

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:
Molekulare Zellbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. U. Beisiegel

Regulation der Adipozytokinsekretion in humanen Adipozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kjell Stütze
aus Hamburg

Hamburg
2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 13.01.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. J. Heeren
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. F.-U. Beil
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. H. Schmale

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Metabolisches Syndrom	1
1.2 Diabetes Mellitus.....	2
1.3 Insulinresistenz.....	3
1.3.1 Insulinsignaltransduktion.....	3
1.3.2 Glukosetransporter 4.....	4
1.4 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenzentstehung.....	4
1.4.1 Chronische Entzündung	4
1.4.2 Stresskinasen	5
1.4.3 Toll-like Receptor 4	7
1.5 Adipozytokine	8
1.5.1 RBP4	8
1.5.2 IL-6	14
1.5.3 MCP-1.....	15
1.5.4 Adiponektin	16
1.6 Zellmodell	17
1.7 Fragestellung.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Geräte.....	20
2.2 Chemikalien.....	20
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.4 Adipozytäre Differenzierung	20
2.5 Inkubation der hMSC-Tert-Adipozyten	23
2.5.1 Liposomen.....	23
2.5.1.1 Lipidextraktion aus hyperlipämischem Plasma	24
2.5.1.2 Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden	24
2.5.1.3 Herstellung von Liposomen.....	25
2.5.1.4 Herstellung von Liposomen mit Retinol-Palmitat.....	26
2.5.2 Inkubation der differenzierten Zellen	26
2.5.2.1 VLDL	27
2.5.2.2 Liposomen mit und ohne Retinol-Palmitat	28
2.5.2.3 Lipoproteinlipase	28
2.5.2.4 Tetrahydrolipstatin	28
2.5.2.5 TNF- α	28
2.5.2.6 Gliotoxin	28
2.5.2.7 InSolution NF- κ B Activation Inhibitor	29
2.5.2.8 LPS	29
2.5.3 Versuchsdurchführung.....	29
2.6 Herstellung eines Gesamtzelllysats	30
2.7 Proteinbestimmung des Zelllysats im SDS-Lowry	30
2.8 Untersuchungen auf RNA Ebene	31
2.8.1 Isolierung von mRNA	31
2.8.2 Schreiben von cDNA.....	32
2.8.3 TaqMan Real Time PCR Analyse.....	33

2.9	Sekretionsmessung im Zellkulturüberstand	34
2.9.1	Bestimmung von RBP4	34
2.9.2	DuoSet ELISA	35
2.9.2.1	Bestimmung von IL-6	36
2.9.2.2	Bestimmung von MCP-1	36
2.9.2.3	Bestimmung von Adiponektin	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	RBP4.....	38
3.1.1	Differenzierungsabhängige RBP4-Expression	38
3.1.2	Differenzierungsabhängige RBP4-Sekretion	39
3.1.3	Inkubation mit VLDL	40
3.1.4	Inkubation mit Liposomen und Retinol-Palmitat	42
3.1.5	Inkubation der Liposomen mit Lipoproteinlipase	44
3.2	IL-6, MCP-1 und Adiponektin.....	46
3.2.1	Fettsäureabhängige Sekretion der Adipozytokine	46
3.2.2	Inhibition des NF- κ B-Signalweges.....	48
3.2.3	Aktivierung des TLR4	53
4	Diskussion.....	56
4.1	RBP4.....	56
4.2	IL-6, MCP-1 und Adiponektin.....	59
5	Zusammenfassung	63
	Abbildungsverzeichnis	64
	Literaturverzeichnis	65
	Danksagung.....	81
	Erklärung	82

Abkürzungsverzeichnis

ABCA-1	ATP-Binding Cassette Transporter A1
Adipoq	Adiponektin
AdipoR1/2	Adiponektin Rezeptor 1/2
Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
c/EBP β	CCAAT/Enhancer Binding Protein β
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CCL2	CC Ligand 2
CCR2/4	CC Rezeptor 2/4
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
CR	Chylomikronen-Remnants
CRBP	Zelluläres Retinol Binding Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FS	Fettsäuren
g	Gravitationsbeschleunigung
GLUT4	Glukosetransporter 4
Gp130/330	Glykoprotein 130/330 kDa
HDL	High Density Lipoprotein
HMW	High Molecular Weight Adiponektin
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
I κ B	inhibitorisches κ B-Protein
IDF	International Diabetes Federation
IKK	I κ B-Kinase
IL-1/6	Interleukin-1/6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IRS-1/2	Insulinrezeptor Substrat-1/2
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
KBr	Kalium-Bromid
kDa	kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LMW	Low Molecular Weight Adiponektin
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
LRAT	Lecithin:Retinol Acyl Transferase
LRP1/2	LDL-Receptor Related Protein 1/2

MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK1/2	MAPK Kinase 1/2
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MMW	Middle Molecular Weight Adiponektin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF- κ B	Nuklärer Faktor- κ B
p.a.	Pro analysi
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEP-CK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
RA	Retinsäure
RAR	Retinol Acid Receptor (Retinsäurerezeptor)
RBP4	Retinol Binding Protein 4
RE	Retinyl-Ester
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
RXR	Retinol X Receptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6 Rezeptor
SOCS	Suppressors of Cytokine Signaling
SR-B1	Scavenger Receptor-B1
STRA6	Stimulated by Retinoic Acid 6
TBP	TATA binding protein
THL	Tetrahydrolipstatin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TLR2/4	Toll-like Receptor 2/4
Tris	tris-(Hydroxomethyl)aminomethan
TTR	Transthyretin
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Metabolisches Syndrom

Als *Metabolisches Syndrom* wird ein Komplex an Symptomen bezeichnet, die stark miteinander korrelieren. Die Grundlage dieses Syndroms ist Übergewicht, das auf einer erhöhten Kalorienzufuhr beruht [Renz-Polster, 2004]. Weltweit sind mindestens 1,1 Milliarden Personen der erwachsenen Bevölkerung übergewichtig. Von diesen sind 400 Millionen, mit einem Body Mass Index (BMI) größer 30 kg/m^2 , adipös [Gregor & Hotamisligil, 2007]. Auch Kinder und Jugendliche sind vermehrt von Übergewicht und den damit assoziierten Begleiterkrankungen betroffen [Singhal et al., 2007]. Eine eindeutige und international anerkannte Definition für das *Metabolische Syndrom* existiert nicht. Unterschiedliche Gesellschaften wie die *World Health Organisation* (WHO) und die *International Diabetes Federation* (IDF) haben Definitionen entwickelt, die alle folgende Symptome in verschiedener Gewichtung enthalten: Als Hauptbestandteile werden, mit einer gestörten Glukosetoleranz und Typ 2 Diabetes, Störungen des Glukosestoffwechsels und mit erhöhten nüchtern Triglyzeriden $>150 \text{ mg/dL}$ und vermindertem HDL-Cholesterin $<40 \text{ mg/dL}$ bei Männern und $<50 \text{ mg/dL}$ bei Frauen Störungen des Lipidstoffwechsels angegeben. Des Weiteren zählen Übergewicht bis zur Adipositas und Bluthochdruck $>130/85 \text{ mmHg}$ dazu. Teilweise wird auch die Mikroalbuminämie aufgeführt, was eine Folge von Vaskulopathien ist und primär als Späterscheinung beim Typ 2 Diabetes auftritt [Batsis et al., 2007]. Neben der Tatsache, dass dieser Komplex für die Patienten symptomarm verläuft und von diesen häufig nicht als Erkrankung angesehen wird, sind die daraus resultierenden Krankheiten umso gravierender. Durch die Lipidstoffwechselstörung, den erhöhten Blutdruck und die erhöhten Blutzuckerwerte kommt es zu atherosklerotischen Gefäßschäden. Diese führen langfristig zu Gefäßstenosen und Gefäßverschlüssen, die sich in Insulten der versorgten Gebiete zeigen [Lusis, 2000].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Entstehungsmechanismen der Insulinresistenz, als Auslöser des Typ 2 Diabetes.

1.2 Diabetes Mellitus

Der Diabetes Mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung des Kohlenhydratstoffwechsels, die auf einem absoluten oder relativen Insulinmangel beruht und mit pathologisch erhöhten Blutzuckerwerten einhergeht. Spätfolgen dieser Erkrankung sind unter anderem Schäden an Blutgefäßen und Schäden im Nervensystem [Herold, 2006]. Der Diabetes Mellitus wird in 4 Typen unterteilt. Der Typ 1 Diabetes beruht auf einer viralen, immunologischen oder idiopathischen Zerstörung der β -Zellen des Pankreas, welche das Insulin in Abhängigkeit vom Blutzucker sezernieren. Somit kommt es zu einem absoluten Insulinmangel und Insulin muss subkutan substituiert werden. Der Typ 2 Diabetes ist die weitaus häufigste Variante und beruht auf einer Insulinresistenz der peripheren Gewebe, wodurch es dort, trotz erhöhter Insulinspiegel, zu keiner zellulären Weiterleitung des Insulinsignals kommt. Am seltensten ist der Typ 3 Diabetes, der auf Ursachen, wie genetischen Defekten in der β -Zell Funktion, Defekten in der Insulinwirkung, endokrinen Erkrankungen, Erkrankungen des exokrinen Pankreas oder Infektionen basiert. Als Typ 4 Diabetes wird der während der Schwangerschaft auftretende Gestationsdiabetes klassifiziert [Siegenthaler, 2005].

Diabetes Mellitus Typ 2 ist eine altersabhängige Volkskrankheit, deren Prävalenz mit dem Ausmaß der Überernährung steigt. Er ist mit 90% die häufigste Form der Zuckerkrankheiten und wird synonym Altersdiabetes genannt. Die Erkrankung beruht auf einer Störung des Kohlenhydratstoffwechsels, die zu einer chronischen Hyperglykämie mit Nüchtern-Blutzuckerwerten >126 mg/dL bzw. einem Blutzuckerwert nach zwei Stunden im oralen Glukosetoleranztest >200 mg/dL führt [Siegenthaler, 2005]. Die Pathogenese beruht darauf, dass die Gewebe weniger auf Insulin ansprechen, was zur Folge hat, dass die β -Zellen des Pankreas vermehrt Insulin ausschütten müssen, damit die Homöostase des Blutzuckers erhalten bleibt. Kommt es nun zur Erschöpfung der β -Zellen, kann der Blutzucker nicht mehr auf die Normwerte gesenkt werden. Dies führt zu einer verminderten Glukosetoleranz mit dem Endstadium des Typ 2 Diabetes [Kahn et al., 2006; Spellman, 2007].

1.3 Insulinresistenz

Als Insulinresistenz bezeichnet man die verminderte Fähigkeit peripherer Gewebe, vor allem des Fett-, Skelettmuskel- und Lebergewebes, auf normale Konzentrationen von zirkulierendem Insulin adäquat zu reagieren [Saltiel, 2000]. Im Fett- und Muskelgewebe kommt es aufgrund der verminderten Insulinwirkung zu einer geringeren Glukoseaufnahme und somit zur fehlenden Verringerung des Blutzuckers [Schmitz-Pfeiffer et al., 2000]. Die Störung der Glukoseaufnahme in die Zellen ist der erste detektierbare Defekt im Falle einer Insulinresistenz [Shepherd et al., 1999]. In der Leber führt die Insulinresistenz durch eine verstärkte Glukoneogenese dazu, dass vermehrt Glukose bereitgestellt wird. Als Ursache kann man in vielen Fällen Überernährung und Bewegungsmangel anführen. Durch Reduktion des Körpergewichtes mittels einer Kombination aus Diät und vermehrter Bewegung, kommt es zur Regression des Diabetes [Look AHEAD Research Group, 2007]. Welche Auswirkungen die Überernährung und der Bewegungsmangel jedoch auf die Einschränkung der Insulinsignaltransduktion auf molekularer Ebene haben, konnte erst teilweise geklärt werden. In den folgenden Abschnitten wird auf die Insulinsignaltransduktion, die Funktionen des Glukosetransporters 4 und die Mechanismen der Insulinresistenzentstehung eingegangen.

1.3.1 Insulinsignaltransduktion

Insulin ist für die Aufnahme von Glukose in die Zellen verantwortlich. Es beeinflusst aber auch das Wachstum der Zellen, die Differenzierung von Geweben, die Proteinbiosynthese und die Genexpression [Sesti, 2006]. Wenn Insulin seinen zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehörenden Rezeptor bindet, aktiviert er sich durch Autophosphorylierung [Youngren, 2007]. Der aktivierte Insulinrezeptor phosphoryliert das Insulinrezeptor Substrat (IRS) an Tyrosinresten und setzt die Signaltransduktion intrazellulär fort [Björnholm & Zierath, 2005]. IRS-1 kommt vor allem im Fettgewebe und im Skelettmuskel vor, IRS-2 hingegen vermehrt in der Leber und den β -Zellen des Pankreas [McCarthy & Elmendorf, 2007]. Über IRS-1/2 wird unter anderem die Phosphatidylinositol-3-Kinase aktiviert, die für die metabolischen Effekte von Insulin zuständig ist. Es werden Signalwege für die Proteinbiosynthese und die Glykogensynthese aktiviert,

außerdem wird im Skelettmuskel und im Fettgewebe die Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT4) in die Plasmamembran gefördert [Lee & White, 2004].

1.3.2 Glukosetransporter 4

Bislang wurden in der Literatur 13 Mitglieder der Glukosetransporter-Familie beschrieben, die je nach Gewebe und Funktion exprimiert werden. Der GLUT4, wird im Muskel- und Fettgewebe exprimiert und ist für die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in die Zellen zuständig [Khan et al., 2002]. Im Basalstadium befindet sich der Großteil der GLUT4-Moleküle in Endosomen, der Rest liegt in der Umgebung des Golgi-Apparates [Karylowski et al., 2004; Martin et al., 2006]. Nach dem Stimulus von Insulin an seinem Rezeptor, wird GLUT4 von seinen intrazellulären Speichern mit Hilfe des tubulovesikulären Systems zur Plasmamembran transportiert [Smith et al., 1991]. Diese Translokation ist der limitierende Schritt der insulinabhängigen Glukoseaufnahme [Saltiel, 2001]. Als Auslöser der verminderten Glukosetoleranz konnte ein verminderter Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran von Adipozyten und Myozyten identifiziert werden [Shepherd et al., 1999]. Im Mausexperiment konnte gezeigt werden, dass eine selektiv vermehrte GLUT4-Expression in Adipozyten zu einer erhöhten Glukosetoleranz und Insulinsensitivität führt, wogegen in GLUT4-knockout Mäusen, ein gegenteiliger Effekt erzeugt werden konnte [Shepherd et al., 1993].

1.4 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenzentstehung

Die Entstehungsmechanismen der Insulinresistenz werden zurzeit intensiv untersucht. Dass das Fettgewebe als endokrines Organ maßgeblich an der Entstehung beteiligt ist, wurde erstmals im Jahr 1993 beschrieben [Hotamisligil, 1993]. Bis heute ist nicht vollständig geklärt, wie der Mechanismus im Detail verläuft.

1.4.1 Chronische Entzündung

Ein Modell erklärt die Entstehung dadurch, dass es durch die chronische Überernährung zur Zunahme des Lipidgehaltes und der Größe der einzelnen Adipozyten kommt. Dies führt zur veränderten Sekretion der

vom Fettgewebe ausgeschütteten Hormone, den Adipozytokinen [Wellen & Hotamisligil, 2003]. Auf die für diese Arbeit relevanten Adipozytokine wird unter 1.6 eingegangen. An dieser Stelle soll lediglich darauf hingewiesen werden, dass das Fettgewebe proinflammatorische, also entzündungsfördernde Adipozytokine, wie das Interleukin-6 (IL-6) und das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), sowie antiinflammatorische, entzündungshemmende Adipozytokine, wie das Adiponektin, sekretiert [Kershaw and Flier, 2004]. Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Adipozytokine und vor allem durch das MCP-1 kommt es im Fettgewebe zur Akkumulation von Makrophagen, welche eine geringgradige, chronische Entzündung herbeiführen [Bouloumié et al., 2005; Wellen & Hotamisligil, 2003]. Diese chronische Entzündung, die zur Aktivierung von Stresskinasen in den Adipozyten führt, wird als wichtiger Auslöser der Insulinresistenz gesehen [Xu et al., 2003].

1.4.2 Stresskinasen

Der Mechanismus, der bei Adipositas zur Insulinresistenz führt, wird als *stress-signaling* bezeichnet [Shoelson et al., 2006]. Die Stresskinasen c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) und I κ B-Kinase (IKK) werden durch inflammatorische Zytokine und oxidativen Stress in den Mitochondrien, sowie im endoplasmatischen Retikulum, der durch Hyperlipidämie und Hyperglykämie ausgelöst wird, aktiviert. Die Kinasen stören die Insulinsignaltransduktion und fördern die Expression inflammatorischer Zytokine [Wellen & Hotamisligil, 2005]. JNK, eine Serin/Threonin-Kinase, wird durch inflammatorische Stimuli, wie Tumor Nekrose Faktor-Alpha (TNF- α), und Liganden der Toll-like Rezeptoren aktiviert und fördert die Insulinresistenzentstehung in adipösen Mäusen [Tilg & Moschen, 2006]. Dies wird darauf zurückgeführt, dass JNK IRS-1 am Serin-Rest 312 phosphoryliert und somit die Tyrosinphosphorylierung der Insulinsignaltransduktion unterbindet [Hirosumi et al., 2002]. Yuan et al. identifizierten den IKK Signalweg, der den *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) aktiviert, als Mediator der TNF- α vermittelten Insulinresistenz [Yuan et al., 2001]. Wenn der IKK Komplex aktiviert wird, phosphoryliert er die inhibitorischen κ B-Proteine (I κ B), die daraufhin abgebaut werden. Im nicht aktivierten Zustand binden diese inhibitorischen Proteine NF- κ B im

Zytoplasma der Zellen [Wang et al., 2002]. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der neben weiteren proinflammatorischen Zytokinen die Genexpression von IL-6 und MCP-1 reguliert [Shoelson et al., 2007]. NF- κ B wurde auch in Zusammenhang mit der Entstehung der Insulinresistenz gebracht [Zhang et al., 2008]. Die Aktivierung von NF- κ B wird im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion benötigt und geschieht über unterschiedliche Signalwege durch Zytokine wie TNF- α , durch das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, durch oxidativen Stress oder UV-Licht [Chen et al., 2003; Wu et al., 2004] (Abbildung 1.1).

