeit des Prozesses von Insulin festzustellen. Die Ursache für die fehlende Insulinabhängigkeit der Glukoseaufnahme kann also durchaus in der Natur sowohl der primären als auch der hMSC-Tert Adipozyten als Knochenmarksgenerierte Fettzellen liegen, sozusagen in ihrer Depotspezifität. Adipozyten verschiedener Fettdepots unterscheiden sich in ihrem Stoffwechselverhalten und in ihrer Einflussnahme auf den Organismus [Übersicht von Kissebah und Krakower 1994]. Für diese Spezifität ist jedoch bis jetzt erst in Ansätzen eine molekulare Grundlage gefunden worden [Hellmér et al. 1992, van Harmelen et al. 1998, Gesta et al. 2006 und Übersicht von Kissebah und Krakower 1994]. Mackay et al. vergleichen in einer ersten Studie die Expression adipozytärer Marker in subkutanen, medullären und aus mesenchymalen Stammzellen differenzierten Adipozyten [Mackay et al. 2006]. Dabei ist die Expression von adipogenen Transkriptionsfaktoren (PPAR $\gamma_2$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP1), Adipozytokinen (Leptin, Adipsin, u. a.) und aP2 und LPL in allen Adipozytenlinien vergleichbar. Vermutlich prägt die genaue Lage des jeweiligen Fettdepots im Organismus mit dem entsprechenden humoralen und hormonellen Umfeld sein Verhalten. Dies muss auch für die medullären Adipozyten des Knochens angenommen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Bedingungen im hier entwickelten Zellmodell genau den physiologischen Gegebenheiten im Knochen entsprechen und hier ein depotspezifischer Adipozytentyp generiert wurde, ist gering.

Zusammenfassend wurde die Insulinsensitivität des entwickelten Zellmodells durch die insulinabhängige Phosphorylierung von Akt gezeigt. Das Ergebnis der Glukoseaufnahmeversuche, in denen keine Insulinabhängigkeit gefunden wurde, steht dazu im Widerspruch. Um die Ursache für diesen Gegensatz aufzuklären, müssen umfassendere Expressionsanalysen der Glukosetransporter und genaue Untersuchungen der Signalwege durchgeführt werden, die die GLUT4-Translokation vermitteln.

#### **4.4 Bedeutung des Lipoproteinstoffwechsels für den Adipozyten**

Die in den hMSC-Tert Zellen gemessene Aufnahme von Lipoproteinen muss im Zusammenhang mit dem ermittelten Expressionsmuster der Lipoproteinrezeptoren betrachtet werden. Der LDLR wird mit Fortlauf der Differenzierung auf mRNA-Ebene zunehmend (Abb. 9a), auf Proteinebene abnehmend exprimiert (Abb. 10c). Die Tatsache, dass die Expression des LDLR-Gens durch SREBP1c reguliert wird, hätte ebenfalls eine steigende Expression vermuten lassen [Briggs et al. 1993]. Das LDLR-Protein wird also offensichtlich auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Die Abnahme des LDLR-Proteins steht im Einklang mit der sinkenden Aufnahme von LDL-Partikeln (Abb. 13a). Die Aufnahme von LDL dient der Versorgung der Zelle mit Cholesterol z. B. für den Aufbau von Membranen [Übersicht von Brown und Goldstein 1986]. Unter Berücksichtigung der morphologischen Änderung einer mesenchymalen Stammzelle, die sich zum reifen Adipozyten entwickelt, ist ein sinkender Bedarf an Cholesterol etwa für die Kompartimentierung der Zelle plausibel. Mit der Zunahme der Triglyzeride im Lipidspeicher des Adipozyten steigt auch der Anteil an Cholesterol [Übersicht von Krause und Hartman 1984]. Da das Fettgewebe eine vergleichsweise niedrige Cholesteroleigen-synthese hat [Angel und Bray 1979], muss das Cholesterol weitestgehend aus extrazellulären Quellen stammen. In diesem Zusammenhang ist neben dem Transfer von Cholesterol und Cholesterolestern durch LDL vor allem eine Rolle der HDL-Partikel vorgeschlagen worden [Fong und Angel 1989]. Die Aufnahme von Cholesterolestern aus HDL wird dabei durch LRP1 vermittelt [Vassiliou et al. 2001].

Sowohl der Very Low Density Lipoprotein-Rezeptor (VLDLR) als auch LRP1 werden während der Differenzierung der hMSC-Tert Zellen mit zunehmender Stärke exprimiert (Abb. 9a, Abb. 10c). Auch das Receptor-associated Protein (RAP), welches als intrazelluläres Chaperon sowohl LRP1 [Bu et al. 1995, Willnow et al. 1995] als auch den VLDLR stabilisiert [Battey et al. 1994], zeigt in diesem System eine steigende Expression über den Verlauf der Differenzierung, wird also mit LRP1 und dem VLDLR koreguliert. In 3T3-L1 Zellen ist während der Adipogenese eine Induktion des VLDLRs beschrieben [Gävfeldt et al. 1994]. Diese Induktion kann durch Dexamethason wahrscheinlich über einen indirekten Mechanismus ausgelöst werden [Enslin et al. 2002]. Auch in humanen Adipozyten wurde die Expression des VLDR nachgewiesen [Niemeier et al. 1996]. Die VLDLR knockout Maus hat verglichen mit dem Wildtyp weniger Fettgewebe [Frykman et

al. 1997]. Sie ist vor der Ausprägung einer durch fettreiche Nahrung induzierten Adipositas geschützt [Goudriaan et al. 2001]. Der VLDLR ist somit wahrscheinlich am Prozess der Aufnahme von VLDL-assoziierten Fettsäuren in das Fettgewebe beteiligt. LRP1 wird im Adipozyten durch PPAR $\gamma$  induziert [Gauthier et al. 2003]. Eine künstliche Aufrechterhaltung seiner Expression durch den Zusatz von Rosiglitazon kann jedoch durch die ebenfalls hohe Proteinexpression in Zellen des Protokolls B ausgeschlossen werden (Abb. 10c). LRP1 vermittelt u. a. die Aufnahme von Chylomikronen und Chylomikronenremnants [Beisiegel et al. 1989, Hussain et al. 1991, Rohlmann et al. 1998]. In den hMSC-Tert Adipozyten sinkt die Aufnahme dieser Partikel mit fortschreitender Differenzierung ab (Abb. 13a). Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zur ansteigenden LRP1-Expression (Abb. 10c). Es weist einerseits darauf hin, dass LRP1 im Adipozyten keine ausschließliche Versorgungsfunktion hat. In seiner Funktion als Multiliganden-Rezeptor wird für LRP1 eine Rolle in der Signaltransduktion diskutiert [Übersicht von Herz und Strickland 2000]. Andererseits erklärt sich dieses Ergebnis aus der Tatsache, dass die hMSC-Tert Adipozyten an Tag 21 der Differenzierung prall gefüllte Lipidspeicher besitzen. Dieser Umstand verhindert eine Aufnahme weiterer Lipide in größerem Umfang. Die Aufnahme ganzer Lipoproteine als physiologischer Weg der Versorgung mit Nahrungsfetten ist im Adipozyten eher unwahrscheinlich. Der größte Teil der Triglyzeridreichen Lipoproteine wird noch im Gefäßlumen durch die LPL hydrolysiert und die Fettsäuren in die Zelle aufgenommen. Die LRP1-vermittelte CR-Aufnahme spielt primär in der Leber eine Rolle. Mehrere Studien haben in 3T3-L1 Adipozyten die Translokation von intrazellulärem LRP1 in die Caveolae der Plasmamembran als Antwort auf einen Insulinstimulus gezeigt [Corvera et al. 1989, Zhang H et al. 2004]. Der Vorgang scheint durch die PI3K vermittelt zu werden [Ko et al. 2001]. Allerdings wurde eine insulinvermittelt gesteigerte Aufnahme von Lipoproteinen lediglich in primären Rattenadipozyten demonstriert [Descamps et al. 1993]. Eine Reproduktion dieser Ergebnisse im hier erstellten humanen Zellsystem war nicht möglich. Wie bei den bereits diskutierten Experimenten zur Glukoseaufnahme konnte keine Insulinabhängigkeit der Lipoproteinaufnahme festgestellt werden (Abb. 13a). Um den Einfluss von Insulin und Rosiglitazon auf LRP1 zu testen, wurde die CR-Aufnahme nach Vorinkubation der Zellen mit den beiden Zusätzen gemessen. Es ergaben sich jedoch keine Unterschiede in der Aufnahme (Abb. 13c). Die an der LRP1-Translokation beteiligten Signalwege sind zwar noch nicht genau charakterisiert [Ko et al. 2001], die im Zusammenhang mit der Insulinabhängigkeit der Glukoseaufnahme angestellten Überlegungen könnten jedoch auch für die LRP1-Translokation gelten. Möglicherweise ist eine insulinabhängige Zunahme von LRP1 an der Zelloberfläche auch in hMSC-Tert Adipozyten zu beobachten, wenn das Insulinsignal vollständig über die zuständige Signalkaskade weitergeleitet würde.