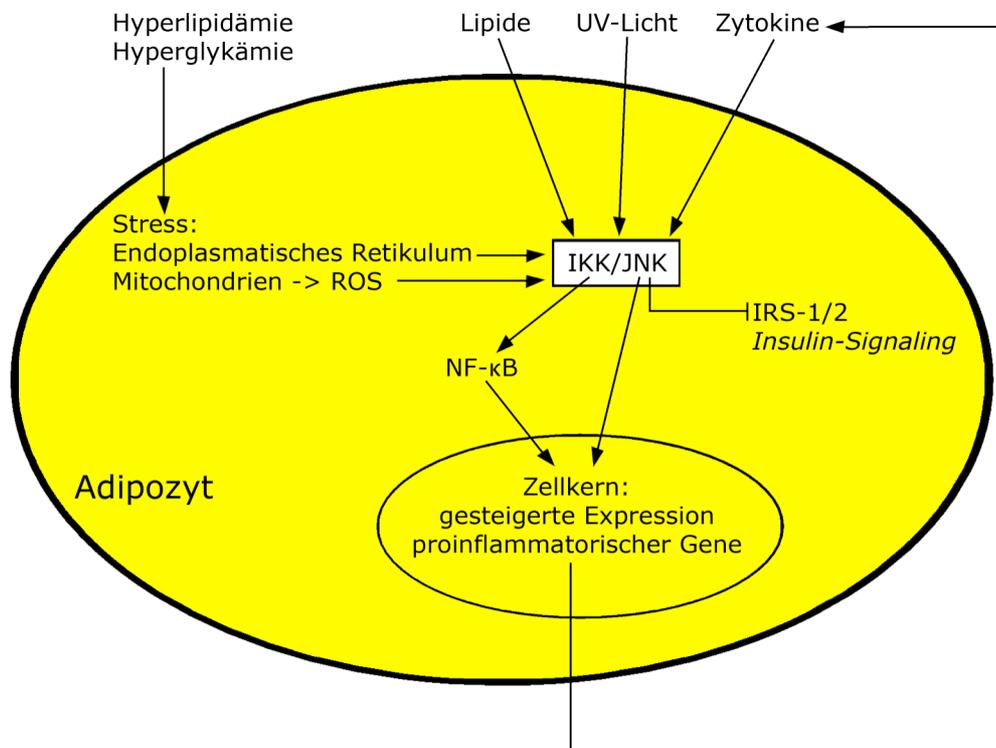


Abbildung 1.1: Überschneidungen metabolischer und entzündlicher Signalwege

Die Stresskinasen IKK und JNK werden durch unterschiedliche Reize aktiviert. Beide Signalwege aktivieren die Expression proinflammatorischer Gene, was über die gesteigerte Zytokinsekretion zu einem positiven Feedback führt. JNK hemmt direkt das *Insulin-Signaling* durch Inhibition von IRS-1/2. ROS=reaktive Sauerstoffspezies [adaptiert nach Wellen & Hotamisligil, 2005].

1.4.3 Toll-like Receptor 4

Ein Signalweg, der mit der Insulinresistenzentstehung in Verbindung gebracht wurde, beginnt beim *Toll-like Receptor 4* (TLR4) [Song et al., 2006]. Der TLR4 gehört zu der aus zehn Mitgliedern bestehenden TLR-Familie [Carpenter & O'Neill, 2007]. Entdeckt wurde dieser Rezeptortyp in der Taufliengattung *Drosophila*, wo er mit der Abwehr von Pilzinfektionen in Verbindung gebracht wurde [Lemaitre et al., 1996]. TLRs erkennen bakterielle, virale und fungale Bestandteile und vermitteln die angeborene Immunantwort [Carpenter & O'Neill, 2007]. Im Menschen werden TLRs neben dem Fettgewebe von einer Vielzahl an weiteren Geweben exprimiert [Shi et al., 2006; Takeuchi & Akira, 2001]. Der TLR4, der als erster TLR im Menschen beschrieben wurde, wird durch das LPS der Zellwand gramnegativer Bakterien aktiviert [Carpenter & O'Neill, 2007]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor auch gesättigte Fettsäuren (FS) binden kann, wodurch eine Entzündungsreaktion induziert wird [Suganami et al., 2007]. *Kiechl et al.* wiesen nach, dass Polymorphismen des TLR4 zu einer verminderten Infektabwehr führen und dies zusätzlich mit einem geringeren Risiko einhergeht an Atherosklerose zu erkranken [Kiechl et al., 2002]. Der Signalweg des TLR4 führt über mehrere Adapterproteine und aktiviert im letzten Schritt den IKK-Komplex, der wiederum NF- κ B aktiviert [Takeuchi & Akira, 2001] (Abbildung 1.2).

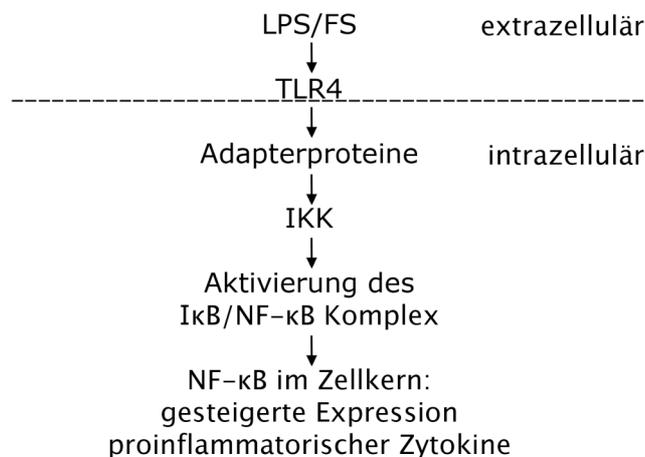


Abbildung 1.2: Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TLR4.

LPS und FS aktivieren den TLR4, welcher über mehrere Adapterproteine NF- κ B aktiviert. Dies führt zur gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine.

1.5 Adipozytokine

Die Entdeckung, dass Adipozyten TNF- α exprimieren, zeigte, dass das Fettgewebe nicht nur als Energiespeicher in Zeiten des Nahrungsüberschusses fungiert, sondern auch eine Vielzahl an lokal sowie systemisch wirkenden Botenstoffen, den so genannten Adipozytokinen sekretiert. Dies führte zu dem Konzept, dass Adipositas assoziierte, inflammatorische Prozesse die Entstehung der Insulinresistenz fördern [Hotamisligil et al., 1993; Rajala & Scherer, 2003]. Die Adipozyten sekretieren spezifische Adipozytokine wie Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin, sowie klassische Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α und MCP-1, die vor allem von Zellen des Immunsystems sekretiert werden [Guzik et al., 2006]. Die Adipozytokine sind bioaktive Mediatoren und gehen diversen regulatorischen Funktionen nach. Sie sind beispielsweise für die Regulation des Stoffwechsels der Adipozyten, für die lokale und systemische Kommunikation der Zellen, sowie für die Immunantwort des Fettgewebes zuständig [Coppack, 2001]. Durch Übergewicht kommt es dort nicht nur zu histologischen, vaskulären und metabolischen Veränderungen, sondern auch zu einer Störung des Gleichgewichtes der Adipozytokinsekretion [Coppack, 2005]. Diese Dysregulation wird als Hauptbestandteil der Insulinresistenzentstehung, des Typ 2 Diabetes und der Atherosklerose gewertet [Murdolo & Smith, 2006]. Das Übergewicht führt zu einer geringgradigen chronischen Entzündung des im Fettgewebe ansässigen angeborenen Immunsystems [Pickup, 2004]. Unterhalten wird diese Entzündungsreaktion durch die vermehrte Sekretion proinflammatorischer Adipozytokine [Wellen & Hotamisligil, 2005]. Der eine Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem erst kürzlich als Adipozytokin entdeckten Retinol Binding Protein 4 (RBP4), im anderen Teil werden die an der Entzündungsreaktion beteiligten Adipozytokine IL-6, MCP-1 und Adiponektin untersucht.

1.5.1 RBP4

Ein Protein, das erst seit kurzem zu den Adipozytokinen gezählt wird, ist das RBP4. Es wird hauptsächlich von der Leber exprimiert und sekretiert. Das Fettgewebe ist der zweitgrößte Produzent mit einem Anteil von ca. 20-40% der hepatischen Syntheserate [Tsutsumi et al., 1992]. Außerdem

kann das Fettgewebe 20% des gesamten Retinols des Körpers speichern und dieses in an RBP4 gebundener Form abgeben [Zovich et al., 1992]. Zirkulierendes RBP4 hat eine Halbwertszeit von ca. 11 Stunden, eine Größe von 21 kDa und wird renal frei filtriert. Im Plasma bilden RBP4 und Transthyretin einen Komplex, wodurch weniger RBP4 über die Nieren ausgeschieden wird. [Keil & Fiedler, 2000]. Die tubuläre Rückresorption erfolgt mittels niedrig affiner Bindung an den Megalin/gp330 Rezeptor, der auch als *LDL-Receptor Related Protein 2* (LRP2) beschrieben wurde [Christensen et al., 1999]. Als weiterer Rezeptor für RBP4 konnte bislang nur der ubiquitär vorkommende Rezeptor *Stimulated by Retinoic Acid 6* (STRA6) entdeckt werden, der die Retinolaufnahme in die Zellen vermittelt [Kawaguchi et al., 2007]. Ein Rezeptor für RBP4, der intrazellulär an eine Signalkaskade gekoppelt ist, konnte bislang nicht gefunden werden. Im Mausmodell wurde entdeckt, dass es bei der Insulinresistenz in Adipozyten selektiv zu einer verringerten Expression von GLUT4 kommt. Im Skelettmuskel wird GLUT4 zusätzlich vermindert in die Plasmamembran transloziert. Dieser Effekt ist jedoch reversibel, wenn das Gewebe *ex vivo* kultiviert wird [Björnhalm & Zierath, 2005]. *Yang et al.* identifizierten im Mausmodell die Substanz, die vom Fettgewebe sekretiert wird und den Muskel insulinresistent werden lässt, als RBP4. Sie fanden heraus, dass es zu erhöhten RBP4-Werten bei überernährten, insulinresistenten Mäusen kommt und stellten die Hypothese auf, dass RBP4 in Abhängigkeit vom intrazellulären Glukosegehalt sezerniert wird, da GLUT4 vermindert exprimiert ist. Auch exogen zugeführtes RBP4 fördert in Mäusen die Insulinresistenzentstehung [Yang et al., 2005]. Umgekehrt verschwanden die Symptome bei einer artifiziellen Verminderung der RBP4-Konzentration im Serum mittels Fenretinide, einem künstlichen Retinoid, das RBP4 aus der Bindung mit Transthyretin verdrängt [Berni et al., 1993]. Außerdem wurde beobachtet, dass das *Insulin-Signaling* durch eine um 24% verminderte Phosphorylierung von IRS-1 und einer verringerten Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase im Skelettmuskel abgeschwächt war. In der Leber kommt es durch eine vermehrte Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK) zur gesteigerten Glukoneogenese [Yang et al., 2005] (Abbildung 1.3).

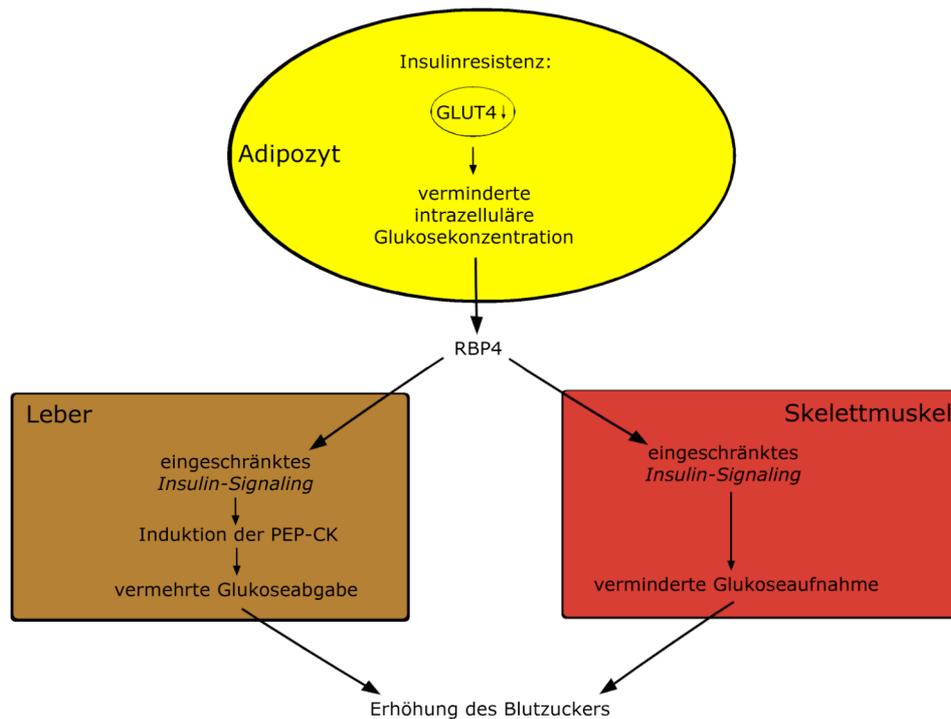


Abbildung 1.3: Adipozyten regulieren den Glukosestoffwechsel in Leber und Skelettmuskel via RBP4

In GLUT4-knockout Mäusen wird weniger Glukose in die Zelle aufgenommen und RBP4 wird vermehrt sekretiert. Es stört in der Leber und im Skelettmuskel das *Insulin-Signaling*, was in der Leber die Glukoneogenese fördert und im Muskel die Glukoseaufnahme einschränkt. Dies resultiert in der Erhöhung des Blutzuckers. PEP-CK=Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase [adaptiert nach Tamori et al., 2006].

In primären humanen Adipozyten wurde beschrieben, dass RBP4 das *Insulin-Signaling* durch verminderte IRS-1 Phosphorylierung einschränkt und es dadurch zu einer verringerten Translokation von GLUT4 in die Zellmembran kommt [Öst et al., 2007]. In epidemiologischen Studien wurde nachgewiesen, dass Übergewicht, Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes zu erhöhten RBP4-Serumwerten führen [Cho et al., 2006]. Es wurde jedoch auch beobachtet, dass RBP4 unabhängig von einem zusätzlich zur Insulinresistenz auftretendem Typ 2 Diabetes ist. Daraufhin wurde postuliert, dass RBP4 nicht glukoseabhängig sekretiert wird [Graham et al., 2006; Takebayashi et al., 2007]. Die Datenlage ist uneinheitlich und in vielen epidemiologischen Studien war RBP4 unabhängig vom Übergewicht und von Störungen des Glukosestoffwechsels [Stefan et al., 2007; Promintzer et al., 2007]. Es wurde gezeigt, dass RBP4 nicht mit der Insulinresistenz korreliert,

sondern mit Komponenten des *Metabolischen Syndroms* und dort vor allem mit Störungen im Lipoprotein- und Fettstoffwechsel [von Eynatten et al., 2007]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass RBP4 positiv mit dem Alter und der Fettverteilung zum viszeralen Fettgewebe hin korreliert, jedoch keine Korrelation mit einem Typ 2 Diabetes besteht [Gavi et al., 2007]. Es konnte keine Korrelation zum BMI festgestellt werden, dafür korrelierten die RBP4-Expression in den Adipozyten mit dem Grad der Entzündung im Fettgewebe, welcher mit MCP-1, als Entzündungsmarker, und *Cluster of Differentiation 68* (CD68), als Marker der Makrophageninfiltration, bestimmt wurde [Yao-Borengasser et al., 2007]. Es ist beschrieben worden, dass mit Reduktion der Fettmasse die RBP4-Konzentration im Serum abnimmt [Balagopal et al., 2007; Haider et al., 2007]. Dies steht im Widerspruch dazu, dass sich die RBP4-Serumwerte nicht signifikant für Probanden, die normalgewichtig, übergewichtig oder adipös sind, unterscheiden [Janke et al., 2006]. Janke et al. beschreiben jedoch auch, dass RBP4 mit GLUT4 im Fettgewebe korreliert, was das Modell von Yang et al. unterstützt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Datenlage zum RBP4 kontrovers ist und noch weiterführenden Untersuchungen bedarf. Es ist unklar, ob RBP4 selbst oder Substanzen, die es bindet, metabolisch aktiv sind. RBP4 bindet in vitro nicht nur Retinol, sondern auch andere Retinoide und lipophile Substanzen, die Einflüsse auf den Glukosestoffwechsel ausüben können [Berni et al., 1993; Yang et al., 2005]. Neben der antioxidativen Wirkung des Vitamin A [Zobali et al., 2002] wirken die Vitamin A Metabolite direkt auf den Stoffwechsel. Retinoide kontrollieren die Differenzierung von Zellen des Verdauungstraktes, des respiratorischen Systems, von der Haut, des Knochens und des zentralen Nervensystems. Sie sind auch an der Differenzierung des Immunsystems, der Immunantwort und der Hämatopoese, sowie am Wachstum, der embryonalen Entwicklung und der Fruchtbarkeit beteiligt [Napoli, 1999]. All-Trans Retinsäure und 9-cis Retinsäure binden im Zellkern an den *Retinoid X Receptor* (RXR) und den *Retinoid Acid Receptor* (RAR). Von diesen gibt es verschiedene Isoformen, die die unterschiedlichen Funktionen vermitteln [Chambon et al., 1996]. RAR, *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (PPAR) und der Thyroid-Rezeptor formen Dimere mit RXR, was die Transkription bestimmter Gene

in Gang setzt. Durch die Assoziation von PPAR- γ mit RXR fördert ein RXR Stimulus die adipozytäre Differenzierung von Stammzellen. All-Trans Retinsäure als Ligand für RAR hingegen hemmt dies [Villaroya et al. 2004]. Retinaldehyd, kurz Retinal, wirkt protektiv in Bezug auf die Insulinresistenzentstehung und hemmt die Adipogenese [Ziouzenkova et al., 2007]. Dies geschieht über die Inhibition des PPAR- γ :RXR Dimers, das niedrig affin gebunden wird [Desvergne, 2007]. Nicht nur die pharmakologische PPAR- γ Aktivierung wirkt antidiabetisch [Kersten et al., 2000], derselbe Effekt wird auch durch die Inhibierung des PPAR- γ :RXR Komplexes erzielt [Yamauchi et al., 2001]. Die Retinoide wirken sich aber nicht nur positiv auf den Stoffwechsel aus. Die Aknetherapie mit 13-cis Retinsäure führt zu einer Erhöhung der Plasmatriglyzeride, sowie zu einer verminderten Insulinsensitivität der Gewebe [Koistinen et al., 2001; Rodondi et al., 2002]. Vitamin A wird in Form der pflanzlichen Vitamin A Vorstufen, den Carotenoiden, und als Retinol im Darm aufgenommen [van het Hof et al., 2000]. In den Enterozyten werden die Carotenoide zu Retinol verstoffwechselt [Li & Tso, 2003] oder sie werden, in Chylomikronen verpackt, in die Lymphe sekretiert [During & Harrison, 2007]. Die vor allem in tierischen Produkten, wie Leber, vorkommenden Retinyl-Ester müssen im Darm mittels pankreatischer Hydrolasen hydrolysiert werden, damit sie aufgenommen werden können. Das Retinol wird einerseits unspezifisch, rezeptorvermittelt aufgenommen, andererseits diffundiert es in die Enterozyten. Eine enge Verbindung besteht zum Lipidtransport, da es über den Fettsäuretransporter CD36, den Cholesterintransporter *ATP-Binding Cassette Transporter A1* (ABCA-1) und über den *Scavenger Receptor-B1* (SR-B1) aufgenommen wird [Harrison et al., 2005]. Im Enterozyten angekommen, wird das Retinol mittels der Lecithin:Retinol Acyl Transferase (LRAT) verestert und in Chylomikronen in die Lymphe sezerniert [Li & Tso, 2003]. Das als Retinyl-Ester in die Lymphe gelangte Vitamin A wird in der Peripherie, unter anderem von Adipozyten mit Hilfe der Lipoproteinlipase, hydrolysiert und aufgenommen [Blaner et al., 1994]. Da nur ein Teil der Retinyl-Ester aufgenommen wird, gelangt der Rest mit den im selben Prozess entstehenden Chylomikronen-Remnants zur Leber, wo sie metabolisiert

werden. In den Hepatozyten wird das Retinol mit RBP assoziiert, in den Disse-Raum sekretiert und in den Ito-Zellen gespeichert [Villarroya et al., 2004]. Bei Bedarf wird der RBP-Retinol-Komplex sekretiert, bindet im Plasma Transthyretin (TTR) und wird in der Peripherie aufgenommen. Die Leber sekretiert *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), das zuerst kein Vitamin A enthält und im Plasma Retinyl-Ester von Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants aufnimmt [Demacker et al., 2000]. Diese werden in der Peripherie hydrolysiert und kehren als *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL) zurück. Auch Albumin besitzt eine Bindungskapazität für Retinol und Retinsäure [N'Soukpoé-Kossi et al., 2007]. Das aufgenommene Retinol wird in den Zielgeweben zu Retinal, All-Trans Retinsäure und 9-cis Retinsäure verstoffwechselt, die die biologisch aktiven Formen des Vitamin A sind (Abbildung 1.5).

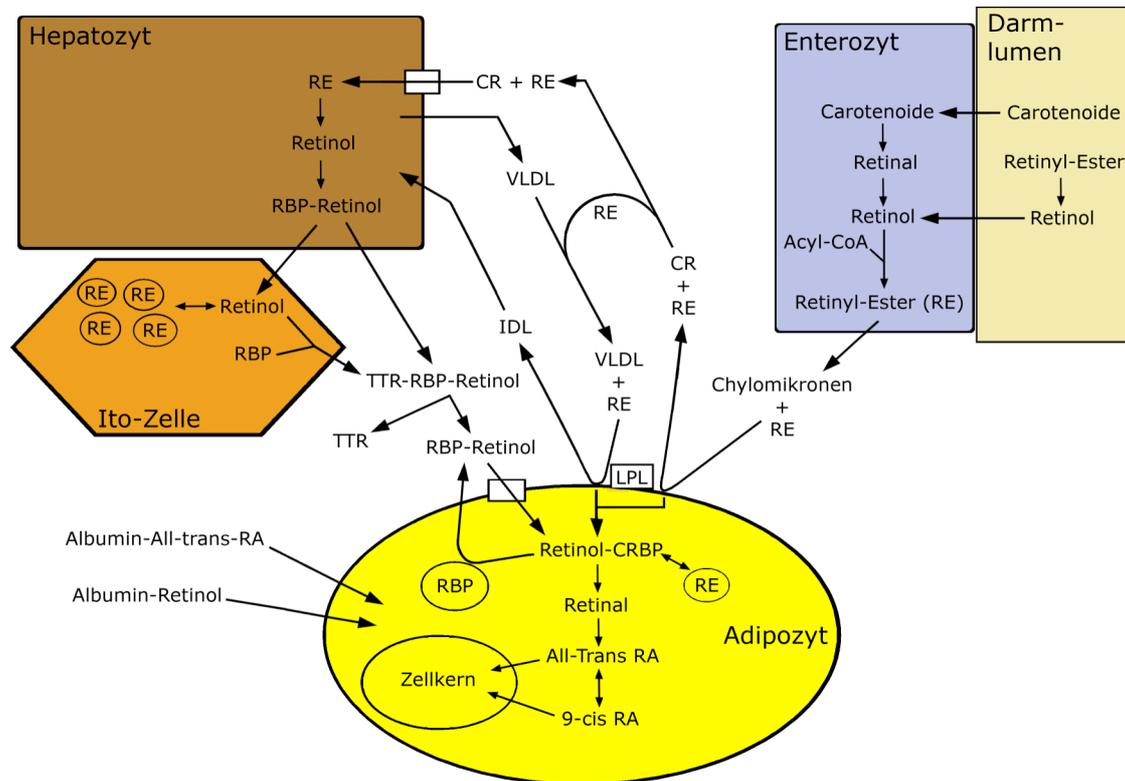


Abbildung 1.4: Transport und Speicherung von Vitamin A

Retinyl-Ester und Carotenoide werden von den Enterozyten aufgenommen und in Chylomikronen in die Peripherie transportiert. Im Plasma kommt es zu Interaktionen zwischen den Lipoproteinen, wodurch die Retinyl-Ester an VLDL abgegeben werden. Für Einzelheiten siehe Text. CR=Chylomikronen-Remnants, CRBP=zelluläres Retinol Binding Protein, IDL=Intermediate Density Lipoprotein, LPL=Lipoproteinlipase, RA=Retinsäure, RE=Retinyl-Ester, TTR=Transthyretin, [adaptiert nach Villarroya et al., 2004].

Die beim *Metabolischen Syndrom* gesteigert vorkommenden Lipoproteine im Plasma transportierten vermehrt Retinyl-Ester bei gleich bleibender Gesamtmenge an Vitamin A [Wako et al., 1986]. Obwohl die Grundlage für das *Metabolische Syndrom* und den Typ 2 Diabetes Überernährung ist, geht diese Erkrankung auch mit Mängeln einher. Der Status an antioxidativen Substanzen ist bei adipösen Menschen häufig schlecht, da sie zum Einen durch den erhöhten oxidativen Stress verbraucht und sie zum Anderen aufgrund mangelhafter Ernährung nicht adäquat substituiert werden [Ford et al., 2003].

1.5.2 IL-6

IL-6 gehört zur gp130 Zytokinfamilie, die dadurch definiert ist, dass gp130 mindestens eine Untereinheit des Rezeptorkomplexes bindet [Jones & Rose-John, 2002]. Gp130 bindet den membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R), sowie eine lösliche, in vielen Körperflüssigkeiten vorkommende, Form des IL-6-Rezeptors (sIL-6R), die durch alternatives Spleißen der mRNA, sowie durch proteolytisches Kürzen des Rezeptors entsteht [Jones, 2005]. Im Gegensatz zu gp130, welches ubiquitär exprimiert wird, ist der membrangebundene IL-6R nur auf Hepatozyten und auf einigen Leukozyten vorzufinden. Durch die Bindung des IL-6/sIL-6R-Komplexes an gp130 können auch ansonsten unempfindliche Zielzellen stimuliert werden [Scheller et al., 2006]. IL-6 begünstigt das inflammatorische Geschehen durch Aktivierung von T-Zellen, Differenzierung von B-Zellen und durch Induktion der Sekretion von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten. Es wirkt aber auch dadurch antiinflammatorisch, dass es die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α herab reguliert [Jones et al., 2001]. In akuten Entzündungen sekretieren Leukozyten sIL-6R, wodurch eine veränderte Sekretion chemotaktischer Faktoren ausgelöst wird und sie dadurch den Wechsel von neutrophilen zu mononukleären Leukozyten koordinieren [Hurst et al., 2001; McLoughlin et al., 2004]. Über sIL-6R werden nicht nur inflammatorische Prozesse reguliert, sondern auch die Proliferation und die Differenzierung von Geweben [Jones & Rose-John, 2002]. IL-6 wird von unterschiedlichen Zelltypen sekretiert, wobei 30-35% des zirkulierenden IL-6 vom Fettgewebe stammen [Alexandraki et al., 2006]. Dies erklärt, die

Korrelation der IL-6-Serumwerte mit dem Übergewicht, was auf die Fettmasse zurückzuführen ist [Carey et al., 2004]. Das vom Fettgewebe sekretierte IL-6 stammt vor allem aus den Adipozyten und nicht aus den dort ansässigen Makrophagen [Weisberg et al., 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass die zirkulierenden IL-6-Level positiv mit der Insulinresistenz und einer eingeschränkten Glukosetoleranz korrelieren [Fernández-Real & Ricart, 2003] und dass erhöhte IL-6-Serumwerte zu einem gesteigerten Risiko führen, an Typ 2 Diabetes zu erkranken [Spranger et al., 2003]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass IL-6 den Glukosestoffwechsel in Muskelzellen, Adipozyten, Hepatozyten, neuroendokrinen Zellen und pankreatischen β -Zellen direkt und indirekt beeinflusst [Kristiansen & Mandrup-Poulsen, 2005]. IL-6 fördert jedoch auch die Expression von *suppressors of cytokine signaling* (SOCS), die eine antiinflammatorische Wirkung besitzen. Erhöhte IL-6-Serumwerte werden daher als Gegenregulationsmaßnahme der geringgradigen, systemischen Entzündungsreaktion gewertet, was die komplexen und bisher ungeklärten Funktionen veranschaulicht [Kristiansen & Mandrup-Poulsen, 2005].

1.5.3 MCP-1

MCP-1 gehört zur Gruppe der Chemokine. Chemokine werden vor allem im entzündeten Gewebe ausgeschüttet und haben je nach Chemokin und Rezeptorkonfiguration der Zielzellen unterschiedliche Funktionen. Die Chemokine unterstützen die Migration von Leukozyten durch das Endothel, indem sie das für die Bindung essentielle Integrin aktivieren [Tanaka et al., 1993]. Chemotaktisch wirken sie, indem Leukozyten, dem Konzentrationsgradienten folgend, in das Gewebe einwandern. Außerdem führen die Chemokine zur Degranulation von Leukozyten. Einige Chemokine fördern die Angiogenese, andere inhibieren diese [Mackay, 2001]. Die über 40 identifizierten Chemokine werden gemäß der Anordnung von Cysteinresten nahe dem NH_2 -Terminus in die vier Familien CC, CXC, C und CX_3C eingeteilt [Rossi & Zlotnik, 2000]. MCP-1 gehört zu den CC Chemokinen und wird auch als CC Ligand 2 (CCL2) bezeichnet, da es an den CC Rezeptor 2 (CCR2) bindet [Rollins, 1997]. Der CCR2 kommt vor allem auf T-Gedächtniszellen, Monozyten und unreifen dendritischen

Zellen vor. Er vermittelt die Migration und Chemotaxis der Leukozyten [Mackay, 2001]. MCP-1 stimuliert die Histaminausschüttung basophiler Leukozyten durch Bindung an CCR4 [Power et al., 1995]. Des Weiteren unterstützt MCP-1 die Angiogenese [Scholz et al., 2001]. An der Entstehung des Typ 2 Diabetes spielt MCP-1 eine Rolle, da es in Übergewichtigen vermehrt exprimiert wird und zur Akkumulation von Makrophagen im Fettgewebe führt [Weisberg et al., 2003; Kanda et al., 2006]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass transgene Mäuse, die MCP-1 im Fettgewebe überexprimieren, dort Makrophagen akkumulieren und insulinresistent sind [Kamei et al., 2006]. In CCR2-knockout Mäusen wurde hingegen festgestellt, dass weniger Makrophagen in das Fettgewebe rekrutiert werden, es dort zu einer verminderten Entzündungsreaktion kommt und die Mäuse trotz hochkalorischer Diät länger insulinsensibel bleiben [Weisberg et al., 2006]. In Studien konnte gezeigt werden, dass MCP-1 im Serum von Typ 2 Diabetikern erhöht ist und die CCR2-Aktivität auf ruhenden Monozyten gesteigert ist [Mine et al., 2006]. Des Weiteren wurde in epidemiologischen Studien beobachtet, dass MCP-1 positiv mit dem BMI und dem Taille-Hüfte-Verhältnis korreliert, nicht jedoch mit der Insulinsensibilität der Gewebe [Chacón et al., 2007]. MCP-1 wurde mit der Entstehung des Typ 2 Diabetes eindeutig in Verbindung gebracht und dessen Regulation stellt ein noch zu erforschendes Ziel dar.

1.5.4 Adiponektin

Adiponektin ist ein adipozytenspezifisches Plasmaprotein, das 1995 erstmalig beschrieben wurde [Scherer et al., 1995]. Ihm werden antidiabetische, antiatherogene und antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen [Trujillo & Scherer, 2005]. Die Adiponektinplasmaspiegel sind bei Übergewicht, Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes vermindert [Ukkola & Santaniemi, 2002]. Es besteht aus einer 30 kDa Grundstruktur, die Trimere bildet, welche auch als *low molecular weight* Adiponektin (LMW) bezeichnet wird. Das globuläre Adiponektin, eine Unterform des LMW, entsteht durch proteolytische Spaltung. Das LMW kann zu hexameren, dem *middle molecular weight* Adiponektin (MMW) der Größe 180 kDa assoziieren. Das MMW wiederum assembliert zum *high molecular*

weight Adiponektin (HMW), das größer als 360 kDa ist [Simons et al., 2007]. Vor allem das globuläre Adiponektin bindet den ubiquitär vorkommenden Adiponektin Rezeptor 1 (AdipoR1), der durch Inhibierung des NF- κ B-Signalweges in Makrophagen immunmodulatorisch wirkt. Der hauptsächlich in der Leber vorkommende AdipoR2 vermittelt metabolische Funktionen und wird durch unprozessiertes Adiponektin gebunden [Tsuchida et al., 2004; Tilg & Moschen, 2006; Giannessi et al., 2007]. AdipoR1 führt in der Leber zu einer verminderten Glukoneogenese und im Skelettmuskel zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation. AdipoR2 steigert den Energieverbrauch der Leber über die Aktivierung des *Uncoupling Proteins 2*, führt zu einer vermehrten Translokation von GLUT4 in die Plasmamembran und steigert die Fettsäureoxidation [Tilg & Moschen, 2006]. Eine durch Übergewicht induzierte verminderte Expression beider Rezeptoren konnte beobachtet werden und korreliert mit einer verminderten Glukosetoleranz, sowie einer gesteigerten Insulinresistenz [Yamauchi et al., 2007]. Vor allem das HMW, das die aktivste Form ist, korreliert mit der Insulinsensitivität in Mäusen und Menschen. Es wirkt direkt insulinsensitivierend auf die Leber und den Skelettmuskel und liegt bei Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes und koronaren Herzkrankheiten selektiv reduziert im Plasma vor [Pajvani et al., 2004]. Zentral stimulieren nur das LMW und MMW, da das HMW die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Sie fördern die Nahrungsaufnahme und senken den Energieverbrauch. Somit wirkt Adiponektin zentral und peripher synergistisch auf die Entstehung der Insulinresistenz, des Typ 2 Diabetes und des *metabolischen Syndroms* [Kadowaki et al., 2008].