Neben LDLR, VLDLR und LRP1 wird das für die Bindung an diese Rezeptoren essentielle Apolipoprotein E in hoher Konzentration im Fettgewebe synthetisiert [Zechner et al. 1991]. In hMSC-Tert Adipozyten wurde eine kontinuierliche Expression von ApoE-mRNA (Abb. 9a) und -Protein (Abb. 10b) ab Tag 7 der Differenzierung gemessen. An Tag 21 der Differenzierung ist die Menge von ApoE-Protein sogar erhöht (Abb. 10b). Die mittels ELISA gemessene ApoE-Sekretion wurde den Proteindaten entsprechend ab Tag 7 der Differenzierung detektiert (Abb. 14a). Hierbei ergab sich ein Maximum an Tag 14 und ein Absinken der Sekretion an Tag 21. Da die Menge des ApoE-Transkriptes an Tag 21 nicht erhöht ist (Abb. 9a), die Sekretion des Proteins jedoch absinkt (Abb. 14a), könnte die verstärkte Detektion von intrazellulärem ApoE-Protein an Tag 21 (Abb. 10b) auf ein Auflaufen des Proteins zurückzuführen sein, etwa in Folge eines Rückstaus durch eine erniedrigte Sekretion. Diese Hypothese geht davon aus, dass der Prozess der Sekretion selber reguliert ist und nicht direkt durch die Menge des intrazellulär zur Verfügung stehenden Proteins angetrieben wird. Da ApoE ein direktes Target des PPAR $\gamma$  ist und eine erhöhte Expression und Sekretion von ApoE in 3T3-L1 Adipozyten durch Thiazolidindione beschrieben wurde [Yue et al. 2004], wurde der Einfluss von Rosiglitazon auf die Sekretion in hMSC-Tert Zellen gemessen (Abb. 14a). Hier konnte weder eine kurzfristige Wirkung noch ein längerfristiger Effekt festgestellt werden, der sich in einer deutlich höheren Sekretion in Zellen des Protokolls A hätte manifestieren müssen. Nur ein Probenpaar gibt einen Hinweis auf eine derartige Regulation. Wird den Zellen das Rosiglitazon ab Tag 12 entzogen (Protokoll B) und das Rosiglitazon für den Versuch nicht über Nacht wieder hinzugefügt (ohne Zusätze), dann ist an Tag 14 die ApoE-Sekretion im Vergleich zur entsprechenden Probe mit durchgehender Gabe von Rosiglitazon (Tag 14A ohne Zusätze) erniedrigt. Um den ApoE-induzierenden Effekt von Rosiglitazon deutlicher herauszuarbeiten, müssen gegensätzlichere Zellzustände bezüglich der Entzugsdauer und der Konzentration von Rosiglitazon getestet werden. Der Entzug von Rosiglitazon längerfristig im Protokoll B oder kurzfristig im Ansatz „ohne Zusätze“ führt nicht zu einem Abfall der ApoE-Sekretion. Das beweist, dass in diesem Versuchsaufbau kein Artefakt der Rosiglitazongabe, also keine artifizielle PPAR $\gamma$ -vermittelte Induktion des ApoE gemessen wurde. Die Bedeutung von ApoE für den Adipozytenstoffwechsel ist bislang völlig unklar. Dieses Zellsystem bietet die Möglichkeit, die ApoE-Funktion für Differenzierung und Stoffwechsel des Adipozyten – wie sie für den Knochenstoffwechsel bereits gezeigt werden konnte [Schilling et al. 2005] – z. B. durch siRNA vermitteltes Ausschalten der ApoE-Sekretion genauer zu untersuchen.

#### 4.5 Sekretion von Adipozytokinen

Im Zusammenhang mit der Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes Typ II wird die Beteiligung zahlreicher vom Fettgewebe sekretierter Hormone an der Auslösung oder Verzögerung des Krankheitsprozesses diskutiert. Für den humanen Stoffwechsel sind in

diesem Kontext Adiponektin und Interleukin (IL) 6 von besonderem Interesse. Deshalb wurde die Sekretion dieser Proteine in diesem Zellsystem unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Auf die Sekretion von Adiponektin konnte ein eindeutiger Effekt des Rosiglitazons festgestellt werden (Abb. 14b A: rote Balken). Der kurzfristige Zusatz von Rosiglitazon zum Medium 24 Stunden vor der Messung bewirkte einen Anstieg der Adiponektin-Sekretion. Die langfristige Gabe von Rosiglitazon innerhalb des Differenzierungsmediums ließ die Adiponektin-Konzentration im Überstand ebenfalls ansteigen. Dies wird besonders deutlich, wenn die Proben des Differenzierungsprotokolls A und B verglichen werden. Die Zellen des Protokolls B sekretieren deutlich weniger Adiponektin. Bei Entzug des Rosiglitazons für neun Tage, wie in den Proben Tag 21B geschehen, sinkt der Adiponektin-Wert drastisch ab. Aber auch schon der Entzug für zwei Tage, wie in den Proben Tag 14B, verursacht eine merkliche Reduktion der Adiponektin-Sekretion. Diese starke Wirkung des Rosiglitazons erklärt sehr wahrscheinlich auch das Absinken der Adiponektin-Sekretion bei Entzug der Differenzierungszusätze zwei Tage vor der Durchführung des Versuches (ohne Zusätze) in den Proben aller untersuchten Zeitpunkte. Die Induktion von Adiponektin durch PPAR $\gamma$ -Agonisten wurde in 3T3-L1 Adipozyten sowie in Humanstudien beschrieben [Maeda et al. 2001, Combs et al. 2002]. Auch Insulin erhöht die Sekretion von Adiponektin [Scherer et al. 1995]. Für diesen Effekt wurde eine Vermittlung über den PI3K-Weg postuliert [Bogan und Lodish 1999]. Da in diesem Versuchsaufbau im Gemisch der Differenzierungszusätze sowohl Rosiglitazon als auch Insulin vorhanden ist (Abb. 14b A), muss der jeweilige Einfluss der beiden Substanzen auf die Höhe der Adiponektin-Sekretion getrennt untersucht werden.

Die Sekretion von IL6 verhält sich im hier entwickelten Zellmodell genau entgegengesetzt zu der von Adiponektin (Abb. 14b B). Bei Entzug der Differenzierungszusätze für zwei Tage vor dem Versuch sekretieren die Zellen große Mengen an IL6. Für IL6 ist eine Hemmung der Expression durch Dexamethason beschrieben worden [Waage et al. 1990]. Sollte dieser Zusammenhang auch in humanen Adipozyten gelten, kann er die Unterdrückung der Sekretion bei Zusatz der Differenzierungssubstanzen erklären. Bemerkenswert ist allerdings die hohe Sekretion von IL6 in stabil differenzierten Adipozyten, denen für zwei Tage die Zusätze entzogen wurden. *In vivo* ist eine hohe IL6-Ausschüttung ein Hinweis auf einen pathologischen Zustand [Übersicht von Papanicolaou et al. 1998]. Die IL6-Sekretion kann in verschiedenen Systemen durch eine Hemmung des MEK/MAPK-Weges reduziert werden [Fasshauer et al. 2003, Wulster-Radcliffe et al. 2004]. Möglicherweise ist die konstitutive MAPK-Aktivierung in den hMSC-Tert Zellen für die hohe IL6-Sekretion verantwortlich. Dagegen spricht allerdings die aktivierte MAPK in undifferenzierten hMSC-Tert Zellen (Abb. 11b), die kaum IL6 sekretieren (Abb. 14b B d0). Die hohe Sekretion von IL6 ist in humanen Adipozyten mit einer Abnahme von IRS1-Protein, GLUT4-mRNA und des insulinabhängigen Glukosetransportes verbunden [Rotter et al. 2003]. Die in diesem Zellsystem vergleichbar gemachten Beobachtungen (Abb. 11c,

Abb. 9b, Abb. 12b) könnten auf die Zunahme der IL6-Sekretion im Verlauf der Differenzierung und seine auto- und parakrine Wirkung zurückzuführen sein.

Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, ob die Adiponektin- und die IL6-Sekretion direkt aufeinander Einfluss nehmen. In 3T3-L1 Adipozyten vermindert die Gabe von IL6 die Adiponektin-Expression und -Sekretion. Dieser Effekt ist teilweise durch die Hemmung der MAPK umkehrbar [Fasshauer et al. 2003]. In primären humanen Adipozyten wurde eine Abnahme der Adiponektin-mRNA in Reaktion auf die Gabe von IL6 und seinem löslichen Rezeptor gemessen [Bruun et al. 2003]. In aktivierten Schweinemakrophagen bewirkt Adiponektin eine Reduktion des IL6 und einen Anstieg des IL10, ein antiinflammatorisches Zytokin [Übersicht von Moore et al. 2001]. Die Lipopolysaccharid-induzierte IL6-Sekretion konnte durch den Einsatz des MEK-Inhibitors U0126 teilweise verringert werden [Wulster-Radcliffe et al. 2004]. Ob die Ergebnisse der genannten Studien auf das humane hMSC-Tert Adipozytenmodell übertragbar sind, muss durch die experimentelle Untersuchung des Effektes von Adiponektin und IL6 auf die jeweilige Expression und Sekretion des anderen Adipozytokins geprüft werden. Dafür müssen detaillierte Expressionsstudien beider Adipozytokine auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt und die Einflüsse der verschiedenen Differenzierungszusätze auf die Expression bzw. Sekretion sauber voneinander getrennt werden.

Die Sekretion von Adiponektin und IL6 ist damit der einzige Parameter, in dem sich die Zellen der Differenzierungsprotokolle A und B unterscheiden und der durch den Entzug der Differenzierungssubstanzen für zwei Tage vor dem Versuch beeinflusst wird (Abb. 14b). Da alle anderen Charakteristika des Zellmodells davon unbeeinflusst waren, kann eine Dedifferenzierung der Adipozyten bei Entzug der Differenzierungszusätze als Ursache etwa für den Abfall des Adiponektins ausgeschlossen werden. Mit dem Nachweis der Adiponektin-Sekretion ist ein zusätzlicher Beleg für die adipozytären Eigenschaften des etablierten Zellmodells erbracht worden.

Die Aufklärung der regulatorischen Mechanismen der Adiponektin-Sekretion und besonders die Einflussnahme von IL6 auf diesen Prozess sind wissenschaftlich von hohem Interesse, da eine Insulinresistenz mit hohen IL6- und erniedrigten Adiponektin-Werten einhergeht [Übersicht von Kershaw und Flier 2004]. Können direkte Zusammenhänge zwischen IL6-Wirkung und Adiponektin-Sekretion gefunden werden, eröffnete dies möglicherweise therapeutische Ansätze für die Behandlung der Insulinresistenz.