1.6 Zellmodell

Es gibt verschiedene *in vitro* Modelle, um Prozesse an Adipozyten zu untersuchen. Primäre Adipozyten oder Präadipozyten können operativ gewonnen und zu reifen Adipozyten differenziert werden. Eine weitere Möglichkeit sind klonale Zelllinien in Form von Stammzellen oder Präadipozyten, die adipozytär differenziert werden, die den Vorteil haben, dass man nahezu unbegrenzten Zugriff auf sie hat. Die für diese Arbeit verwendeten Zellen sind eine humane mesenchymale Stammzelllinie, die als *human Mesenchymal Stem Cell-Telomerase Reverse Transcriptase 20*

(hMSC-Tert 20) bezeichnet wird [Simonsen et al., 2002]. Zur Herstellung dieser Zelllinie wurde aus Knochenmarksproben gesunder Spender die Fraktion mesenchymaler Stammzellen isoliert. Um die Zellen zu immortalisieren und dadurch eine stabile Zelllinie zu etablieren, wurde mittels eines retroviralen Vektors die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT) in die Zellen eingeführt. Die Zellen haben einen normalen Karyotyp, proliferieren ohne Alterserscheinungen und weisen ein kontinuierliches Potential zur Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Endothelzellen auf [Abdallah et al., 2005]. Nach subkutaner Injektion der Zellen in immunodefiziente Mäuse konnte eine vermehrte Knochenbildung festgestellt werden, ohne dass sich Tumoren bildeten, was einen Rückschluss auf den Erhalt ihrer natürlichen Funktion zulässt [Bentzon et al., 2005]. Die hMSC-Tert stellen eine stabile Zelllinie auf gesundem humanen Hintergrund dar, aus welchen von *Prawitt et al.* ein humanes Adipozytenmodell mit ähnlicher Morphologie und Funktionalität primärer, humaner Adipozyten etabliert wurde [Prawitt et al., 2008]. Für die Differenzierung sind mehrere Zusätze, mit denen die Zellen inkubiert werden, nötig. Dexamethason beeinflusst das Wachstum und die Differenzierung der Zellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors *CCAAT/enhancer binding protein β* (c/EBP β) [Wiper-Begeron et al., 2007]. Isobutylmethylxanthin (IBMX) inhibiert die cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen unspezifisch, was zu erhöhten Spiegeln an zyklischen Nukleotidmonophosphaten in den Zellen führt und somit die Differenzierung stimuliert [Elks & Manganiello, 1985]. Am effektivsten ist die Kombination von Dexamethason und IBMX. Hohe Insulinkonzentrationen stimulieren den *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) Rezeptor, welcher die adipozytäre Differenzierung stimuliert [Blüher et al., 2005]. Rosiglitazon, ein PPAR- γ Agonist, ist das zentrale Steuerglied für die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Adipozyten und wird für die Initiierung des Prozesses benötigt [Tontonoz et al., 1994]. U0126 ist ein spezifischer, nichtkompetitiver Inhibitor der mitogen aktivierten Proteinkinase Kinasen MEK1 und MEK2 [Duncia et al., 1998], welcher proliferationshemmend und somit aktivierend auf die adipozytäre Differenzierung wirkt [Hu et al., 1996; Prawitt et al., 2008]. Die Zellen

differenzieren zuverlässig und bilden die typische univakuoläre Form reifer, humaner Adipozyten. Adipozytenspezifische Marker werden während der Differenzierung vermehrt exprimiert und sind nach Entzug von Rosiglitazon stabil. Die Zellen exprimieren Lipoproteinlipase, adipozytäres *fatty acid binding protein* und Perilipin auf mRNA und Proteinebene. Außerdem wurde durch die insulinabhängige Phosphorylierung von Akt und des ribosomalen Proteins S6 nachgewiesen, dass die Zellen insulinresistent sind. Während der Differenzierung nahm die Expression von Apolipoprotein E und Lipoproteinrezeptoren, wie dem VLDL-Rezeptor und dem *low density lipoprotein receptor related protein 1* (LRP1) zu. Dies bedeutet dass die hMSC-Tert-Adipozyten auch am Lipidstoffwechsel teilnehmen. Die Adiponektinexpression hingegen ist abhängig vom PPAR- γ Stimulus und nimmt nach dem Entzug von Rosiglitazon ab [Prawitt et al., 2008]. Dieses Zellmodell ist geeignet, um die Regulation der Expression und Sekretion von Adipozytokinen und den dahinter stehenden molekularen Mechanismen auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

1.7 Fragestellung

Die Entstehung der Insulinresistenz ist multifaktoriell bedingt und setzt sich aus zellulären, inflammatorischen und metabolischen Komponenten zusammen. Das Fettgewebe als endokrines Organ exprimiert und sekretiert Adipozytokine und spielt bei der Insulinresistenzentstehung eine entscheidende Rolle. Die in dieser Arbeit untersuchten Adipozytokine RBP4, IL-6, MCP-1 und Adiponektin wurden in epidemiologischen Studien beim Menschen und in Tierstudien eindeutig mit der Entstehung der Insulinresistenz in Zusammenhang gebracht. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Mechanismen der insulinresistenzfördernden Adipozytokinsekretion in adipozytär differenzierten, humanen mesenchymalen Stammzellen zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

- ABI Prism 7900 HAT (Applied Biosystems)
- CASY Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System, Reutlingen)
- CO₂-Brutschrank CB210 (Binder, Tuttlingen)
- ELISAreader Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Bioscience, GE Healthcare, USA)
- Mikroskop Olympus CKX31
- Sterile Werkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
- T3 Thermocycler (Biometra)
- Thermomixer Compact (Eppendorf AG)
- Ultraschallbecken Sonorex (Bandelin)
- Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor SW32 (Beckman, USA)
- Zentrifuge Rotanta/TRC (Hettich)
- Zentrifuge Sigma 1-15K
- Zentrifuge Sigma 6K15

2.2 Chemikalien

Alle nicht extra benannten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, USA), Merck KGaA (Darmstadt), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) in analytischer Qualität bezogen.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von Nunc (Roskilde, Dänemark), Sarstedt (USA) und Falcon (Becton Dickinson Labware, USA) bezogen.

2.4 Adipozytäre Differenzierung

Material

- DMEM +1000 mg/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 21885-025, Invitrogen)

- DMEM +4500 mg/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 31966-021, Invitrogen)
- Foetal Bovine Serum (GIBCO 10270-106, Invitrogen)
- Penicillin-Streptomycin 10.000 units/mL (GIBCO 15140-122, Invitrogen)
- PBS – CaCl₂ –MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Trypsin-EDTA 1x (GIBCO 25300-054, Invitrogen)
- Dexamethason (D4902, Sigma)
- Insulin human 10 mg/mL (I9278, Sigma)
- Isobutylmethylxanthin IBMX (I5879, Sigma)
- Rosiglitazon (71740, Cayman)
- U0126 (662005, Calbiochem)

Zelllinie

- hMSC-Tert T20, humane mesenchymale Stammzelllinie [Simonsen et al., 2002]

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 µM Dexamethason, 450 µM Isobutylmethylxanthin (IBMX), 2 µM Insulin, 1 µM Rosiglitazon und 1µM U0126.

Stocklösungen der Differenzierungszusätze in DMSO (IBMX, U0126, Rosiglitazon) oder DMSO/Wasser (Dexamethason) wurden aliquotiert bei -20°C gelagert.

Methode

Zur adipozytären Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzellen wurde wie beschrieben vorgegangen [Prawitt et al., 2008]. Die mesenchymalen Stammzellen wurden in Kulturmedium passagiert. Für die adipozytäre Differenzierung wurden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von 150.000 Zellen/mL und 2 mL Medium pro Well in 6-Well-Platten ausgesetzt. Nach zwei Tagen, Zeitpunkt definiert als Tag 0, wenn die Zellen 80-100% konfluent waren, begann die Induktion der Differenzierung. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 2 mL

Differenzierungsmedium inkubiert. Das Medium musste dreimal pro Woche erneuert werden, dazu wurde es jedes Mal frisch mit den Differenzierungszusätzen angesetzt. Insulin wurde den Zellen an Tag 9 der Differenzierung entzogen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor das neue Differenzierungsmedium hinzu gegeben wurde. Für die 14-tägige Differenzierung der Zellen wurden diese an Tag 12, nachdem sie mit PBS gewaschen wurden, mit Standardmedium inkubiert, um die restlichen Differenzierungszusätze auszuwaschen. Die Zellen wurden an Tag 14 für 16-20 Stunden mit Zusätzen inkubiert, deren Einfluss auf die Adipozytokinsekretion untersucht werden sollte (Abbildung 2.1).

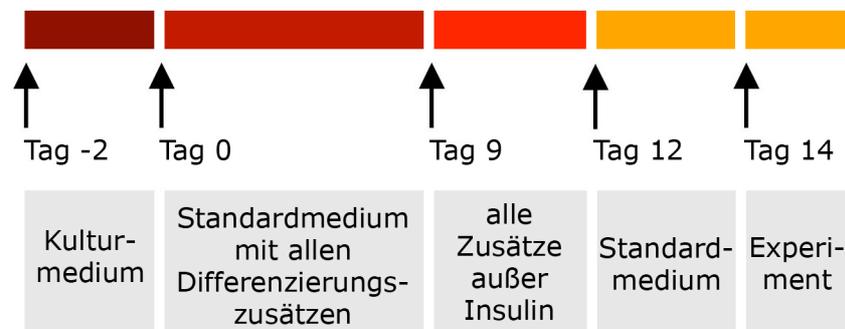


Abbildung 2.1: 14-tägige adipozytäre Differenzierung der hMSC-Tert

Die hMSC-Tert wurden in Kulturmedium ausgesetzt. An Tag 0 begann die Differenzierung der Zellen durch die Inkubation mit dem Differenzierungsmedium (für Einzelheiten siehe Text). An Tag 9 wurde Insulin abgesetzt. An Tag 12 wurden die Zellen mit Standardmedium inkubiert um die Differenzierungszusätze auszuwaschen. An Tag 14 war die Differenzierung abgeschlossen.

Für die 21-tägige Differenzierung wurde an Tag 12 zusätzlich zum Insulin auch Rosiglitazon abgesetzt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. An Tag 19 wurden die Zellen mit Standardmedium inkubiert, um die restlichen Differenzierungszusätze auszuwaschen. An Tag 21 war die Differenzierung abgeschlossen und die Zellen wurden für das Inkubationsexperiment verwendet (Abbildung 2.2).

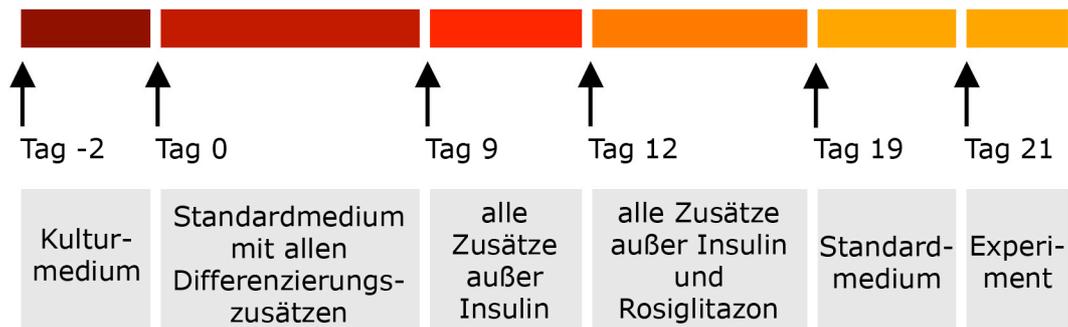


Abbildung 2.2: 21-tägige adipozytäre Differenzierung der hMSC-Tert

Die hMSC-Tert wurden in Kulturmedium ausgesetzt. An Tag 0 begann die Differenzierung der Zellen durch die Inkubation mit dem Differenzierungsmedium (für Einzelheiten siehe Text). An Tag 9 wurde Insulin abgesetzt. An Tag 12 wurde zusätzlich Rosiglitazon abgesetzt. An Tag 19 wurden die Zellen mit Standardmedium inkubiert, um die Differenzierungszusätze auszuwaschen. An Tag 21 war die Differenzierung abgeschlossen.

2.5 Inkubation der hMSC-Tert-Adipozyten

Die adipozytär differenzierten Zellen wurden mit verschiedenen Zusätzen inkubiert, deren Einflüsse auf die Sekretion der zu untersuchenden Adipozytokine getestet werden sollte. Für diese Arbeit wurde unter anderem der Effekt postprandialer Lipide auf die Adipozytokinsekretion untersucht, außerdem war die Inkubation der Zellen mit Retinol-Palmitat von Interesse. Zu diesem Zweck wurden Liposomen aus isolierten, kommerziell erwerbbaaren Lipiden, sowie aus Lipiden, die aus humanem, hyperlipämischen Plasma extrahiert wurden, synthetisiert. In Abschnitt 2.5.1 wird auf den Prozess der Synthese der Liposomen eingegangen und in Abschnitt 2.5.2 wird die Methode der Inkubation beschrieben.

2.5.1 Liposomen

Um den Effekt von Vitamin A in Form von Retinol-Palmitat und den Effekt postprandialer Lipide auf die Zellen zu untersuchen, wurden Liposomen mit und ohne Retinol-Palmitat aus Lipiden hergestellt. Als Lipide dienten zu Beginn der Arbeit solche, die aus humanem, hyperlipämischen Plasma extrahiert wurden. Diese Lipide hatten den Vorteil, dass sie eine physiologische Zusammensetzung besaßen. Im Verlauf der Experimente wurden diese Lipide durch isolierte, kommerziell erworbene ersetzt, die sich aus 80% Triolein, 10% Phosphatidylcholin, 5% Cholesterolestern und

5% Cholesterin zusammensetzten, um die Bestandteile besser zu kontrollieren und exogene Einflüsse auszuschließen.

2.5.1.1 Lipidextraktion aus hyperlipämischem Plasma

Material

- Humanes, hyperlipämisches Plasma
- KBr (Katalog Nr. 1.04905.0500, Merck KGaA)
- Zentrifugationsröhrchen (Katalog Nr. 326823, Beckman)
- PBS – CaCl₂ –MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Ultrazentrifuge mit Rotor SW32
- Zentrifuge Sigma 1-15K
- Chloroform-Methanol Gemisch (8:5 nach Gewichts-Prozent)

Methode

Das hyperlipämische Plasma musste durch Kalium-Bromid (KBr) auf eine Dichte von 1,21 g/cm³ eingestellt werden. Dazu diente folgende Formel: $x \text{ g KBr} = y \text{ mL Ausgangslösung} \times 0,3277$. In die Zentrifugationsröhrchen wurden 8 mL PBS vorgelegt, die mit 30 mL Plasma unterschichtet wurden. In der Ultrazentrifuge mit dem SW32 Rotor wurden die Zentrifugationsröhrchen eine Stunde bei 32.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es bildete sich ein dünner Lipidfilm auf der PBS-Phase, der in einem Stück abgenommen werden konnte und in PBS resuspendiert wurde. Zu 100 µL dieser Suspension wurde 1 mL eines 8:5 nach Gewichts-Prozent angesetzten Chloroform-Methanol-Gemisches zugefügt. Nach Zentrifugation in der Sigma 1-15K Zentrifuge für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C, sonderten sich die Proteine als dünnes Häutchen ab. Die gelösten Lipide wurden gesammelt und die Cholesterin-, sowie Triglyzeridkonzentration bestimmt, bevor sie bei -20°C gelagert wurden.

2.5.1.2 Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden

Material

- Precipath L (Katalog Nr. 11285874, Roche)
- Mikrotiterplatte (Nunc)
- Cholesterin-Reagenz (Katalog Nr. 11489437, Roche)
- Triglyzerid-Reagenz (Katalog Nr. 11488872, Roche)

Methode

Um die nach obigem Schema extrahierten Lipide zur Liposomenherstellung verwenden zu können, mussten die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyzeriden bestimmt werden. Als Standard diente *Precipath L*, ein käuflich erwerbbares Gemisch aus Cholesterin, Cholesterinestern und Triglyzeriden, das auf folgende Konzentrationen für Cholesterin verdünnt wurde: 15 mg/dL, 7,5 mg/dL, 3,75 mg/dL, 2,5 mg/dL, 1,25 mg/dL, 0,5 mg/dL, 0 mg/dL und auf folgende Konzentrationen für Triglyzeride: 16,5 mg/dL, 8,25 mg/dL, 4,125 mg/dL, 2,75 mg/dL, 1,375 mg/dL, 0,55 mg/dL, 0 mg/dL. Da die Lipide in einem Chloroform-Methanol-Gemisch gelöst waren, wurde 1 mL mit Stickstoff über einem 37°C warmen Wasserbad evaporiert, bis nur noch die Lipide in Form eines undurchsichtigen Belages an der Wand übrig geblieben sind. Die Lipide wurden in 1 mL PBS resuspendiert und danach 1:100 verdünnt. 100 µL des Standards bzw. der Probe wurde auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Dazu kamen 200 µL des jeweiligen Reagenzes für die Cholesterin- bzw. Triglyzeridbestimmung. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C konnte die Extinktion bei 550 nm im ELISAREADER bestimmt werden.

2.5.1.3 Herstellung von Liposomen

Material

- Lipidlösung
- Glasfläschchen/*screw cap vials, clear* (Katalog Nr. 5182-0714, Agilent Technologies)
- PBS – CaCl₂ –MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Thermomixer Compact (Eppendorf AG)
- Ultraschallbecken Sonorex (Bandelin)
- Inject Luer Lock 2 mL Solo (Katalog Nr. 4606701V, Braun)
- BD Microlance 3, 20G, 1,5", 0.9 x 40 mm (Katalog Nr. 301300, Becton Dickinson)
- Syringe Driven Filter Unit 0,45 µm, 4mm (Katalog Nr. SLHV R04NL, Millex-HV)

Methode

Zur Herstellung der Liposomen wurden 15 mg Lipid in ein 1,5 mL Glasfläschchen gegeben. Da die Lipide mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch in Lösung gehalten wurden, musste dieses mit Stickstoff über einem 37°C warmen Wasserbad evaporiert werden, bis die Flüssigkeit vollständig verdampft war und die Lipide als undurchsichtiger Belag an den Wänden des Glasfläschchens sichtbar waren. In 1,5 mL 65°C warmen PBS wurden die Lipide resuspendiert. Der folgende Schritt wurde dreimal wiederholt: Die Lösung wurde zuerst gevortext und danach in einem auf 40°C vorgeheizten Ultraschallbad für 5 Minuten sonifiziert. Nach dem dritten und letzten Sonifizieren wurde die Emulsion in einer Spritze aufgezogen und durch einen, mit PBS vorgewaschenen, Millex-HV Filter in ein neues Glasfläschchen filtriert.

2.5.1.4 Herstellung von Liposomen mit Retinol-Palmitat

Material

- Siehe 2.5.1.3
- Chloroform
- Retinol-Palmitat (Katalog Nr. R3375, Sigma-Aldrich)

Methode

Um eine 1,56 mM Endkonzentration an Retinol-Palmitat zu erhalten, wurden 52 mg Retinol-Palmitat in 1,6 mL Chloroform gelöst. Nach dem Evaporieren von 15 mg der in Chloroform-Methanol gelösten Lipide, wurden diese in Chloroform resuspendiert und mit 600 µL des Chloroform-Retinol-Palmitat-Gemisches in Lösung gegeben. Nachdem das Chloroform abermals evaporiert wurde, kamen 1,5 mL auf 65°C vorgewärmtes PBS hinzu. Es wurde weiter verfahren wie bei der unter 2.5.1.3 beschriebenen Herstellung der Liposomen.

2.5.2 Inkubation der differenzierten Zellen

Material

- DMEM +1000 mg/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 21885-025, Invitrogen)
- DMEM +4500 mg/L Glucose +GlutamaxI +Pyruvate (GIBCO 31966-021, Invitrogen)

- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Katalog Nr. D2650, Sigma-Aldrich)
- Foetal Bovine Serum (GIBCO 10270-106, Invitrogen)
- Gliotoxin, *Gladiocladium fimbriatum* (Katalog Nr. 371715, Calbiochem)
- InSolution NF- κ B Activation Inhibitor (Katalog Nr. 481407, Calbiochem)
- Lipopolysaccharid (Katalog Nr. L4516, Sigma-Aldrich)
- Lipoproteinlipase
- Liposomen (Abschnitt 2.5.1.3)
- Liposomen mit Retinol-Palmitat (Abschnitt 2.5.1.4)
- Penicillin-Streptomycin 10.000 units/mL (GIBCO 15140-122, Invitrogen)
- Recombinant Mouse Tumor Necrosis Factor-Alpha (Katalog Nr. 52624, Biomol)
- Tetrahydrolipstatin=Orlistat (Roche)
- Very Low Density Lipoprotein

Medien

- Inkubationsmedium A:
DMEM 4500 mg/L Glukose, 1% Penicillin/Streptomycin
- Inkubationsmedium B:
DMEM 1000 mg/L Glukose, 1% Penicillin/Streptomycin
- Inkubationsmedium C:
DMEM 4500 mg/L Glukose, 1,67% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

Das Inkubationsmedium A wurde für die Experimente 3.1.1 bis einschließlich 3.1.4 verwendet, das Inkubationsmedium B wurde nur für das Experiment 3.1.4 benutzt und das Inkubationsmedium C wurde für alle folgenden Experimente verwendet.

2.5.2.1 VLDL

Die VLDL wurden wie beschrieben aus humanem, hyperlipämischen Plasma durch Ultrazentrifugation isoliert [Heeren et al., 2002]. Die Präparation und Charakterisierung der Partikel wurde von der Technischen Angestellten Sandra Ehret durchgeführt. Die VLDL wurden direkt in das

Inkubationsmedium gegeben. Die Endkonzentration im Well betrug 100 µg/mL bei 2 mL Medium/Well.

2.5.2.2 Liposomen mit und ohne Retinol-Palmitat

Die Synthese der Liposomen wurde unter 2.5.1 beschrieben. Die Liposomen wurden im Inkubationsmedium emulgiert, bevor sie in einer Endkonzentration von 625 µg/mL bei 2 mL Medium/Well auf die Zellen gegeben wurden. Die Liposomen mit Retinol-Palmitat enthielten das Vitamin A in veresterter Form in einer Konzentration von 1,56 mM.

2.5.2.3 Lipoproteinlipase

Experimentell wurde untersucht, ob die Lipolyse der Liposomen Einfluss auf die Adipozytokinsekretion hat. Dazu wurde in unserem Institut bovine Lipoproteinlipase aus Kuhmilch mittels Heparinsepharose isoliert. Diese wurde zu der Emulsion, bestehend aus Liposomen und Inkubationsmedium C, in einer Konzentration von 1 µg/mL hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor 2 mL Medium/Well auf die Zellen gegeben wurden.

2.5.2.4 Tetrahydrolipstatin

Tetrahydrolipstatin (THL), ein Inhibitor der Lipoproteinlipase [Lookene et al., 1994], wurde in den jeweiligen Experimenten in einer Konzentration von 25 µg/mL in die Emulsion, bestehend aus Liposomen und Inkubationsmedium C, gegeben, bevor die Lipoproteinlipase hinzugefügt wurde. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor 2 mL Medium/Well auf die Zellen gegeben wurde.

2.5.2.5 TNF- α

Das rekombinante TNF- α wird aus dem Bakterium *Streptomyces Lividans* gewonnen. Es wurde direkt in das Inkubationsmedium gegeben. Je nach Experiment betrug die Endkonzentration 2 ng/mL oder 10 ng/mL bei 2 mL Medium/Well.

2.5.2.6 Gliotoxin

Das Peptid Gliotoxin ist ein gut charakterisierter toxischer Metabolit verschiedener, krankheitserregender Pilze. Es wurde zuerst aus dem Pilz

Gliocladium fimbriatum isoliert [Gardiner et al., 2005]. Gliotoxin inhibiert den NF- κ B-Signalweg dadurch hochselektiv, dass es die Bindung dieses Transkriptionsfaktors an die DNA verhindert. Die Zellen wurden mit 1000 ng/mL Gliotoxin bei 1 mL Medium/Well für eine Stunde inkubiert. Danach kam 1 mL Inkubationsmedium C, sowie die weiteren Zusätze in doppelter Konzentration für die 16 bis 20-stündige Inkubation hinzu. Somit wurde eine Endkonzentration von 500 ng/mL bei 2 mL Medium/Well für das Gliotoxin erreicht. Da der Inhibitor in DMSO gelöst war, wurde eine Kontrolle mit DMSO in einer 1:4000 Verdünnung (0,25 μ L DMSO/mL Inkubationsmedium) in den Experimenten mitgeführt.

2.5.2.7 InSolution NF- κ B Activation Inhibitor

Der InSolution NF- κ B Activation Inhibitor, kurz NF- κ B-Inhibitor, ist ein synthetisches 6-Aminoquinazolin-Derivat, welche die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B hochselektiv inhibiert [Tobe et al., 2003]. Der NF- κ B-Inhibitor wurde in einer 2,5 μ M Endkonzentration bei 2 mL Medium/Well eingesetzt. Die Zellen wurden, wie unter 2.5.2.6 für das Gliotoxin beschrieben, mit dieser Substanz eine Stunde, bevor die weiteren Zusätze in die Wells gegeben wurden, inkubiert. Da der Inhibitor in DMSO gelöst war, wurde eine Kontrolle mit DMSO mitgeführt.

2.5.2.8 LPS

Das LPS stammt aus dem Stamm 0127:B8 des gramnegativen Bakteriums *Escherichia Coli*. Je nach Experiment wurde LPS in einer Endkonzentration von 1 ng/mL, 10 ng/mL oder 100 ng/mL bei 2 mL Medium/Well direkt in das Inkubationsmedium gegeben.

2.5.3 Versuchsdurchführung

Nach der Inkubationszeit von 16-20 Stunden, die in allen Experimenten gleich gewesen ist, wurden die Zellkulturüberstände gesammelt. In ihnen wurden die Konzentrationen der untersuchten Adipozytokine bestimmt und am Proteingehalt der Zellen normiert (Abschnitt 2.9). In den meisten Experimenten wurden zwei Wells identisch inkubiert. Das eine Well wurde zur Herstellung eines Gesamtzelllysats für die Proteinbestimmung mittels

SDS-Lowry verwendet (Abschnitt 2.7), das anderen wurde für Untersuchungen auf RNA Ebene benutzt (Abschnitt 2.8).

2.6 Herstellung eines Gesamtzelllysats

Material

- PBS – CaCl₂ –MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Zelllysispuffer:
 - o 50 mM Tris pH 8 (Katalog Nr. 8382.2500, Merck KGaA)
 - o 2mM CaCl₂ (Katalog Nr. 2382, Merck KGaA)
 - o 80 mM NaCl (Katalog Nr. 0278, Mallinckrodt Baker)
 - o 1% Triton X-100 (Katalog Nr. 1.08603.1000, Merck KGaA)
- Zentrifuge Sigma 1-15K

Methode

Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 500 µL kaltem Zelllysispuffer lysiert. Danach wurden sie in Eppendorf-Gefäße überführt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände, in denen vor allem zytosolische Proteine und Membranproteine enthalten sind, wurden abgenommen. Das Pellet, in welchem sich Zellkerne und Mitochondrien befinden, wurde verworfen. Falls die Proben nicht gleich aufbereitet werden konnten, wurden sie bei -20°C gelagert.

2.7 Proteinbestimmung des Zelllysats im SDS-Lowry

Material

- Albumin Standard 2 mg/mL (Katalog Nr. 23209, Pierce)
- Lösung A:
 - o 2% Na₂CO₃ (Katalog Nr. 0274, Mallinckrodt Baker)
 - o 0,02% NaK-Tartrat (Katalog Nr. 8087, Merck KGaA)
 - o in 0,1 N NaOH (Katalog Nr. 0402, Mallinckrodt Baker)
- Lösung B:
 - o 0,5% CuSO₄ (Katalog Nr. 2790, Merck KGaA)
 - o 5% SDS (Katalog Nr. 20760, Serva Electrophoresis)
 - o in aqua dest.
- Lösung C: Lösung A + Lösung B (50:1)

- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Katalog Nr. 1090010500, Merck KGaA)
- Mikrotiterplatte (Nunc)
- ELISAreader

Methode

Die Proteinkonzentration aller hergestellter Proben wurde im SDS-Lowry bestimmt, einem modifizierten Protokoll der ursprünglich beschriebenen Methode [Lowry et al., 1951]. 20 μ L der Proben wurden 1:5 in 0,1 N NaOH verdünnt. 1 mL der frisch angesetzten Lösung C wurde hinzugegeben. Je ein Kupferion bildet mit mindestens zwei Peptidbindungen des Proteins einen rotvioletten Farbkomplex. Nach 10 Minuten wurden 100 μ L Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, frisch 1:1 in aqua dest. verdünnt, hinzugefügt. Dieses wird durch bestimmte Aminosäuren im Protein, vor allem von Tyrosin und Tryptophan, unterstützt vom Kupfer-Protein-Komplex, reduziert, wobei eine tiefblaue Färbung entsteht. Die Proben wurden 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Danach wurden 300 μ L je Probe pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und das Absorptionsmaximum bei 760 nm im ELISAreader gemessen. Mit Hilfe einer durch Albumin Standardlösungen ermittelten Eichgeraden wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt. Der Albumin Standard wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL und 0 mg/mL.

2.8 Untersuchungen auf RNA Ebene

2.8.1 Isolierung von mRNA

Material

- RNeasy Mini Kit (Katalog Nr. 74106, Qiagen)
- TRIzol Reagent (Katalog Nr. 15596-018, Invitrogen)
- Chloroform
- Zentrifuge Sigma 1-15K

Methode

Das RNeasy Mini Kit wurde gemäß der beiliegenden Anleitung für die Isolierung der RNA verwendet. Um die Zellen für die Präparation zu gewinnen wurde 1 mL TRIzol Reagent in jedes Well gegeben, die Zellen

lysiert und in Eppendorf-Gefäße überführt, in welche 200 µL Chloroform hinzu gegeben wurden. Nachdem die Eppendorf-Gefäße 15 Sekunden gevortext wurden, wurden sie für 15 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die ca. 800 µL oberer, klarer Überstand wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 400 µL 96%-igem Ethanol p.a. invertiert. Mit dieser Lösung wurde die Silica-Gel Membran beladen. Die weiteren Schritte, in denen die an die Silica-Gel Membran gebundene RNA aufgereinigt wurde, erfolgten gemäß der Anleitung des RNeasy Mini Kits. Anschließend wurde die RNA in RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und die Reinheit wurde mittels UV-Spektroskopie bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.8.2 Schreiben von cDNA

Material

- High Capacity cDNA Transcription Kit (Katalog Nr. 4368813, Applied Biosystems)
- T3 Thermocycler (Biometra)
- RT-Mastermix:
 - o 2,5 µL MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µL)
 - o 5 µL Reverse Transcription Buffer (10x)
 - o 2 µL dNTP-Mix (25x)
 - o 5 µL Random primers (10x)
 - o 10 U/µL RNase Inhibitor
 - o ad 25 µL Nuclease-free (DEPC-treated) H₂O

Methode

Das High Capacity cDNA Transcription Kit wurde gemäß der Anleitung zur Herstellung der komplementären cDNA durch die reverse Transkriptase aus den unter 2.7.1 isolierten RNA Proben verwendet. 1 µg RNA wurde mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 25 µL gebracht. Zu den 25 µL RNA Probe wurden 25 µL RT-Mastermix hinzu gegeben. Im Thermocycler erfolgte die cDNA Synthese unter folgenden Bedingungen: 10 Minuten bei 25°C, 120 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei 70°C.

2.8.3 TaqMan Real Time PCR Analyse

Material

- ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems)
- TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (Katalog Nr. 4324020, Applied Biosystems)
- Master Mix:
 - o 15 µL TaqMan 2x Universal PCR Master Mix
 - o 5 µL cDNA 1:5 in RNase freiem Wasser verdünnt
 - o 1,5 µL des jeweiligen Assay on Demand (AoD) (20x)
 - o ad 30 µL Nuclease-free (DEPC-treated) H₂O
- Primer: Assay on Demand (Applied Biosystems)

AoD	Assay ID	Sequenz
hRBP4	Hs00198830_m1	CAGAAAGGAAATGATGACCACTGGA
hIL6	Hs00174131_m1	TCAATGAGGAGACTTGCCTGGTGAA
hCCL2	Hs00234140_m1	TCAGCCAGATGCAATCAATGCCCA
hADIPOQ	Hs00605917_m1	AAGGAGATCCAGGTCTTATTGGTCC
hTbp_AoD	Hs00270322_m1	CAGGTAACACAGGAAGGTGAAGATG

Methode

Die TaqMan Analyse oder auch quantitative Real Time PCR ermöglicht zusätzlich zur Amplifikation die Quantifizierung der PCR-Produkte. Der Master Mix wurde, wie oben beschrieben, mit dem jeweiligen *Assay on Demand* für die zu untersuchende cDNA präpariert. Die Quantifizierung erfolgte maschinell durch das ABI Prism 7900 HT Gerät. Dies geschieht durch die Messung der Fluoreszenz, welche proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt. Die TaqMan Sonden sind an einem Ende mit einem Quencher, der die Fluoreszenz unterdrückt und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzstoff markiert. Die Taq-Polymerase, die eine Exonukleaseaktivität besitzt, baut nach der Hybridisierung mit der cDNA die TaqMan Sonde vom 5'-Ende aus ab. Die Entfernung zwischen dem Quencher und dem Reporter-Fluoreszenzstoff nimmt zu, der inhibitorische Effekt des Quenchers fällt weg und die Fluoreszenz kann bestimmt werden. Die PCR wurde mit spezifischen Primern für die untersuchten Adipozytokine RBP4 (hRBP4), IL-6 (hIL6), MCP-1 (hCCL2)

und Adiponektin (hADIPOQ) durchgeführt. Als *Housekeeper*, um die Messwerte zu normieren, wurde *TATA box binding protein* (hTbp_AoD) mitbestimmt. Die Kopienzahl der Adipozytokin RNA wurde auf 10^4 Kopien Tbp normiert. Die Untersuchungen auf RNA Ebene wurden freundlicherweise von der Technischen Angestellten Birgit Henkel und der Biologin Dorothee Lasrich durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

2.9 Sekretionsmessung im Zellkulturüberstand

In den Zellkulturüberständen wurde mittels des Verfahrens des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) die Konzentrationen der Adipozytokine RBP4, IL-6, MCP-1 und Adiponektin bestimmt.