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Zellmodell für humane Adipozyten zu entwickeln und funktionale Aspekte in den verschiedenen Stadien der adipozytären Differenzierung zu untersuchen. Es konnte ein Differenzierungsprotokoll etabliert werden, das aus der humanen mesenchymalen Stammzelllinie hMSC-Tert stabil und reproduzierbar Zellen mit typischen Charakteristika reifer Adipozyten generiert. Die terminal differenzierten Zellen weisen einen monokulären Phänotyp auf, der morphologisch dem einer primären humanen Fettzelle entspricht. Mittels Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene konnten spezifische adipozytäre Marker u. a. aP2 und LPL detektiert und so der biochemische Nachweis der stabilen Differenzierung zu Adipozyten erbracht werden. Die während der Differenzierung stark ansteigende Expression von Proteinen des Lipoproteinstoffwechsels insbesondere von LRP1 und Apolipoprotein E bestätigen die Verbindung von Lipoprotein- und Adipozytenmetabolismus. Durch erste differentielle Untersuchungen des Proteoms mithilfe von 2D-Elektrophorese und anschließender MALDI-ToF Analyse konnten noch keine weiteren adipozytären Marker identifiziert werden. Der physiologischen Reaktion von Fettgewebe im postprandialen Stoffwechsel entsprechend, ist das entwickelte Adipozytenmodell sensitiv gegenüber Insulin. Dies wurde durch die insulinvermittelte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges gezeigt, der die metabolische Wirkung von Insulin vermittelt. Weitere funktionale Untersuchungen ergaben eine hohe basale Glukoseaufnahme in hMSC-Tert Zellen, die zwar im Verlauf der Differenzierung ansteigt, aber unbeeinflusst von einem Insulinstimulus der Zelle ist. Dieses Ergebnis ist durch das mit quantitativer real time PCR bestimmte Expressionsmuster der Glukosetransporter zu erklären, das für ausdifferenzierte Adipozyten relativ hohe mRNA-Mengen von insulinunabhängigem GLUT1 bei geringen Mengen von insulinabhängigem GLUT4 aufweist. Eine weitere Ursache kann der Ursprung der Zelllinie aus dem Knochenmark sein, da sich primäre humane mesenchymale Stammzellen, die zu Adipozyten ausdifferenziert wurden, vergleichbar verhielten. Wegen der hohen Expression von Lipoproteinrezeptoren während der Differenzierung wurde die Aufnahme von Lipoproteinen in hMSC-Tert Zellen gemessen. Mit Fortschreiten der Differenzierung wurde ein Absinken der Partikelaufnahme beobachtet. Das ist mit dem sinkenden Bedarf der Zelle an exogenen Lipiden aufgrund intrazellulär wachsender Lipidspeicher vereinbar und impliziert neben der Versorgungsaufgabe weitere Funktionen der Lipoproteinrezeptoren in Adipozyten. Als spezifischer Marker des Fettgewebes konnte in hMSC-Tert Zellen die Sekretion von Adiponektin gemessen werden. Bei kurzfristigem Entzug der Differenzierungszusätze sekretierten die Adipozyten vermehrt das für die Entstehung der Insulinresistenz mit verantwortliche Interleukin 6. Dieses Zellsystem ist somit ein sehr gut geeignetes Modell, um in Zukunft die endokrine Funktion des humanen Fettgewebes und dessen Regulation zu untersuchen.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Morphologie primärer weißer Adipozyten.....	4
Abbildung 2	Transkriptionelle Regulation der Differenzierung.....	6
Tabelle 1	Übersicht wichtiger adipogener Transkriptionsfaktoren und ihrer Zielgene.....	7
Abbildung 3	Schematische Darstellung von Lipogenese und Lipolyse im Adipozyten.....	11
Abbildung 4	Schematischer Ablauf der adipozytären Differenzierung <i>in vitro</i> .....	21
Tabelle 2	Übersicht der in der RT-PCR verwendeten Primer.....	31
Tabelle 3	Zusammenstellung der in der RT-PCR verwendeten Protokolle.....	31
Tabelle 4	Übersicht der in der quantitativen real time PCR verwendeten Primer.....	33
Abbildung 5	Schema der mittels PathScan Western Blot detektierbaren Signalwege.....	35
Tabelle 5	Zusammenstellung der verwendeten Antikörper.....	38
Abbildung 6	Schema des Protokolls zur adipozytären Differenzierung von hMSC-Tert Zellen	46
Abbildung 7a	Zellbild im Verlauf der adipozytären Differenzierung.....	48
Abbildung 7b	Zellbild im Verlauf der adipozytären Differenzierung nach Fettrotfärbung.....	49
Abbildung 7c	Zellbild im Verlauf der adipozytären Differenzierung nach Nilrot- und DAPI-Färbung.....	50
Abbildung 8a	Zellmorphologie im Verlauf der adipozytären Differenzierung nach Fettrot- und DAPI-Färbung.....	51
Abbildung 8b	Zellmorphologie terminal differenzierter Adipozyten.....	52
Tabelle 6	Entwicklung intrazellulärer Lipidkonzentrationen im Verlauf der Differenzierung	53
Abbildung 9a	mRNA-Expression von adipozytären Markern und Lipoproteinrezeptoren im Verlauf der Differenzierung.....	55
Abbildung 9b	Expression der Glukosetransporter 1 und 4 im Verlauf der adipozytären Differenzierung.....	56
Abbildung 10a	Beispielhafte Darstellung der Standardisierung der Proteinbeladung.....	58
Abbildung 10b	Expression adipozytärer Marker auf Proteinebene im Verlauf der Differenzierung.....	59
Abbildung 10c	Expression von Lipoproteinrezeptoren auf Proteinebene im Verlauf der adipozytären Differenzierung.....	61
Abbildung 11a	Insulinabhängige Phosphorylierung in differenzierten 3T3-L1 und hMSC-Tert Adipozyten.....	62
Abbildung 11b	Insulinabhängige Phosphorylierung im Verlauf der adipozytären Differenzierung	64
Abbildung 11c	Vergleich der insulinabhängigen Phosphorylierung von Akt in hMSC-Tert Zellen differenziert nach Protokoll A und B.....	65
Abbildung 12a	<sup>3</sup> H-Desoxyglukoseaufnahme in differenzierten 3T3-L1 Zellen.....	66
Abbildung 12b	<sup>3</sup> H-Desoxyglukoseaufnahme in differenzierten hMSC-Tert Zellen.....	67
Abbildung 12c	<sup>3</sup> H-Desoxyglukoseaufnahme in hMSC-Tert Zellen in Anwesenheit von Cytochalasin B oder Cytochalasin D.....	68
Abbildung 12d	<sup>3</sup> H-Desoxyglukoseaufnahme in differenzierten primären humanen Stammzellen und differenzierten hMSC-Tert Zellen.....	69
Abbildung 13a	<sup>125</sup> I-Lipoproteinaufnahme in differenzierten hMSC-Tert Zellen.....	71
Abbildung 13b	Spezifische <sup>125</sup> I-Chylomikronenremnantaufnahme in hMSC-Tert Zellen.....	72
Abbildung 13c	Spezifische <sup>125</sup> I-Chylomikronenremnantaufnahme in hMSC-Tert Zellen unter Einfluss von Insulin und Rosiglitazon.....	73
Abbildung 14a	Apolipoprotein E-Sekretion in Anwesenheit von Rosiglitazon.....	74
Abbildung 14b	Sekretion von Adipozytokinen in Anwesenheit von Rosiglitazon.....	76
Abbildung 15a	2D-Gelelektrophorese undifferenzierter und differenzierter hMSC-Tert Zellen.....	77
Abbildung 15b	Gelpunktanalyse eines Coomassie-gefärbten 2D-Gels.....	78
Abbildung 15c	Beispiel für einen Peptidfingerabdruck.....	79

## Literatur

Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, Elsnab B, Jakob F, Hokland P, Kassem M: Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene in despite of extensive proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005) 326: 527-38

Ailhaud G, Hauner H: Development of white adipose tissue. In: Bray G, Bouchard C, James WPT: *The Handbook of Obesity* (1998) Marcel Dekker, Inc. New York 359-78

Alessi D, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J: 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PKD1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase *in vivo* and *in vitro*. *Current Biology* (1997) 8: 69-81

Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P: Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *Journal of Lipid Research* (1991) 32: 1449-56

Angel A; Bray GA: Synthesis of fatty acids and cholesterol by liver, adipose tissue and intestinal mucosa from obese and control patients. *European Journal of Clinical Investigation* (1979) 9(5): 355-62

Angulo P: Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine* (2002) 346(16): 1221-31

Anthonsen MW, Rönstrand L, Wernstedt Cm Degerman E, Holm C: Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273(1): 215-21

Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R: The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(11): 10070-6

Armoni M, Quon MJ, Maor G, Avigad S, Shapiro D, Harel C, Esposito D, Goshen Y, Yaniv I, Karnieli E: PAX3/forkhead homolog in rhabdomyosarcoma oncoprotein activates glucose transporter 4 gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2002) 87(11): 5312-24

Armoni M, Kritiz N, Harel C, Bar-Yoseph F, Chen H, Quon MJ, Karnieli E: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  represses *GLUT4* promoter activity in primary adipocytes, and rosiglitazone alleviates this effect. *Journal of Biological Chemistry* (2003) 278(33): 30614-23

Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN: Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* (1987) 30: 437-40

Axelrod JD, Pilch PF: Unique cytochalasin B binding of the hepatic glucose carrier. *Biochemistry* (1983) 22: 2222-7

Axelsen M, Smith U, Eriksson JW, Taskinen MR, Jansson PA: Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Annals of Internal Medicine* (1999) 131(1): 27-31

Banerjee RR, Lazar MA: Resistin: molecular history and prognosis. *Journal of Molecular Medicine* (2003) 81: 218-26

- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B: Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2000) 85(9): 3338-42
- Bastard JP, Maachi M, Tran van Nhieu J, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B: Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2002) 87(5): 2084-9
- Basu R, Chandramouli V, Dicke B, Landau B, Rizza R: Obesity and type 2 diabetes impair insulin-induced suppression of glycogenolysis as well as gluconeogenesis. *Diabetes* (2005) 54: 1942-8
- Batthey FD, Gáfvels ME, Fitzgerald DJ, Argraves WS, Chappell DA, Strauss III JF, Strickland DK: The 39 kDa receptor-associated protein regulates ligand binding by the very low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* (1994) 269(37): 23268-73
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK: The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* (1989) 341(6238): 162-4
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G: Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proceedings of the National Academy of Science* (1991) 88: 8342-6
- Bentzon JF, Stenderup K, Jansen FD, Schrøder HD, Abdallah BM, Jensen TG, Kassem M: Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005) 330: 633-40
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine* (2001) 7(8): 947-53
- Biddinger SB, Kahn CR: From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes. *Annual Reviews of Physiology* (2006) 68: 123-58
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS: Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell* (1998) 1(4): 619-25
- Bocos C, Gottlicher M, Gearing K, Banner C, Enmark E, Teboul M, Crickmore A, Gustafsson JA: Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1995) 53: 467-73
- Boden G, Chen X, Stein P: Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycaemic patients with type 2 diabetes mellitus. *American Journal for Physiology - Endocrinology and Metabolism* (2001) 280: E23-E30
- Bogan JS, Lodish HF: Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *Journal of Cell Biology* (1999) 146(3): 609-20
- Boone C, Mourot J, Grégoire F, Remacle C: The adipose conversion process: Regulation by extracellular and intracellular factors. *Reproduction Nutrition Development* (2000) 40: 325-58
- Bosch RR, Bazuine M, Span PN, Willems PHGM, Olthaar AJ, van Rennes H, Maassen JA, Tack CJ, Hermus ARMM, Sweep CGJ: Regulation of GLUT1-mediated glucose uptake by PKC $\lambda$ -PKC $\beta_{11}$  interactions in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Journal* (2004) 384: 349-55
- Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmell AR, Londos C: Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275 (49): 38486-93

- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R: Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(45): 46835-42
- Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL: Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268(19): 14490-6
- Brown MS, Goldstein JL: A Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* (1986) 232: 34-47
- Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B: Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *American Journal for Physiology - Endocrinology and Metabolism* (2003) 285: E527-E533
- Bu G, Geuze HJ, Strous GJ, Schwartz AL: 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO Journal* (1995) 14(10): 2269-80
- Burns JS, Abdallah BM, Guldberg P, Rygaard J, Schrøder HD, Kassem M: Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Research* (2005) 65(8): 3126-35
- Cannon B, Nedergaard J: Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiological Reviews* (2003) 84: 277-359
- Carpentier A, Mittelman SD, Lamarche B, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF: Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *American Journal for Physiology - Endocrinology and Metabolism* (1999) 39: E1055-E1066
- Chapman AB, Knight DM, Dieckmann BS, Ringold GM: Analysis of Gene Expression during Differentiation of Adipogenic Cells in Culture and Hormonal Control of the Developmental Program. *Journal of Biological Chemistry* (1984) 259(24): 15548-55
- Clarke SD: The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Current Opinion in Lipidology* (2004) 15: 13-8
- Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ: Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275(7): 5011-5
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA: Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *Journal of Lipid Research* (1999) 40: 967-72
- Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE, Moller DE: Induction of adipocyte complement-Related protein of 30 kilodaltons by PPAR $\gamma$  agonists: A potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* (2002) 143(3): 998-1007
- Corvera S, Graver DF, Smith RM: Insulin increases the cell surface concentration of  $\alpha_2$ -macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1989) 264(17): 10133-8
- Cross DE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* (1995) 378: 785-9



- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC: Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of Cell Science* (2004) 117:2971-81
- Dang ZC, Lowik CWGM: Differential effects of PD98059 and U0126 on osteogenesis and adipogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* (2004) 92: 525-33
- Danielsson A, Nystrom FH, Strålfors P: Phosphorylation of IRS1 at serine 307 and serine 312 in response to insulin in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2006) 342: 1183-7
- Descamps O, Bilheimer D, Herz J: Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated  $\alpha_2$ -macroglobulin in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268(2): 974-81
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI: Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation* (1999) 103(2): 253-9
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E: SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275(21): 15985-91
- Ensler K, Mohammadi M, Broijers A, Angelin B, Gåfvvels M: Dexamethasone stimulates very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene expression in differentiating 3T3-L1 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* (2002) 1581(1-2): 36-48
- Entingh-Pearsall A, Kahn CR: Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(36): 38016-24
- Ericsson J, Jackson SM, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA: Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *Journal of Biological Chemistry* (1997) 272(11): 7298-305
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW: Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue of obese humans. *Endocrinology* (2004) 145(5): 2273-82
- Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J: Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molecular and Cellular Biology* (1999) 19(8): 5495-503
- Fan JY, Carpentier JL, van Obberghen E, Grunfeld C, Gorden P, Orci L: Morphological changes of the 3T3-L1 fibroblast plasma membrane upon differentiation to the adipocyte form. *Journal of Cell Science* (1983) 61: 219-30
- Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR: Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Molecular and Cellular Biology* (2001) 21(1): 319-29
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R: Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Biophysical Research Communications* (2002) 290(3): 1084-9

Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Blüher M, Klein J, Paschke R: Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2003) 301(4): 1045-50

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeseer WS, van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM: Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273(29): 18623-32

Fernández-Real J, Ricart W: Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrine Reviews* (2003) 24(3): 278-301

Fingar DC, Hausdorff SF, Blenis J, Birnbaum MJ: Dissociation of pp70 ribosomal protein S6 kinase from insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268(4): 3005-8

Fink T, Abildtrup L, Fogd K, Abdallah BM, Kassem M, Ebbesen P, Zachar V: Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells* (2004) 22: 1346-55

Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thörne A, Rydén M, Hamsten A, Arner P: Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* (2001) 44: 1268-73

Fong BS, Angel A: Transfer of free and esterified cholesterol from low-density lipoproteins and high density lipoproteins to human adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* (1989) 1004: 53-60

Font de Mora J, Porrás A, Ahn N, Santos E: Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Molecular and Cellular Biology* (1997) 17(10): 6068-75

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM: 15-Deoxy-delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* (1995) 83(5): 803-12

Franke WW, Hergt M, Grund C: Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* (1987) 49(1): 131-41

Fredrikson G, Strålfors P, Nilsson NÖ, Belfrage P: Hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. Purification and some properties. *Journal of Biological Chemistry* (1981) 256(12): 6311-20

Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P: Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta* (1986) 876(2): 288-93

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS: Omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1998) 83(3): 847-50

Frykman PK, Brown MS, Yamamoto T, Goldstein JL, Herz J: Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Science* (1995) 92: 8453-7

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I: Visfatin: A protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* (2005) 307: 426-30

- Gáfvels ME, Paavola LG, Boyd CO, Nolan PM, Wittmaack F, Chawla A, Lazar MA, Bucan M, Angelin B, Strauss III JF: Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homolog of the very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: Expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19. *Endocrinology* (1994) 135(1): 387-94
- Gauthier A, Vassiliou G, Benoist F, McPherson R: Adipocyte low density lipoprotein receptor-related protein gene expression and function is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Journal of Biological Chemistry* (2003) 278(14): 11945-53
- Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR: Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Science* (2006) 103(17): 6676-81
- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliewer SA, Lehmann JM, Morris DC: Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation by thiazolidinediones induced adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Molecular Pharmacology* (1996) 50: 1087-94
- Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME: Playing with bone and fat. *Journal of Cellular Biochemistry* (2006) 98: 251-66
- Ginsberg-Fellner F, Knittle JL: Weight reduction in young obese children. I. Effects on adipose tissue cellularity and metabolism. *Pediatric Research* (1981) 15(10): 1381-9
- Goldrick RB: Effects of insulin on glucose metabolism in isolated human fat cells. *Journal of Lipid Research* (1967) 8: 581-8
- Goudriaan JR, Tacke PJ, Dahlmans VEH, Gijbels JJ, Willems van Dijk K, Havekes LM, Jong MC: Protection From Obesity in Mice Lacking the VLDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (2001) 21: 1488-93
- Green H, Kehinde O: Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* (1974) 1(3): 113-6
- Green H, Kehinde O: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* (1975) 5(1): 19-27
- Green H, Kehinde O: Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* (1976) 7(1): 105-13
- Green H, Kehinde O: Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *Journal of Cell Physiology* (1979) 101(1): 169-71
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londons C: Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *Journal of Biological Chemistry* (1991) 266 (17): 11341-6
- Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D: Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Research* (1992) 52(15): 4113-6
- Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R: Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* (2006) 312: 734-7
- Halestrap AP, Denton RM: Insulin and the regulation of adipose tissue acetyl-coenzyme A carboxylase. *Biochemical Journal* (1973) 132: 509-17

Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF: Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *Journal of Clinical Investigations* (1989) 84: 1663-70

Hauner H: Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions. *Endocrinology* (1990) 127(2): 865-72

Hauner H, Röhrig K, Spelleken M, Liu LS, Eckel J: Development of insulin-responsive glucose uptake and GLUT4 expression in differentiating human adipocyte precursor cells. *International Journal of Obesity* (1998) 22: 448-53

Havekes LM, de Knijff P, Beisiegel U, Havinga J, Smit M, Klasen E: A rapid micromethod for apolipoprotein E phenotyping directly in serum. *Journal of Lipid Research* (1987) 28: 455-63

Heeren J, Niemeier A, Merkel M, Beisiegel U: Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *Journal of Molecular Medicine* (2002) 80: 576-84

Hellmér J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P: Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1992) 75(1): 15-20

Hellwig B, Joost HG: Differentiation of Erythrocyte- (GLUT1), Liver- (GLUT2), and Adipocyte-Type (GLUT4) Glucose Transporters by Binding of the Inhibitor Cytochalasin B, Forskolin, Dipyrindamole, and Isobutylmethylxanthine. *Molecular Pharmacology* (1991) 40: 383-9

Herz J, Strickland DK: LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *Journal of Clinical Investigations* (2001) 108(6): 779-84

Hirsch J, Batchelor B: Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clinics of Endocrinology and Metabolism* (1976) 5(2): 299-311

Hoffstedt J, Arner P, Hellers G, Lönnqvist F: Variation in adrenergic regulation of lipolysis between omental and subcutaneous adipocytes from obese and non-obese men. *Journal of Lipid Research* (1997) 38: 795-804

Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB: TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* (2005) 309: 1074-8

Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM: Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in *aP2*, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* (1996) 274: 1377-9

Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM: Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Science* (1995) 92: 9856-60

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry* (1996) 271(18): 10697-703

Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM: Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR $\gamma$ . *Science* (2005) 274: 2100-3

Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK: Interleukin-4-dependent production of PPAR- $\gamma$  ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* (1999) 400: 379-82