2.9.1 Bestimmung von RBP4

Material

- Retinol Binding Protein-4 ELISA Kit (Katalog Nr. K 6110 K03, Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland)
- Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices 10k (Katalog Nr. UFC801096, Millipore)
- BSA Fraktion V Lösung 7,5 % (Gibco 15260, Invitrogen)
- Zentrifuge Sigma 6K15
- ELISAreader

Methode

Um RBP4 in den Überständen bestimmen zu können, mussten die Proben konzentriert werden. Dazu wurden die Zentrifugationsröhrchen, in die ein Filter einer Dichte von 10kD integriert ist, mit 5 mL 1%iger BSA Lösung beladen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4000g zentrifugiert. Dies diente dazu den Proteinverlust der Proben durch Bindung an den Filter zu minimieren. Die Zentrifugationsröhrchen wurden komplett entleert und mit 1,9 mL der zu konzentrierenden Proben gefüllt. Diese wurden bei Raumtemperatur mit 2500g zentrifugiert, bis sich der Inhalt auf 150-180 μ L verringert hatte. Damit die Konzentrierung der Proben gleichmäßig war, mussten anschließend die unterschiedlichen Volumina einander angepasst werden. Der ELISA wurde mit einem käuflich erwerbbaaren Kit, bei dem alle Reagenzien enthalten sind, gemäß der Anleitung durchgeführt. Die Proben wurden in einer 1:1,67 Verdünnung

aufgetragen. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte anhand von Doppelwerten.

2.9.2 DuoSet ELISA

Material

- F8 Maxisorp Loose (Katalog Nr. 469946, Nunc-Immune Module)
- Albumin Fraktion V (Katalog Nr. 1.12018.0100, Merck KGaA)
- PBS – CaCl₂ –MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Tween 20 (Bio-Rad Laboratories)
- TMB
- H₂O₂
- Substratpuffer
- 2N H₂SO₄
- Lösungen:
 - Waschpuffer: 0,05% Tween in PBS, pH 7,2-7,4
 - Probenverdünnungspuffer: 1% BSA in PBS, pH 7,2-7,4
 - Substratlösung: 25 mL aqua dest + 1 mL Substratpuffer + 1 mL H₂O₂ + 1 mL TMB
 - Stopplösung: 2N H₂SO₄
- ELISAreader

Methode

In dem jeweiligen DuoSet ELISA sind die nötigen Antikörper und der Standard enthalten. Die Durchführung erfolgte gemäß der beiliegenden Anleitung. Der vorverdünnte *Capture Antibody* wurde auf den Maxisorp Streifen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Wells mit 300 µL Probenverdünnungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Proben und der Standard wurden in der jeweiligen Verdünnung auf die Wells gegeben, die weiteren Schritte erfolgten gemäß der Anleitung. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte in Doppelwerten.

2.9.2.1 Bestimmung von IL-6**Material**

- Human IL-6 ELISA (Katalog Nr. DY206, R&D Systems, Abingdon, UK)

Methode

Siehe 2.9.2

Verdünnung	1:250							
Standard [pg/mL]	300	150	75	37,5	18,75	9,38	4,69	0

2.9.2.2 Bestimmung von MCP-1**Material**

- Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA (Katalog Nr. DY279, R&D Systems, Abingdon, UK)

Methode

Siehe 2.9.2

Verdünnung	1:25							
Standard [pg/mL]	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	0

2.9.2.3 Bestimmung von Adiponektin**Material**

- Human Adiponectin ELISA (Katalog Nr. DY1065, R&D Systems, Abingdon, UK)

Methode

Siehe 2.9.2

Verdünnung	1:100							
Standard [pg/mL]	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	0

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Im Abschnitt 3.1 wird auf die Regulation der RBP4-Transkription und -Sekretion durch VLDL, Liposomen und Retinol-Palmitat in adipozytär differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen eingegangen. Der Abschnitt 3.2 beschäftigt sich mit der Regulation und den molekularen Mechanismen der Transkription und Sekretion der Adipozytokine IL-6, MCP-1 und Adiponektin in Abhängigkeit von der Lipolyse postprandialer Lipide in hMSC-Tert-Adipozyten.

Zur Verifizierung der erfolgreichen Differenzierung wurde zunächst eine phänotypische Charakterisierung durchgeführt. Dass es während der adipozytären Differenzierung der hMSC-Tert zur Lipidakkumulation kommt, zeigen die Aufnahmen aus dem Phasenkontrastmikroskop, sowie die mittels Nilrot-Färbung dargestellten Neutralfette in den Zellen (Abbildung 3.1).

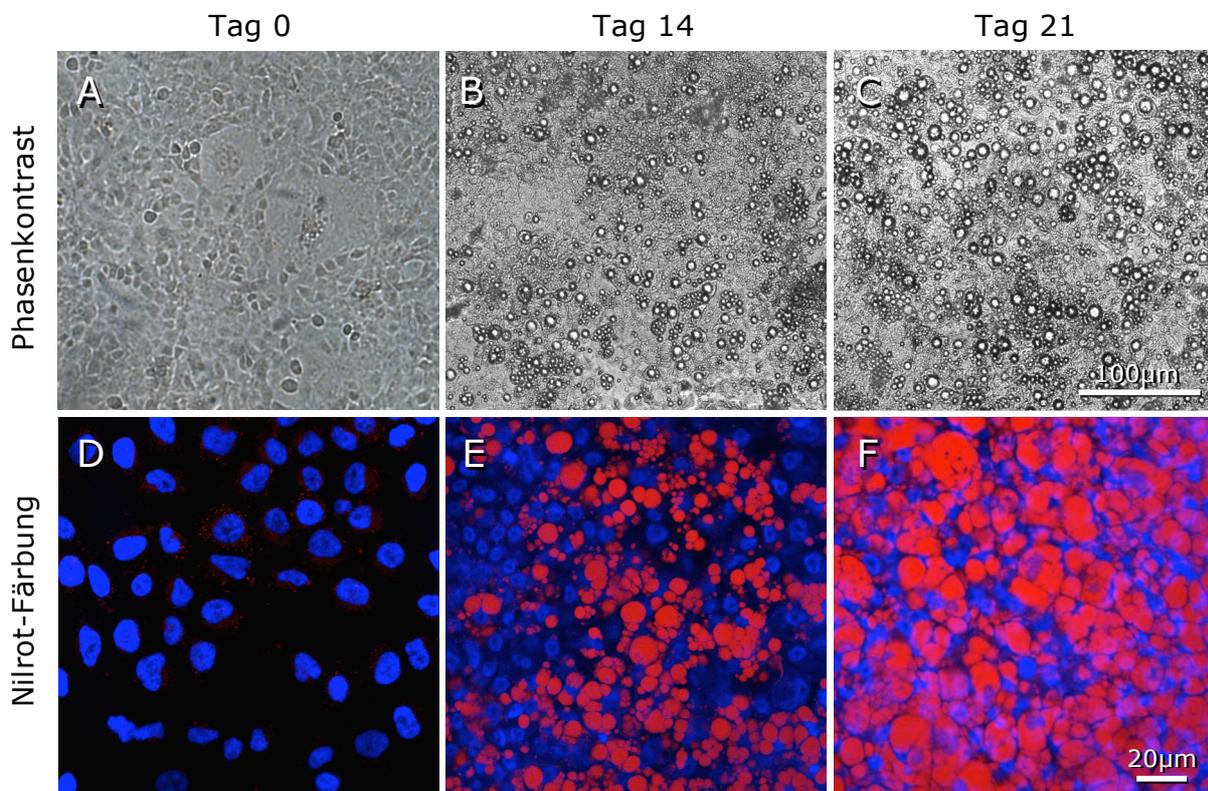


Abbildung 3.1: Lipidakkumulation während der Differenzierung

Im Phasenkontrastmikroskop und in der Nilrot-Färbung ist die Zunahme der Lipidakkumulation in den Zellen von Tag 0 über Tag 14 zu Tag 21 erkennbar.

Je nach Experiment wurden die Zellen an Tag 0, Tag 14 oder Tag 21 der adipozytären Differenzierung für 16-20 Stunden mit den jeweiligen Zusätzen inkubiert, deren Einflüsse auf die Transkription und die Sekretion der Zellen untersucht werden sollten. Zur Inkubation wurde für die Experimente 3.1.1 bis einschließlich 3.1.4 das Inkubationsmedium A (4,5 g/L Glukose) verwendet. Für das Experiment 3.1.4 wurde zusätzlich das Inkubationsmedium B (1 g/L Glukose) benutzt. Das Inkubationsmedium C (4,5 g/L Glukose, 1,67% FCS) wurde für alle folgenden Experimente verwendet. Nach der Inkubation der hMSC-Tert-Adipozyten, wurde mit dem Verfahren der TaqMan Real Time PCR die Anzahl an RNA Kopien der untersuchten Adipozytokine in den Zellen bestimmt. In den Zellkulturüberständen wurden die zugehörigen Konzentrationen der sekretierten Adipozytokine mittels ELISA gemessen und am Proteingehalt der Zellen, der mittels SDS-Lowry bestimmt wurde, normiert.

3.1 RBP4

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde RBP4 in Zusammenhang mit der Entstehung des Typ 2 Diabetes gebracht (Abschnitt 1.5.1). Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Regulation der Transkription und der Sekretion von RBP4 in hMSC-Tert-Adipozyten.

3.1.1 Differenzierungsabhängige RBP4-Expression

Um zu untersuchen, ob die Expression von RBP4 mit dem Differenzierungsgrad der Zellen korreliert, wurden die drei Zeitpunkte Tag 0, Tag 14 und Tag 21 der adipozytären Differenzierung betrachtet. Die Zellen wurden ohne weitere Zusätze inkubiert (Abbildung 3.2).

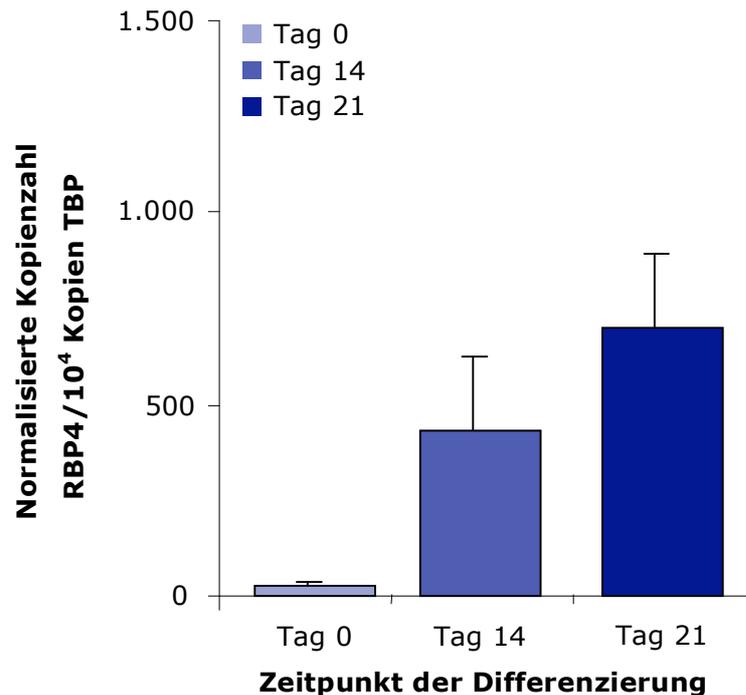


Abbildung 3.2: Differenzierungsabhängige RBP4-Expression

Mit dem Grad der Differenzierung der hMSC-Tert zu Adipozyten steigt die Expression von RBP4. Bei $n=2$ mit vier unabhängigen Messwerten.

Im undifferenzierten Zustand an Tag 0 wird RBP4 kaum transkribiert. An Tag 14 nimmt die Expression von RBP4 stark zu. An Tag 21 der adipozytären Differenzierung kommt es zu einem weiteren Anstieg der Expression.

3.1.2 Differenzierungsabhängige RBP4-Sekretion

Anfänglich war es nicht möglich RBP4 in den Zellkulturüberständen zu bestimmen, da sich die Messwerte im unteren Messbereich des zur Verfügung stehenden ELISA-Kits befanden. In einem exemplarischen Experiment wurden, zu den drei Zeitpunkten Tag 0, Tag 14 und Tag 21 der Differenzierung, die Zellkulturüberstände gesammelt und mit der im Abschnitt 2.8.1 beschriebenen Methode gemessen (Abbildung 3.3).

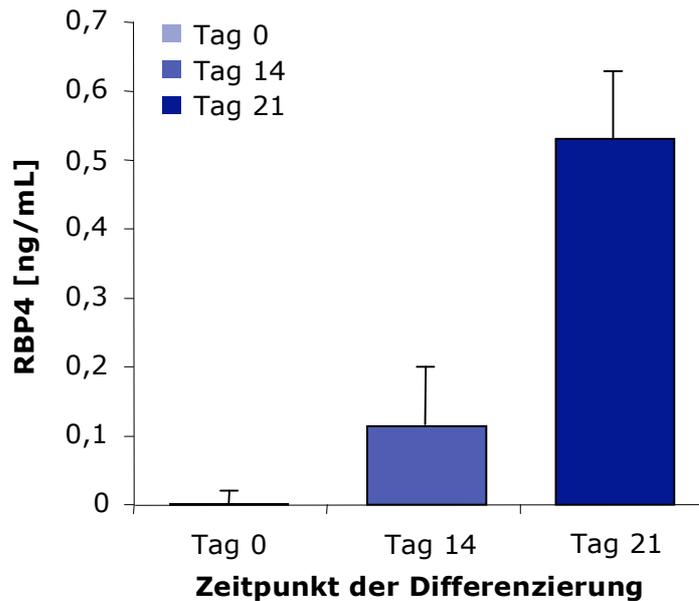


Abbildung 3.3: Differenzierungsabhängige RBP4-Sekretion

Mit dem Grad der Differenzierung der hMSC-Tert zu Adipozyten steigt die Sekretion von RBP4. Bei $n=1$ mit zwei unabhängigen Messwerten.

Dieses Experiment zeigt, dass RBP4 in den Zellkulturüberständen messbar ist und dass es abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen sekretiert wird. Die undifferenzierten Zellen an Tag 0 sekretieren kein RBP4. Mit dem Grad der Differenzierung der Zellen wird vermehrt RBP4 sekretiert. Dies geschieht analog zur differenzierungsabhängig gesteigerten Transkription.

3.1.3 Inkubation mit VLDL

Da die Vermutung angestellt wurde, dass RBP4 über Lipide reguliert werden könnte, was durch die vermehrte Transkription und Sekretion mit dem steigenden Grad der Differenzierung und somit einem vermehrten Lipidgehalt der Zellen erklären werden könnte, wurden die Zellen zu den Zeitpunkten Tag 14 und Tag 21 der Differenzierung mit und ohne 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VLDL inkubiert (Abbildung 3.4).

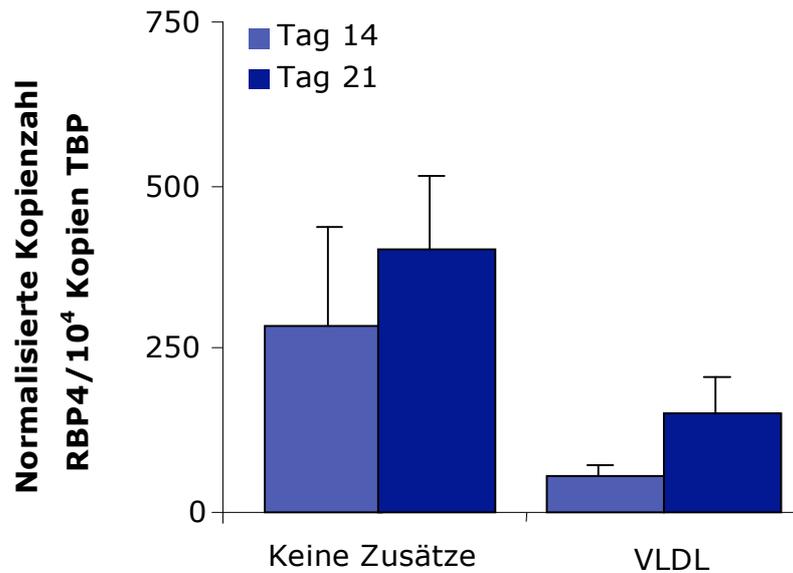


Abbildung 3.4: Inkubation mit VLDL (Transkriptionsebene)

Von Tag 14 zu Tag 21 der adipozytären Differenzierung kommt es zu einem Anstieg der RBP4-Expression. VLDL führen zu einer verringerten Transkription von RBP4 an Tag 14 und an Tag 21 im Vergleich zu ‚keine Zusätze‘. VLDL=Very Low Density Lipoprotein. Bei n=2 mit vier unabhängigen Messwerten.