- Hugo ER, Brandebourg TD, Comstock CES, Gersin KS, Sussman JJ, Ben-Jonathan N: LS14: A novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* (2006) 147(1): 306-313
- Hummasti S, Laffite BA, Watson MA, Galardi C, Chao LC, Ramamurthy L, Moore JT, Tontonoz P: Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target. *Journal of Lipid Research* (2004) 45: 616-25
- Hunt CR, Ro JHS, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM: Adipocyte P2 gene: Developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Science* (1986) 83: 3786-90
- Hussain MM, Maxfield FR, Más-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, Mahley RW: Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/ $\alpha_2$ -macroglobulin receptor. *Journal of Biological Chemistry* (1991) 266(21): 13936-40
- Hwang CS, Mandrup S, MacDougald OA, Geiman DE, Lane MD: Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ . *Biochemistry* (1996) 93: 873-7
- Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T: Reciprocal roles of msx2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(32): 34015-22
- Imaizumi K, Fainaru M, Havel RJ: Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins. *Journal of Lipid Research* (1978) 19: 712-22
- Ishiki M, Klip A: Minireview: Recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: New signals, locations, and partners. *Endocrinology* (2005) 146 (12): 5071-8
- Ivers RQ, Cumming RG, Mitchel P, Peduto AJ: Diabetes and risk of fracture. *Diabetes Care* (2001) 24: 1198-1203
- Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA: Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction: Fatty acid dependence on binding. *Journal of Biological Chemistry* (2003) 278(48): 47636-43
- Jiang WG, Redfern A, Bryce RP, Mansel RE: Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* (2000) 62(2): 119-27
- Jong MC, Gijbels MJJ, Dahlmans VEH, van Gorp PJJ, Koopman SJ, Ponc M, Hofker MH, Havekes LM: Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Journal of Clinical Investigation* (1998) 101(1): 145-52
- Jong MC, Voshol PJ, Muurling M, Dahlmans VEH, Romijn JA, Pijl H, Havekes LM: Protection from obesity and insulin resistance in mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetes* (2001) 50: 2779-85
- Jullien D, Tanti JF, Heydrick SJ, Gautier N, Grémeaux T, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y: Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268(20): 15246-51
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M: Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* (2001) 2(3): 165-71
- Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M: Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcified Tissue International* (2002) 71:36-44

- Kalant D, Cianflone K: Regulation of fatty acid transport. *Current Opinion in Lipidology* (2004) 15: 309-14
- Kelly KA, Gimble JM: 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. *Endocrinology* (1998) 139(5): 2622-8
- Kern PA, di Gregorio G, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G: Perilipin expression in human adipose tissue is elevated with obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2004) 89(3): 1352-8
- Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2004) 89(6): 2548-56
- Kim JB, Spiegelman BM: ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes and Development* (1996) 10(1): 1096-107
- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM: ADD1/SREBP1c activates PPAR $\gamma$  through the production of endogenous ligands. *Proceedings of the National Academy of Science* (1998a) 95: 4333-7
- Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM: Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *Journal of Clinical Investigation* (1998b) 101(1): 1-9
- Kim YB, Shulman GI, Kahn BK: Fatty acid infusion selectively impairs insulin action on Akt1 and protein kinase C  $\lambda/\zeta$  but not on glycogen synthase kinase-3. *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277(36): 32915-22
- Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Nishizawa H, Matsuda M, Takahashi M, Hotta K, Nakamura T, Yamashita S, Tochino Y, Matsuzawa Y: Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2000) 275(7): 20896-902
- Kissebah A, Krakower GR: Regional adiposity and morbidity. *Physiological Reviews* (1994) 74(4): 761-811
- Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M: Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Molecular and Cellular Biology* (1999) 19(9): 6286-96
- Kletzien RF, Perdue JF, Springer A: Cytochalasin A and B. *Journal of Biological Chemistry* (1972) 247(9): 2964-6
- Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG: Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Molecular Pharmacology* (1991) 41: 393-8
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM: A prostaglandin J<sub>2</sub> metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* (1995) 83(5): 813-9
- Ko KWS, Avramoglu RK, McLeod RS, Vukmirica J, Yao Z: The insulin-stimulated cell surface presentation of low density lipoprotein receptor-related protein in 3T3-L1 adipocytes is sensitive to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Biochemistry* (2001) 40: 752-9

- Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, Chan L: The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding. *Metabolism* (2000) 49(1): 22-31
- Kozka IJ, Clark AE, Holman GD: Chronic treatment with insulin selectively down-regulates cell-surface GLUT4 glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1991) 266(18): 11726-31
- Kratchmarova , Blagoev B, Haack-Sørensen M, Kassem M, Mann M: Mechanism of divergent growth factor stem cell differentiation. *Science* (2005) 308: 1472-7
- Krause BR, Hartman AD: Adipose tissue and cholesterol metabolism. *Journal of Lipid Research* (1984) 25: 97-110
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W: Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology* (1997) 11(6): 779-91
- Laatsch A, Ragozin S, Greal T, Beisiegel U, Heeren J: Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *European Journal of Cell Biology* (2004) 83(3): 113-20
- Ladu MJ, Kaspas H, Palmer WK: Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting. *American Journal of Physiology* (1991) 260: R953-R959
- Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P: LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Science* (2001) 98(2): 507-12
- Lefebvre AM, Perinado-Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Staels B: Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (1997) 17(9): 1756-64
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *Journal of Biological Chemistry* (1995) 270(22): 12953-6
- Leppälüoto J, Pääkkönen T, Korhonen I, Hassi J: Pituitary and autonomic responses to cold exposure. *Acta Physiologica Scandinavica* (2005) 184: 255-64
- Lin FT, Lane MD: CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Biochemistry* (1994) 91: 8757-61
- Löffler G, Petrides EP: *Biochemie und Pathobiochemie*. 7.völlig neu bearbeitete Auflage (2003) Springer-Verlag, Berlin
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* (1951) 193(1): 265-75
- Lundgren M, Burén J, Ruge T, Myrnäs T, Eriksson JW: Glucocorticoids down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2004) 89(6): 2989-97
- Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P, Schmidt CA: Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Molecular and Cellular Probes* (2002) 16: 25-30

- Lyngsø D, Simonsen L, Bülow J: Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *Journal of Physiology* (2002) 543(1): 379-86
- Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA: Minireview: Adiposity, inflammation and atherogenesis. *Endocrinology* (2003) 144(6): 2195-200
- MacDouglass OA, Lane MD: Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual Review of Biochemistry* (1995) 64: 345-73
- Mackay DL, Tesar PJ, Liang LN, Haynesworth SE: Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Journal of Cellular Physiology* (2006) 207: 722-8
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y: PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* (2001) 50: 2094-9
- Marcinkiewicz A, Gauthier D, Garcia A, Brasaemle DL: The phosphorylation of serine 492 of perilipin A directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *Journal of Biological Chemistry* (2006) 281(17): 11901-9
- Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J: Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase by PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators. *Journal of Biological Chemistry* (1997) 272(45): 28210-7
- Martin OJ, Lee A, McGraw TE: GLUT4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin-modulated bipartite dynamic mechanism. *Journal of Biological Chemistry* (2006) 281(1): 484-90
- Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillone A, Chang BHJ, Quast MJ, Gorenstein D, Chen KH, Chan L: Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr<sup>db/db</sup>* mice. *Nature Genetics* (2000) 26: 474-9
- Mead JR, Irvine SA, Ramji DP: Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine* (2002) 80: 753-69
- Merida E, Delgado E, Molina LM, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I: Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1993) 77(6): 1654-7
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, Kahn BK: Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* (2002) 415: 339-43
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , *in vivo*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1997) 82(12): 4196-200
- Mooney RA, Bordwell KL: Counter-regulation by insulin and isoprenaline of a prominent fat-associated phosphoprotein doublet in rat adipocytes. *Biochemical Journal* (1991) 274: 433-8
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* (2001) 19: 683-765
- Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J: An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylates the p70 S6 kinase. *Journal of Biological Chemistry* (1992) 267(5): 3325-35
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM: Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ . *Cell* (1998) 93(2): 229-40



Navé BT, Ouwens DM, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR: Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal* (1999) 344: 427-31

Négrel R, Grimaldi P, Ailhaud G: Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of *ob/ob* mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proceedings of the National Academy of Science* (1978) 75(12): 6054-8

Niemeier A, Gåvfels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U: VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *Journal of Lipid Research* (1996) 37: 1733-42

Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M: Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: Implications for osteopenic disorders. *Journal of Bone and Mineral Research* (1998) 13(3): 371-82

Ostermeyer AG, Paci JM, Zeng Y, Lublin DM, Munro S, Brown DA: Accumulation of caveolin in the endoplasmatic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *Journal of Biological Chemistry* (2001) 152(5): 1071-8

Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP: The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine* (1998) 128(2): 127-37

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* (1995) 269: 540-3

Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y: Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* (1999) 48: 452-9

Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E: Modulation of insulin action. *Diabetologia* (2004) 47: 170-84

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (1999) 284: 143-7

Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton RG: Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Molecular Biology of the Cell* (2005) 16: 2091-105

Printz RL, Koch S, Potter LR, O'Doherty RM, Tiesinga JJ, Moritz S, Granner DK: Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin and evolution. *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268(7): 5209-19

Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR: Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and C/EBP $\alpha$  gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277(48): 46226-32

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G: Phosphorylation and activation of p70<sup>S6k</sup> by PDK1. *Science* (1998) 279: 707-10

Rajala MW, Scherer PE: Minireview: The Adipocyte – At the crossroads of energy homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology* (2003) 144(9): 3765-73

Rakic V, Davis WA, Chubb SAP, Islam FMA, Price RL, Davis TME: Bone mineral density and its determinants in diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetologia* (2006) 49: 863-71

- Reusch JEB, Colton LE, Klemm DJ: CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Molecular and Cellular Biology* (2000) 20(3): 1008-20
- Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C: Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Research* (1973) 33: 3231-8
- Ribon V, Saltiel AR: Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Journal* (1997) 324: 839-46
- Ribot J, Rantala M, Kesäniemi A, Palou A, Savolainen MJ: Weight loss reduces expression of SREBP1c/ADD1 and PPAR $\gamma_2$  in adipose tissue of obese women. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (2001) 441: 498-505
- Rice KM, Turnbow MA, Garner CW: Insulin stimulates the degradation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1993) 190(3): 961-7
- Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, Ailhaud G: Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004) 315(2): 255-63
- Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C: Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *Journal of Experimental Medicine* (2005) 201(9): 1397-1405
- Rohlmann A, Gotthard M, Hammer RE, Herz J: Inducible inactivation of hepatic LRP gene by Cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *Journal of Clinical Investigation* (1998) 101: 689-95
- Romanelli A, Martin KA, Toker A, Blenis J: p70 S6 kinase is regulated by protein kinase C $\zeta$  and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Molecular and Cellular Biology* (1999) 19(4): 2921-8
- Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U: Insulin receptor substrate (IRS)-1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Science* (1997) 94: 4171-5
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM: Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes and Development* (2000) 14: 1293-1307
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM: C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes and Development* (2002) 16: 22-6
- Rotter V, Nagaev I, Smith U: Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal of Biological Chemistry* (2003) 278(46): 45777-84
- Rozman C, Feliu E, Berga L, Reverter JC, Climent C, Ferran MJ: Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both size and number of adipocytes: a stereological study. *Experimental Hematology* (1989) 17(1): 34-7
- Ruan H, Hacoen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF: Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* (2002) 51: 1319-36
- Ryall RL, Goldrick RB: Glycerokinase in human adipose tissue. *Lipids* (1977) 12(3): 272-7

- Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, Spiegelman BM, Kasuga M: Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273(44): 28945-52
- Salans LB, Cushman SW, Weisman RE: Studies of human adipose tissue: Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *Journal of Clinical Investigations* (1973) 52: 929-41
- Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Insight review article. *Nature* (2001) 414: 799-806
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR complex. *Science* (2005) 307: 1098-1101
- Scheja L, Makowski L, Uysal KT, Wiesbrock SM, Shimshek DR, Meyers DS, Morgan M, Parker RA, Hotamisligil GS: Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in *aP2*<sup>-/-</sup> mice. *Diabetes* (1999) 48: 1987-94
- Scherer PE, Lisanti MO, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF: Induction of caveolin during adipogenesis and association of Glut4 with caveolin-rich vesicles. *Journal of Biological Chemistry* (1994) 269(5): 1233-43
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1995) 270(45): 26746-9
- Schilling AF, Schinke T, Münch C, Gebauer M, Niemeier A, Priemel M, Streichert T, Rueger JM, Amling M: Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *Journal of Bone and Mineral Research* (2005) 20(2): 274-82
- Schöbitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F: Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *European Journal of Neuroscience* (1993) 5(11): 1426-35
- Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J: Induction of the acyl-Coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *Journal of Biological Chemistry* (1995) 270(33): 19269-76
- Schoonjans K, Gelman L, Haby C, Briggs M, Auwerx J: Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes. *Journal of Molecular Biology* (2000) 304(3): 323-34
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA: Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2003) 278(16): 13740-6
- Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, Steffensen KR, Stulnig TM, Gustafsson JÅ, Park SD, Kim JB: Activated liver X receptor stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression. *Molecular and Cellular Biology* (2004) 24(8): 3430-44
- Serrero G, Khoo JC: An *in vitro* model to study adipose differentiation in serum-free medium. *Analytical Biochemistry* (1982) 120(2): 351-9
- Sethi JK, Hotamisligil GS: The role of TNF $\alpha$  in adipocyte metabolism. *Cell and Developmental Biology* (1999) 10: 19-29
- Shen WJ, Liang Y, Hong R, Patel S, Natsu V, Sridhar K, Jenkins A, Bernlohr DA, Kraemer FB: Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase. *Journal of Biological Chemistry* (2001) 276(52): 49443-8

- Shepherd PR, Navé BT, Siddle K: Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochemical Journal* (1995) 305: 25-8
- Shigemitsu K, Tsujishita Y, Hara K, Nanahoshi M, Avruch J, Yonezawa K: Regulation of translational effectors by amino acid and mammalian target of rapamycin signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274(2): 1058-65
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SIS, Jensen TG, Kassem M: Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nature Biotechnology* (2002) 20: 592-6
- Smith P, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS: Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1988) 263(19): 9402-8
- Spiegelman BM, Frank M, Green H: Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1983) 258(16): 10083-9
- Spiegelman BM: PPAR- $\gamma$ : Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* (1998) 47: 507-14
- Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV: Protein kinase C- $\zeta$  as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1997) 272(48): 30075-82
- Stephens JM, Lee J, Pilch PF: Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* (1997) 272(2): 971-6
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahlma RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* (2001) 409: 307-12
- Strålfors P, Honnor RC: Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *European Journal of Biochemistry* (1989) 182(2): 379-85
- Strålfors P: Autolysis of isolated adipocytes by endogenously produced fatty acids. *FEBS* (1990) 263(1): 153-4
- Student AK, Hsu RY, Lane MD: Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1980) 255(10): 4745-50
- Sun XJ, Goldberg JL, Qiao LY, Mitchell JJ: Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* (1999) 48: 1359-64
- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P: Inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochemical Journal* (1993) 296: 15-9
- Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA: Identification of conserved *cis*-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 274(29): 20603-10
- Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD: Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Science* (2004) 101(26): 9607-11

- Tebbey PW, McGowan KM, Stephens JM, Buttke TM, Pekala PH: Arachidonic acid down-regulates the insulin-dependent glucose transporter gene (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting transcription and enhancing mRNA turnover. *Journal of Biological Chemistry* (1994) 269(1): 639-44
- Thirone ACP, Huang C, Klip A: Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signalling and glucose transport. *Trends in Endocrinology and Metabolism* (2006) 17(2): 70-6
- Thomas G, Hall MN: TOR signalling and control of cell growth. *Current Opinion of Cell Biology* (1997) 9(6): 782-7
- Thorn H, Stenkula KG, Karlsson M, Örtengren U, Nystrom FH, Gustavsson J, Strålfors P: Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Molecular Biology of the Cell* (2003) 14: 3967-76
- Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM: ADD1: a Novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Molecular and Cellular Biology* (1993) 13(8): 4753-9
- Tontonoz P, Hu E, Budavari AI, Spiegelman BM: mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes and Development* (1994a) 8(10): 1224-34
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma_2$ , a lipid-activated transcription factor. *Cell* (1994b) 79(7): 1147-56
- Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM: PPAR $\gamma_2$  regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Molecular and Cellular Biology* (1995) 15(1): 351-7
- Torodo GJ, Green H: Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of Cell Biology* (1963) 17: 299-313
- Tsakiridis T, Vranic M, Klip A: Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* (1994) 269(47): 29934-42
- Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I, Chrousos GP: Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology* (1997) 66(1): 54-62
- Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, Hotamisligil GS: A genetic variant at the fatty acid-binding protein *aP2* locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proceedings of the National Academy of Science* (2006) 103(18): 6970-5
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G: Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* (2004) 431: 200-5
- Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS: Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* (2000) 141(9): 3388-96
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM: Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics* (1996) 14(1): 95-7
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F, Arner P: Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* (1998) 47: 913-7

- Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR Jr: Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *Journal of Clinical Investigation* (1997) 99(3): 385-90
- Van't Hooft F, Havel RJ: Metabolism of chromatographically separated rat serum lipoproteins specifically labeled with <sup>125</sup>I-apolipoprotein E. *Journal of Biological Chemistry* (1981) 256(8): 3963-8
- Vassiliou G, Benoist F, Lau P, Kavaslar GN, McPherson R: The low density lipoprotein receptor-related protein contributes to selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by SW872 liposarcoma cells and primary human adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2001) 276(52): 48823-30
- Waage A, Slupphaug G, Shalaby R: Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *European Journal of Immunology* (1990) 20(11): 2439-43
- Wabitsch M, Brüderlein S, Melzner I, Braun M, Mechttersheimer G, Möller P: LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *International Journal of Cancer* (2000) 88: 889-94
- Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin K-M, Hauner H: Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *International Journal of Obesity* (2001) 25: 8-15
- Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO: Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature Medicine* (2002) 8(1): 75-9
- Wang L, Gout I, Proud CG: Cross-talk between the ERK and p70 S6 Kinase (S6K) signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* (2001) 276(35): 32670-7
- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL: SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* (1994) 77(1): 53-62
- Wassef H, Bernier L, Davignon J, Cohn JS: Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells. *Journal of Nutrition* (2004) 134: 2935-41
- Westergren H, Danielsson A, Nystrom FH, Strålsfors P: Glucose transport is equally sensitive to insulin stimulation, but basal and insulin-stimulated transport is higher, in human omental compared with subcutaneous adipocytes. *Metabolism Clinical and Experimental* (2005) 54: 781-5
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2001) 86(5): 1930-5
- Willnow TE, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J: Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science* (1995) 92: 4537-41
- Witters LA, Kemp BE: Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* (1992) 267 (5): 2864-7
- Wood IS, Trayhurn P: Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* (2003) 89: 3-9
- Wu Z, Bucher NL, Farmer SR: Induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  and glucocorticoids. *Molecular and Cellular Biology* (1996) 16(8): 4128-36

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM: Cross-regulation of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular Cell* (1999) 3: 151-8

Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian KA, Spurlock ME: Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004) 316: 924-9

Xu J, Liao K: Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(34): 35914-22

Yamamoto Y, Yoshimasa Y, Koh M, Suga J, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Nishimura H, Watanabe Y, Inoue G, Nakao K: Constitutively active mitogen-activated protein kinase increases GLUT1 expression and recruits both GLUT1 and GLUT4 at the cell surface in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* (2000) 49: 332-9

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* (2001) 7(8): 941-6

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* (2002) 8(11): 1288-95

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: Cloning of adiponektin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* (2003) 423: 762-9

Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* (2005) 436: 356-62

Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL: Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes and Development* (1995) 9(2): 168-81

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI: Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *Journal of Biological Chemistry* (2002) 277(52): 50230-6

Yu YH, Ginsberg HN: Adipocyte signaling and lipid homeostasis: Sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circulation Research* (2005) 96: 1042-52

Yue L, Rasouli N, Ranganathan G, Kern PA, Mazzone T: Divergent effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists and tumor necrosis factor  $\alpha$  on adipocyte apoE expression. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(46): 47626-32

Zechner R, Moser R, Newman TC, Fried SK, Breslow JL: Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *Journal of Biological Chemistry* (1991) 266(16): 10583-8

Zhang H, Links PH, Ngsee JK, Tran K, Cui Z, Ko KWS, Yao Z: Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(3): 2221-30

Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS: Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* (2002) 51: 2929-35

Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD: Role of CREB in transcriptional regulation of CCAT/enhancer-binding protein  $\beta$  Gene during adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(6): 4471-8

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* (1994) 372: 425-32

Zigman JM, Elmquist JK: Minireview: From Anorexia to Obesity – The yin and yan of body weight. *Endocrinology* (2003) 144(9): 3749-56