Wie schon unter 3.1.1 beschrieben wird RBP4 an Tag 21 im Vergleich zu Tag 14 vermehrt transkribiert. VLDL führen an Tag 14 und an Tag 21 zu einer verminderten Transkription von RBP4 im Vergleich zum Zustand ‚keine Zusätze‘. Das sekretierte RBP4 wurde in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.5).

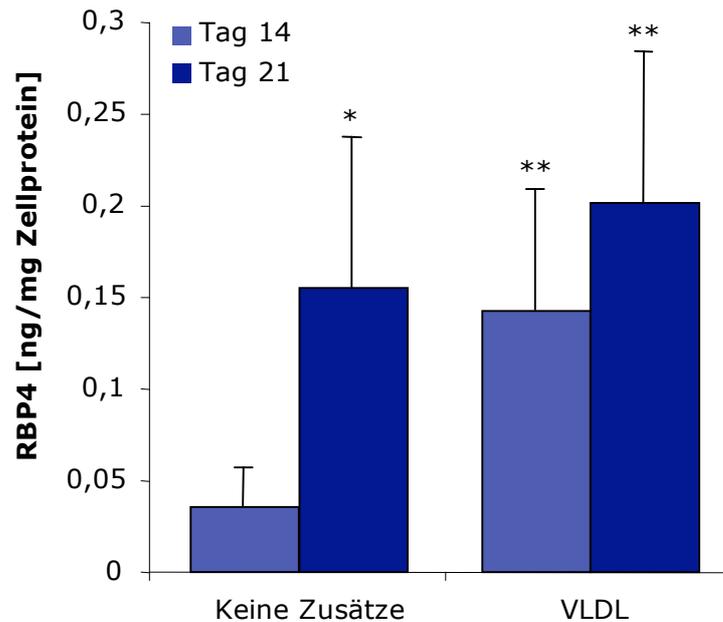


Abbildung 3.5: Inkubation mit VLDL (Sekretionsebene)

An Tag 21 wird im Vergleich zu Tag 14 vermehrt RBP4 sekretiert. Eine Regulation durch VLDL findet an Tag 21 nicht statt. An Tag 14 steigt die Sekretion von RBP4 durch Inkubation mit VLDL signifikant an. VLDL=Very Low Density Lipoprotein. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-Test zum Zustand ‚Tag 14 keine Zusätze‘, * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ bei $n=3$ mit zwei unabhängigen Messwerten.

In der Inkubation ‚keine Zusätze‘ wird RBP4 an Tag 21 signifikant vermehrt sekretiert als an Tag 14. Eine Regulation durch VLDL findet an Tag 21 der Differenzierung nicht statt. An Tag 14 steigt die Sekretion von RBP4 durch die Inkubation mit VLDL signifikant an. Hier ist eine Diskrepanz zwischen der Transkriptions- und der Sekretionsebene vorhanden. Der Anstieg in der RBP4-Sekretion kann nicht durch eine vermehrte Transkription erklärt werden. Aus dem Grund, dass an Tag 14 eine Regulation durch VLDL statt findet, die an Tag 21 aufgehoben ist, wurde für die weiteren Experimente der Zeitpunkt Tag 14 der adipozytären Differenzierung betrachtet.

3.1.4 Inkubation mit Liposomen und Retinol-Palmitat

In der Einleitung wurde der Transport von Vitamin A in Form von Retinyl-Estern im Serum beschrieben (Abschnitt 1.5.1). VLDL nehmen Retinyl-Ester von Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants auf und transportieren diese in die Peripherie [Demacker et al., 2000]. Da durch VLDL die Sekretion von RBP4 reguliert wird, stellte sich die Frage, ob die

Lipide oder ob andere Bestandteile der VLDL die RBP4-Sekretion beeinflussen. Für dieses Experiment wurden Liposomen mit und ohne Retinol-Palmitat aus humanem hyperlipämischen Plasma synthetisiert. Die Zellen an Tag 0 und Tag 14 der Differenzierung wurden ohne Zusätze, mit 625 µg/mL Liposomen und mit 625 µg/mL Liposomen, die 1,56 mM Retinol-Palmitat enthielten, inkubiert. Die exemplarische Messung fand im Inkubationsmedium A mit 4,5 g/L Glukose statt. Zusätzlich wurde Inkubationsmedium B mit 1 g/L Glukose verwendet, um zu untersuchen, ob die Glukosekonzentration im Medium einen Einfluss auf die RBP4-Sekretion hat (Abbildung 3.6).

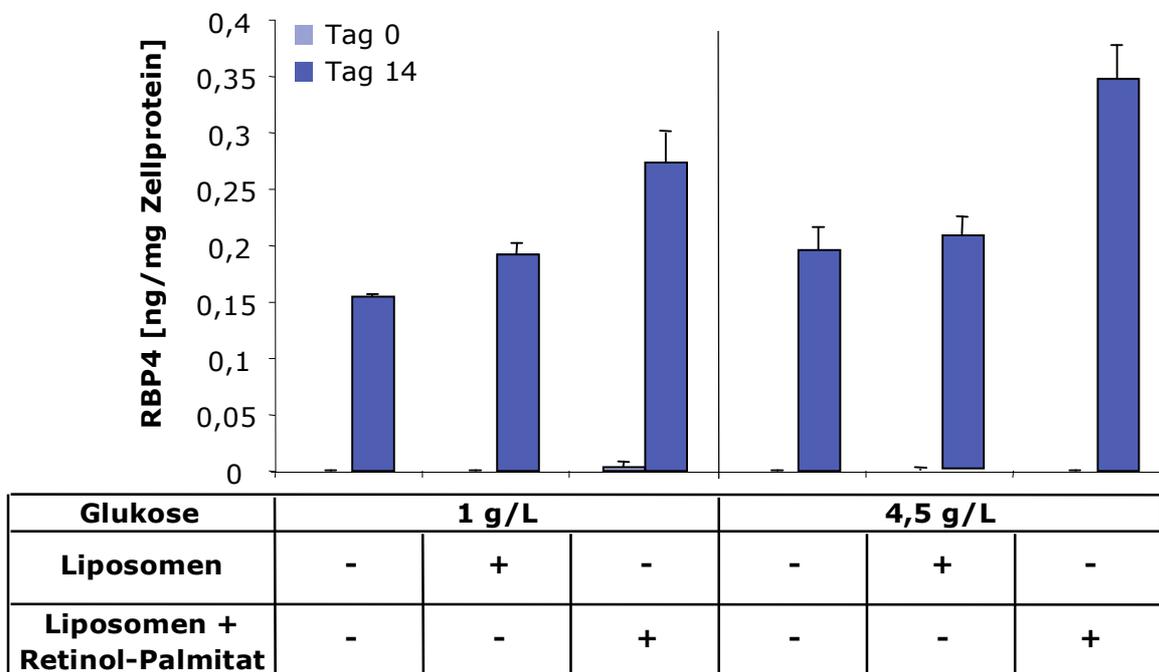


Abbildung 3.6: Inkubation mit Liposomen und Retinol-Palmitat

An Tag 0 wird RBP4 nicht sekretiert. An Tag 14 findet im Vergleich zu Tag 0 eine vermehrte Sekretion statt, die unabhängig von der Glukosekonzentration im Medium ist. RBP4 wird durch die Inkubation von Liposomen mit Retinol-Palmitat im Vergleich zu ‚keine Zusätze‘ vermehrt sekretiert. Zum einen führen die Liposomen zu einer vermehrten RBP4-Sekretion (links), zum anderen steigern die Liposomen mit Retinol-Palmitat die Sekretion von RBP4 (links und rechts). Bei $n=1$ mit zwei unabhängigen Messwerten.

RBP4 wird unabhängig von der Glukosekonzentration im Medium an Tag 14 sekretiert. An Tag 0 findet keine Sekretion statt. In dieser exemplarischen Messung ist zu erkennen, dass die Liposomen (Abb. 3.6 links) und die Liposomen mit Retinol-Palmitat (Abb. 3.6 links und rechts)

zu einer vermehrten Sekretion von RBP4 führen. Da in diesem Experiment die Liposomen und das Retinol-Palmitat einen Effekt zeigten, wurde es nicht wiederholt, da nicht auszuschließen war, dass die aus VLDL extrahierten Lipide mit geringen Mengen RBP4 kontaminiert waren.

3.1.5 Inkubation der Liposomen mit Lipoproteinlipase

Um diese Kontamination zu vermeiden, wurden die Liposomen in den folgenden Experimenten mit einem künstlich erstellten Lipidgemisch aus 80% Triolein, 10% Phosphatidylcholin, 5% Cholesterolestern und 5% Cholesterin synthetisiert. Für die weiteren Experimente wurde das Inkubationsmedium C (4,5 g/L Glukose, 1,67% FCS) verwendet, da die Lipoproteinlipase Apolipoprotein C-II, das im FCS enthalten ist, als Cofaktor benötigt [Goldberg et al., 1990]. Zu jedem Ansatz (,keine Zusätze', ,Liposomen' und ,Liposomen mit Retinol-Palmitat') wurde zusätzlich 1 µg/mL Lipoproteinlipase hinzu gegeben, um den Einfluss der Lipolyse auf die Transkription und die Sekretion von RBP4 zu untersuchen (Abbildung 3.7).

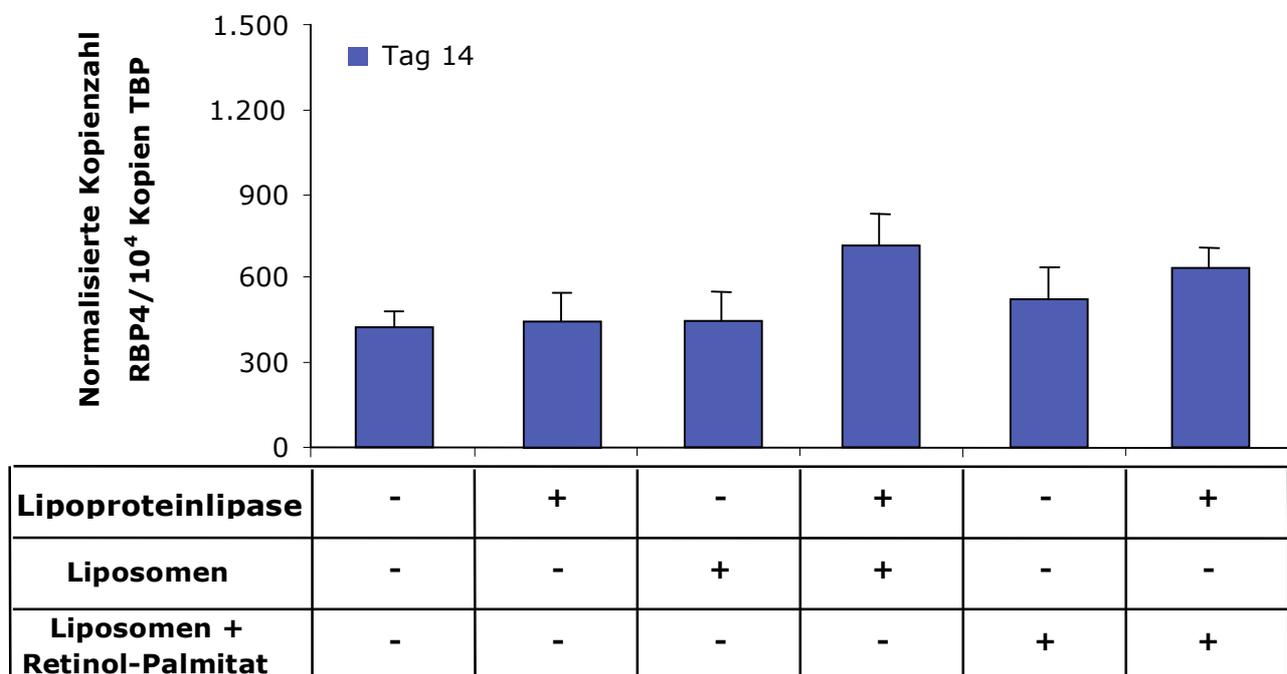


Abbildung 3.7: Inkubation der Liposomen mit Lipoproteinlipase (Transkriptionsebene)

Die Lipoproteinlipase allein und die Liposomen mit und ohne Retinol-Palmitat haben keinen Einfluss auf die RBP4-Transkription der Adipozyten. Durch die Kombination der Liposomen mit der Lipoproteinlipase kommt es zu einem Anstieg der RBP4-Expression. Bei n=2 mit vier unabhängigen Messwerten.

Die Lipoproteinlipase allein und die Liposomen mit und ohne Retinol-Palmitat haben keinen Einfluss auf die Transkription von RBP4. Durch die Kombination der Lipoproteinlipase mit Liposomen und Liposomen, die Retinol-Palmitat enthielten, ist ein Anstieg der RBP4-Expression erkennbar, welcher auf die hydrolysierten Lipide zurückzuführen ist. Das sekretierte RBP4 wurde mittels ELISA in den Zellkulturüberständen bestimmt (Abbildung 3.8).

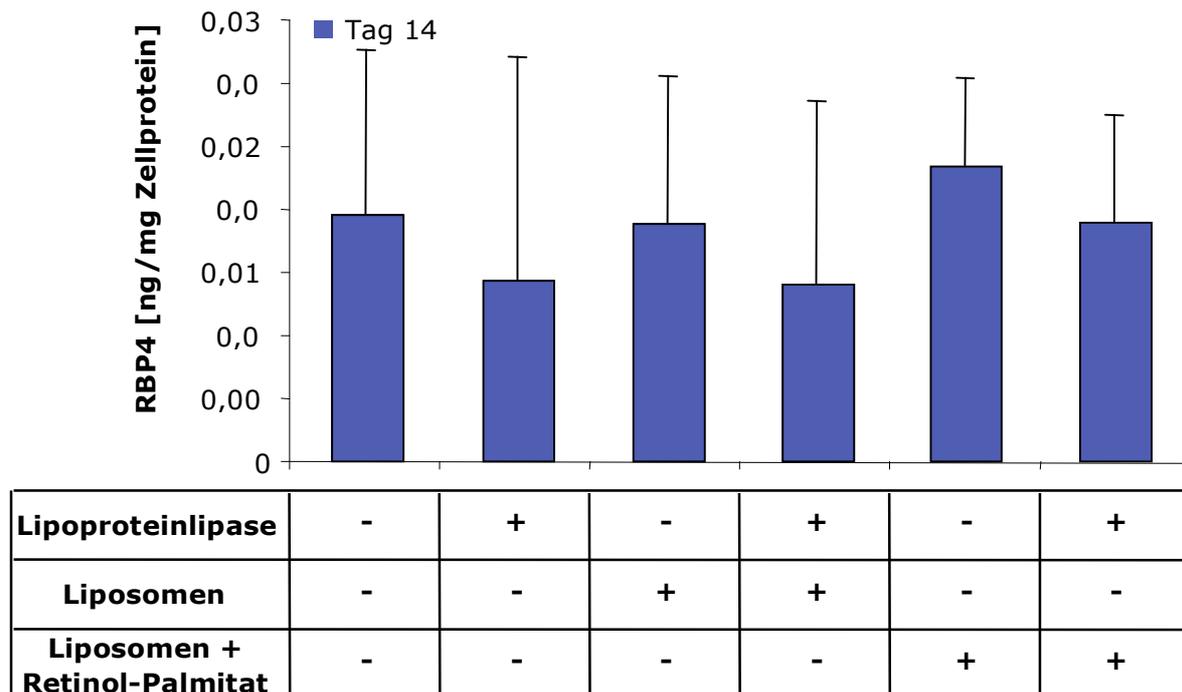


Abbildung 3.8: Inkubation der Liposomen mit Lipoproteinlipase (Sekretionsebene)

Lipoproteinlipase, Liposomen aus künstlichen Lipiden mit und ohne Retinol-Palmitat, sowie die Kombination der Liposomen mit Lipoproteinlipase haben keinen Einfluss auf die RBP4-Sekretion der zu Adipozyten differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen. Bei n=2 mit zwei unabhängigen Messwerten.