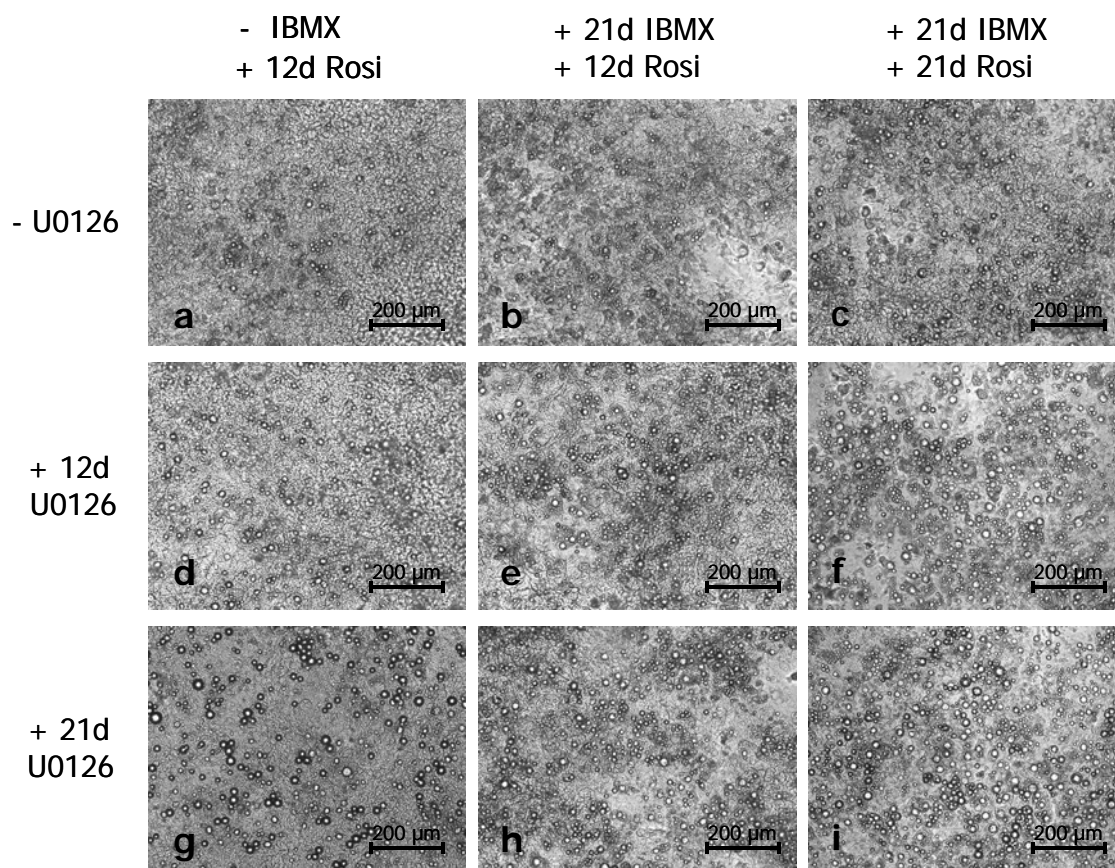
Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R: Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* (2004) 306: 1383-6

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* (2002) 13: 4279-95

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* (2001) 7(2): 211-28

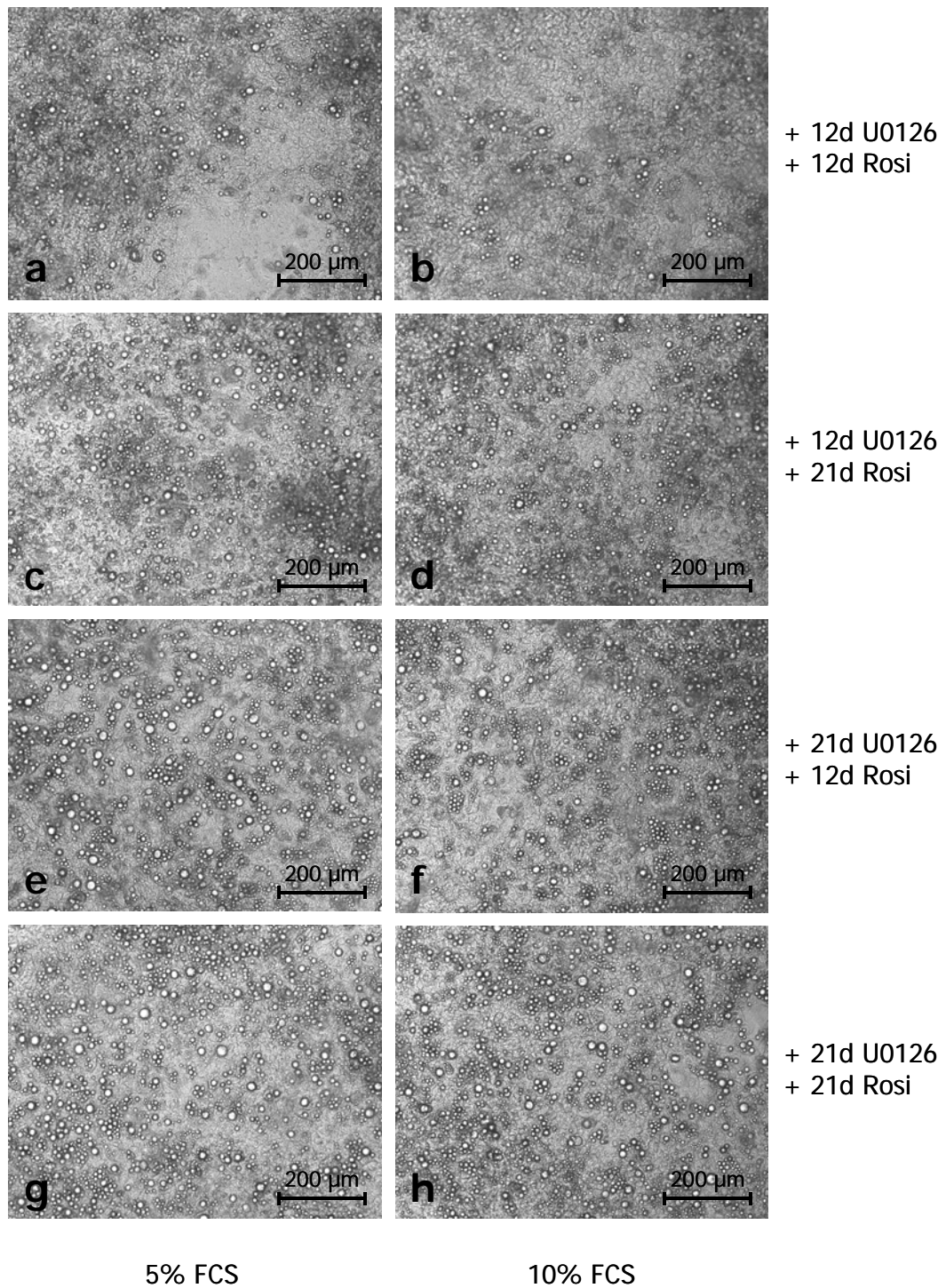


## Anhang



**Anhang Abbildung 1: Vergleich des Zellbildes an Tag 21 nach Verwendung unterschiedlicher Kombinationen von Differenzierungszusätzen**

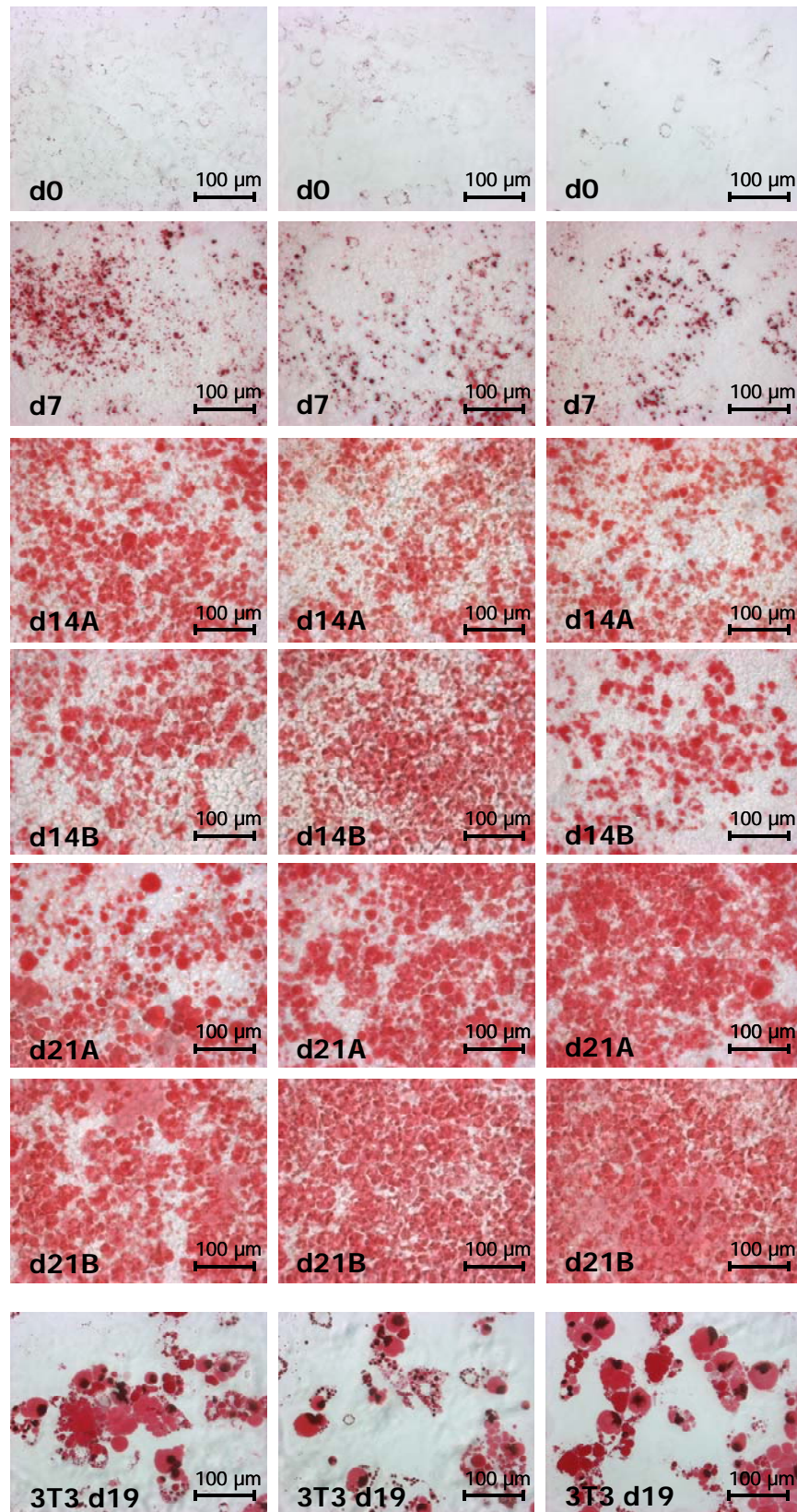
Die Aufnahmen wurden mit Dic-Optik 5-14 in 100facher Vergrößerung aufgenommen. Die Differenzierung erfolgte mit allen Differenzierungszusätzen über 21 Tage. Davon wurden variiert: ohne IBMX, mit 1 µM Rosiglitazon bis einschließlich Tag 12 (a, d, g); mit 450 µM IBMX, mit 1 µM Rosiglitazon bis einschließlich Tag 12 (b, e, h); mit 450 µM IBMX, mit 1 µM Rosiglitazon bis einschließlich Tag 21 (c, f, i); ohne den MEK-Inhibitor U0126 (a - c); mit 1 µM U0126 bis einschließlich Tag 12 (d - f); mit 1 µM U0126 bis einschließlich Tag 21 (g - i). Abkürzungen: d = Tag, IBMX = Isobuthylmethylxanthin, Rosi = Rosiglitazon.



**Anhang Abbildung 2a: Vergleich des Zellbildes an Tag 21 nach Verwendung unterschiedlicher Kombinationen von Differenzierungszusätzen und Serumkonzentrationen I**

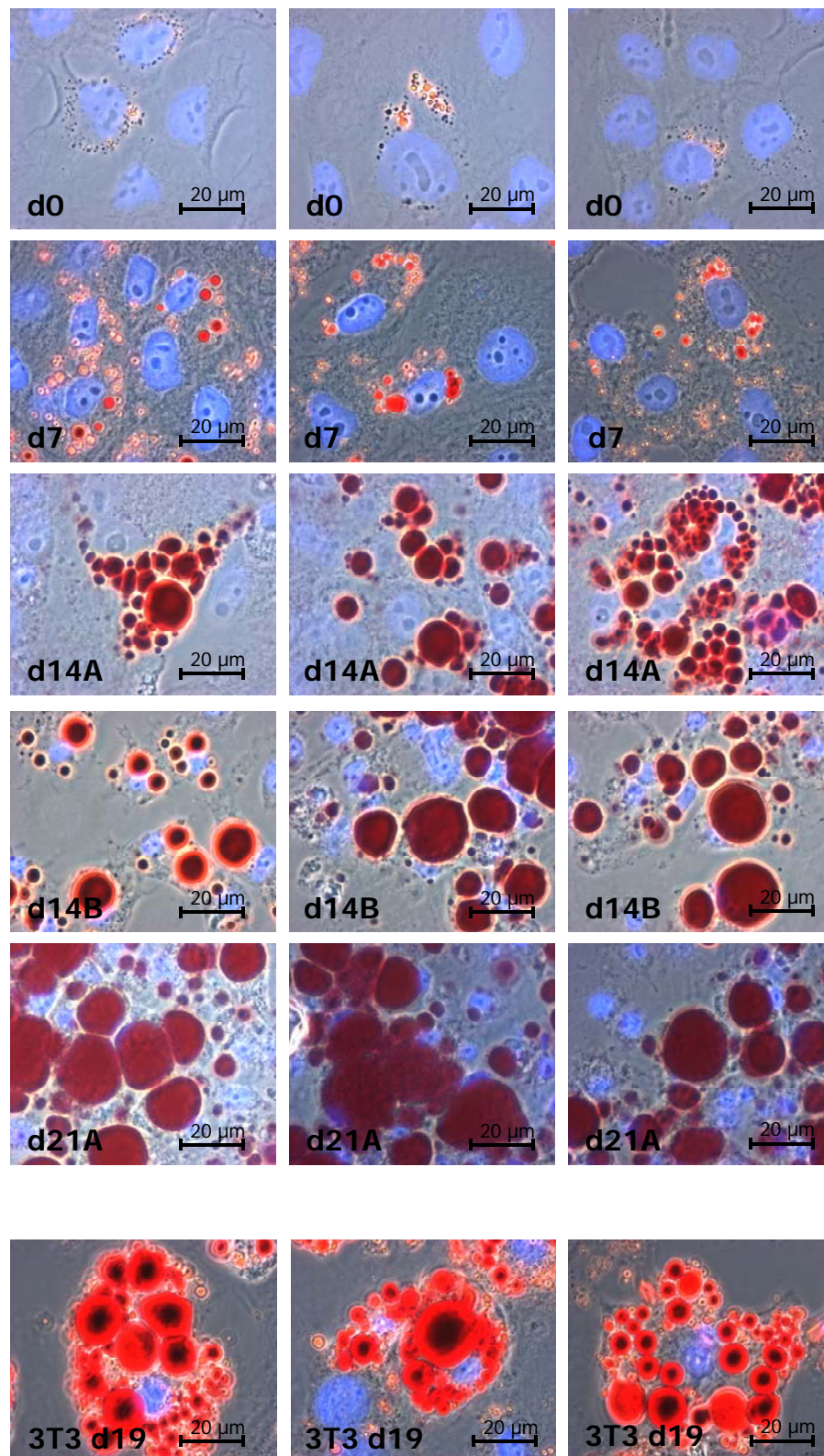
Die Aufnahmen wurden mit Dic-Optik 5-14 in 100facher Vergrößerung angefertigt. Die Differenzierung erfolgte mit allen Differenzierungszusätzen über 21 Tage. Davon wurden U0126 (1 µM) und Rosiglitazon (1 µM) verschieden kombiniert, entweder bis einschließlich Tag 12 oder bis einschließlich Tag 21 (siehe seitliche Beschriftung). Weiterhin wurde die Differenzierung in Medium mit 5% FCS (a, c, e, g) bzw. 10% FCS (b, d, f, h) verglichen. Abkürzungen: d = Tag, Rosi = Rosiglitazon.





**Anhang Abbildung 3: Vergleich des Zellbildes von hMSC-Tert Zellen und 3T3-L1 Zellen im Verlauf der Differenzierung nach Fettrotfärbung**

Die intrazellulären Neutralfette erscheinen rot. Die Aufnahmen wurden im Durchlicht in 200facher Vergrößerung angefertigt. Es sind jeweils drei Bilder pro Zeitpunkt dargestellt. Die Bezeichnung der abgebildeten Präparate erklärt sich wie folgt: d = Tag, Zahl = Tag der Differenzierung, A oder B = Differenzierung nach Protokoll A bzw. B (Protokoll B ab Tag 12 der Differenzierung ohne Rosiglitazon).



**Anhang Abbildung 4: Zellmorphologie von hMSC-Tert Zellen und 3T3-L1 Zellen im Verlauf der adipozytären Differenzierung nach Fettrot- und DAPI-Färbung**

Dargestellt sind die Zellkerne in blau (DAPI) und die Neutralfette in rot (Fettrot). Jeder Zeitpunkt ist in Freifachwerten abgebildet. Die Aufnahmen wurden im Phasenkontrast in 1000facher Vergrößerung angefertigt. Die Bezeichnung der abgebildeten Präparate erklärt sich wie folgt: d = Tag, Zahl = Tag der Differenzierung, A oder B = Differenzierung nach Protokoll A bzw. B (Protokoll B ab Tag 12 der Differenzierung ohne Rosiglitazon).

Bezeichnung	Protein	theoretischer pI	theoretisches MG [kDa]	Funktion
Acetyl-CoA Acyl TF2	Acetyl-CoA Acyl-Transferase 2	9,0	42,5	Enzym im Fettsäurestoffwechsel
Aktin	β-Aktin	5,3	42,0	Strukturprotein des Zytoskeletts
ATP Synthase b	ATP Synthase β-Untereinheit	5,3	56,5	Enzym im Energiestoffwechsel
Dienoyl-CoA Isomerase	Dienoyl-CoA Isomerase	6,6	36,3	Enzym im Fettsäurestoffwechsel
Enolase	Enolase 1	7,0	47,5	Enzym im Glukosestoffwechsel
HSP70 5	Heat Shock 70 kDa 5	5,1	72,4	Chaperon
HSP70 9B	Heat Shock 70 kDa 9B	6,0	74,1	Chaperon
Hydroxyacyl-CoA DH	Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase II	8,0	27,1	Enzym im Fettsäurestoffwechsel
Malat DH	Malat Dehydrogenase	9,4	36,0	Enzym im Energiestoffwechsel
Mn Superoxid Dismutase	Mangan-haltige Superoxid Dismutase	6,9	23,7	Reduktion von Sauerstoffradikalen
PDI	Protein Disulfid Isomerase	6,1	57,2	beteiligt am Umbau von Disulfidbrücken
Prohibitin	Prohibitin	5,6	29,8	antiproliferatives Protein
Vimentin	Vimentin	5,1	53,7	Strukturprotein

### Anhang Tabelle 1: Zusammenstellung mittels MALDI identifizierter Proteine

Das Zelllysate undifferenzierter hMSC-Tert Zellen wurde in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und eine Auswahl Coomassie-gefärbter Proteinpunkte ausgestochen. Das in diesen Gelpunkten befindliche Protein wurde tryptisch verdaut, extrahiert und im MALDI-ToF ein Massenspektrum des entstandenen Peptidgemisches erstellt. Durch den Abgleich des Peptid-Fingerabdrucks in einer Datenbank wurden die Proteine identifiziert.

---

## Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank geht

an Prof. Beisiegel und Jörg Heeren für die Hilfe, Unterstützung und Ermutigung in den letzten Jahren...

an Prof. Wiese für die Übernahme der schriftlichen Zweitbegutachtung...

an Sandra Ehret für die unermüdliche Hilfe und die vielen gemeinsamen, fröhlichen Stunden im Labor...

an meine Mitdoktoranden für die hilfreichen Diskussionen und die tolle Kollegialität...

und an alle im Institut für die große & kleine Hilfe und die nette Atmosphäre, in der das Arbeiten wirklich viel Spaß macht!