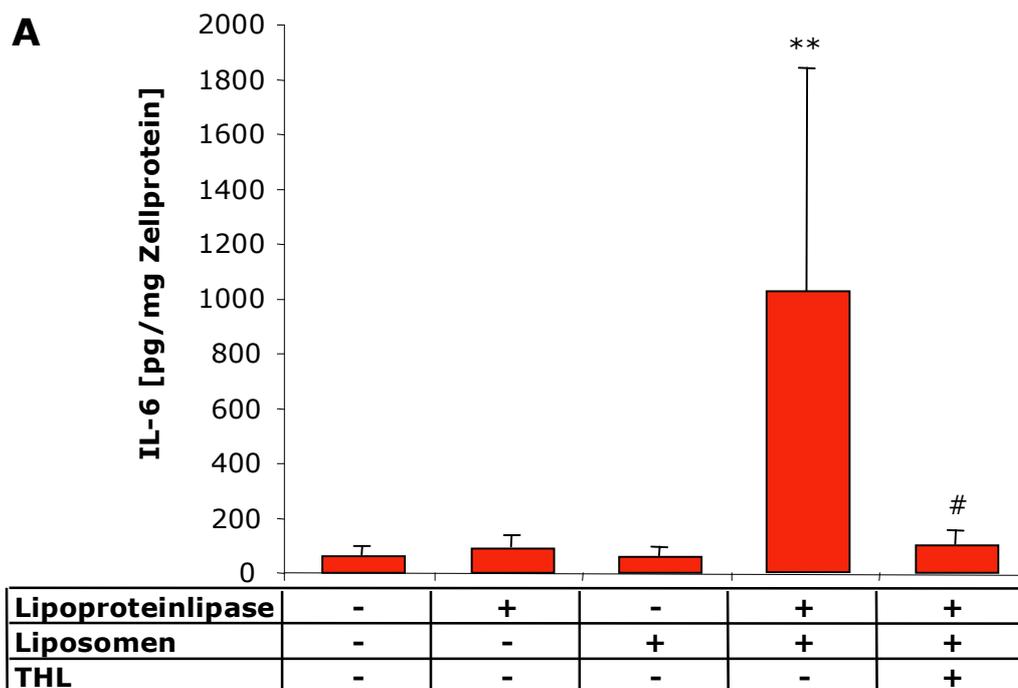
Weder die Liposomen aus künstlichen Lipiden, noch die Liposomen mit Retinol-Palmitat haben einen Einfluss auf die Sekretion von RBP4. Die Lipoproteinlipase allein zeigt auch keinen Effekt. Die geringe Steigerung der RBP4-Transkription durch die Kombination der Lipoproteinlipase mit Liposomen ist auf sekretorischer Ebene nicht messbar.

3.2 IL-6, MCP-1 und Adiponektin

An der Entstehung des Typ 2 Diabetes ist eine Entzündungsreaktion im Fettgewebe maßgeblich beteiligt. Durch die Aktivierung von Entzündungssignalkaskaden wird die Insulinresistenz hervorgerufen [Hotamisligil, 2003]. Um den Mechanismus der Entstehung der Entzündungsreaktion im Fettgewebe zu charakterisieren, wurde die Regulation der beiden proinflammatorischen Adipozytokine IL-6 und MCP-1, sowie des antiinflammatorischen Adipozytokins Adiponektin auf transkriptioneller und sekretorischer Ebene untersucht.

3.2.1 Fettsäureabhängige Sekretion der Adipozytokine

Um zu untersuchen, welchen Effekt postprandiale Lipide auf die Adipozytokinsekretion haben, wurden Liposomen aus einem künstlich hergestellten Lipidgemisch synthetisiert. Die Zellen wurden mit den 625 µg/L Liposomen in Kombination mit und ohne Lipoproteinlipase, welche Fettsäuren aus den Triglyzeriden spaltet, in einer Konzentration von 1 µg/mL, sowie mit Tetrahydrolipstatin (THL), welche die Lipoproteinlipase inhibiert, in einer Konzentration von 25 µg/mL inkubiert (Abbildung 3.9 A-C).



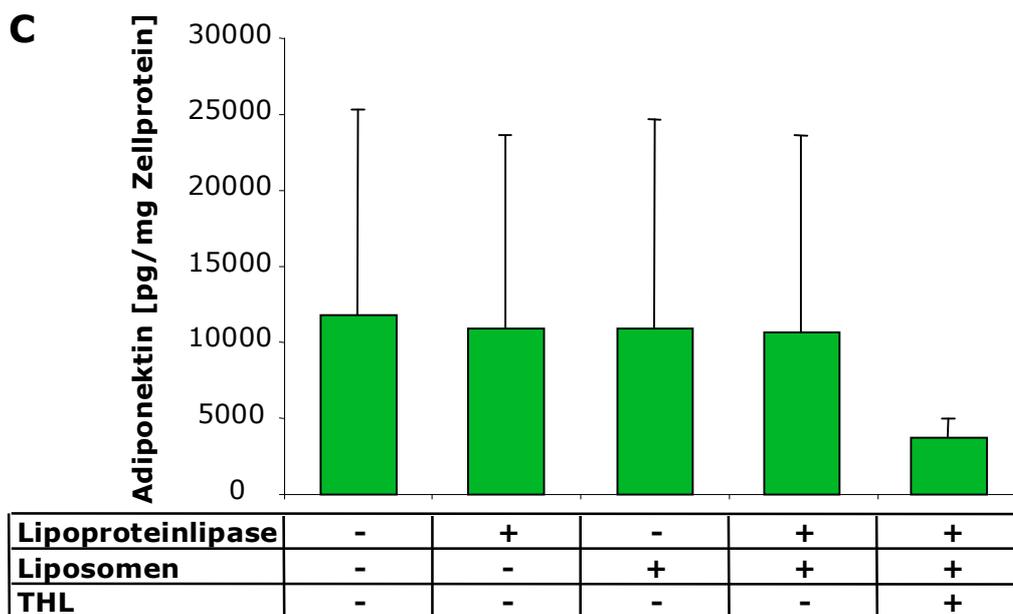
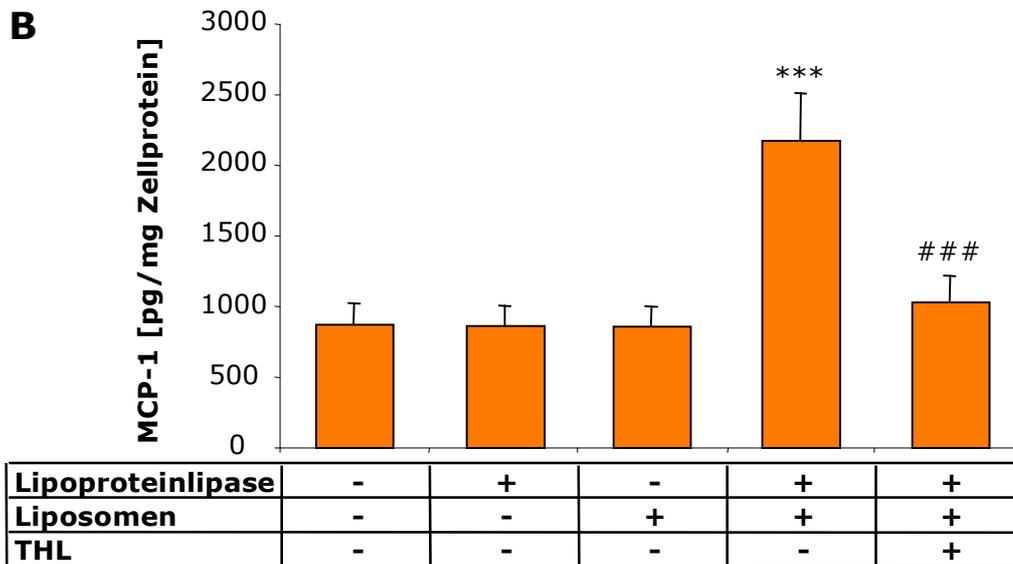


Abbildung 3.9: Fettsäureabhängige Sekretion der Adipozytokine

Die durch die Lipoproteinlipase hydrolysierten Liposomen führen zu einer signifikant vermehrten Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und MCP-1. Durch Inhibition der Lipoproteinlipase mit THL gleicht sich die Sekretion von IL-6 und MCP-1 wieder dem Basalwert an (A, B). Die Sekretion des antiinflammatorischen Adipozytokins Adiponektin wird nicht beeinflusst (C).

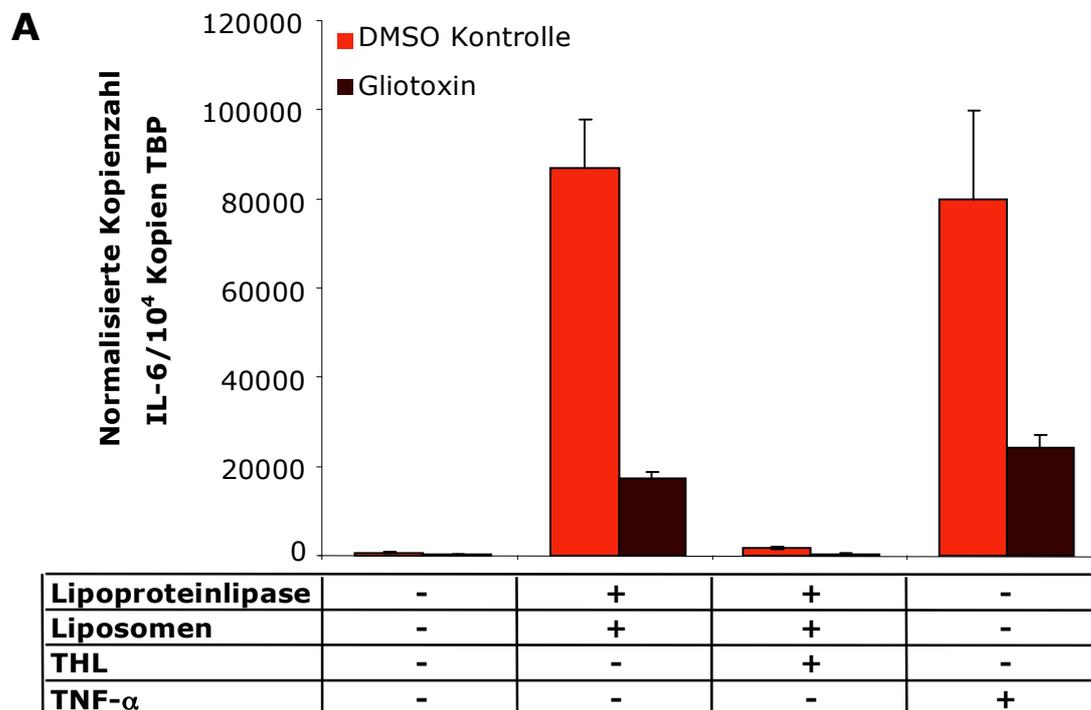
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-Test zum Zustand ‚keine Zusätze‘, ‚Lipoproteinlipase‘ und ‚Liposomen‘ $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$, sowie zum Zustand ‚Liposomen mit Lipoproteinlipase‘ $\#p < 0,05$ und $###p < 0,001$ bei $n=3$ mit zwei unabhängigen Messwerten.

Die beiden proinflammatorischen Adipozytokine IL-6 und MCP-1 werden signifikant vermehrt sekretiert, wenn die Liposomen durch die Lipoproteinlipase hydrolysiert und entsprechend Fettsäuren freigesetzt werden. Die Liposomen und die Lipoproteinlipase allein haben keinen Einfluss auf die Sekretion. Dass der Effekt von der Lipoproteinlipase abhängig ist, bestätigt die Inhibierung durch THL, was zur basalen Sekretion der Adipozytokine führt. Die Sekretion des antiinflammatorischen Adipozytokins Adiponektin wird durch die Inkubationszusätze nicht signifikant beeinflusst.

3.2.2 Inhibition des NF- κ B-Signalweges

In dem Experiment unter 3.2.1 wurde gezeigt, dass die Lipolyse von Triglyzeriden in Adipozyten zu einer vermehrten Sekretion der beiden proinflammatorischen Adipozytokine IL-6 und MCP-1 führt. Um den molekularen Mechanismus dieses Effektes zu charakterisieren, wurde der NF- κ B-Signalweg inhibiert, da dieser in der Literatur mit der proinflammatorischen Reaktion von Mausadipozyten auf freie Fettsäuren in Verbindung gebracht wurde [Suganami et al., 2007]. Die Zellen wurden mit Liposomen und Lipoproteinlipase, sowie mit Liposomen, Lipoproteinlipase und THL inkubiert. Die Konzentrationen entsprachen denjenigen im vorangegangenen Experiment. TNF- α als proinflammatorisches Zytokin wurde in einer Konzentration von 2 ng/mL als Positivkontrolle auf die Zellen gegeben. In humanen Adipozyten führt TNF- α zu einer schnellen, inflammatorischen Antwort mit einer vermehrten Transkription der proinflammatorischen Adipozytokine IL-6 und MCP-1. Außerdem führt es zur verminderten Transkription des antiinflammatorischen Adipozytokins Adiponektin [Wang & Trayhurn, 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion über den NF- κ B Signalweg vermittelt wird [Sha, 1998]. Um den NF- κ B-Signalweg zu inhibieren, wurde im einen Fall Gliotoxin verwendet. Es gehört zur Klasse der Epipolythiodioxopiperazine und wurde als erstes Mitglied der aus mindestens 13 weiteren Mitgliedern bestehenden Gruppe beschrieben. Weitere inhibitorische Effekte des Gliotoxins, beispielsweise auf andere Transkriptionsfaktoren oder *second-messenger* Moleküle konnten nicht festgestellt werden [Pahl et al., 1996]. Im anderen Fall wurde der

InSolution NF- κ B Activation Inhibitor (NF- κ B-Inhibitor), ein Quinazolin-Derivat, verwendet. Quinazolin-Derivate haben diverse Einflüsse auf zellulärer Ebene. Beispielsweise wird der auf Quinazolin basierende α 1-Adrenozeptor Antagonist *Doxazosin* aufgrund seiner apoptoseinduzierenden Wirkung auf Tumorzellen in der Therapie von Prostata-Karzinomen eingesetzt [Garrison et al., 2007]. Außerdem finden Quinazolin-Alkaloide eine Verwendung in der Malariatherapie [Kikuchi et al., 2006]. Das Gliotoxin wurde mit 500 ng/mL auf die Zellen gegeben, der NF- κ B-Inhibitor mit einer 2,5 μ M Konzentration. Als Kontrolle diente DMSO. Die Expression wurde nur in den Proben, die mit Gliotoxin und der Kontrolle inkubiert wurden, bestimmt (Abbildung 3.10 A-C).



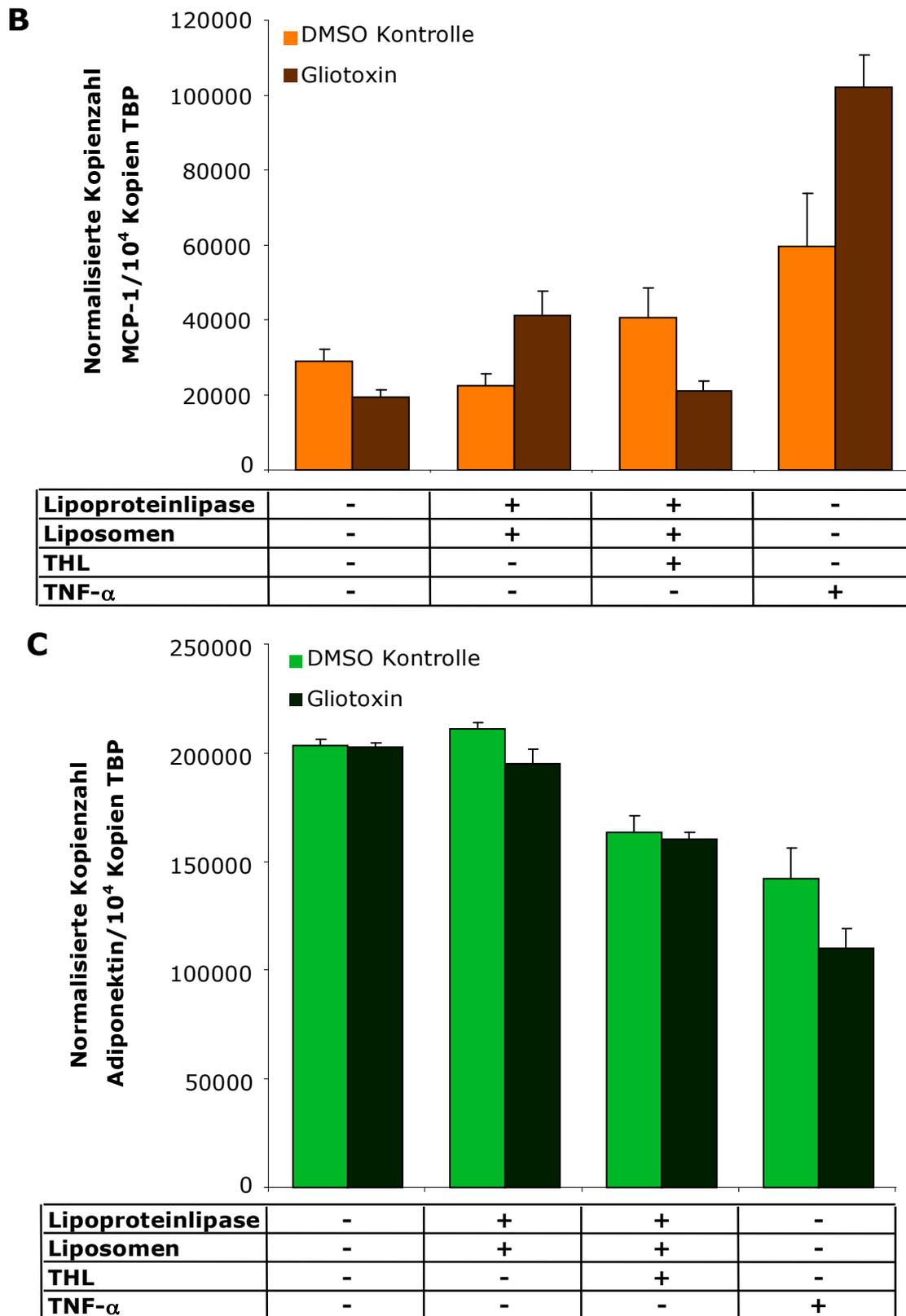
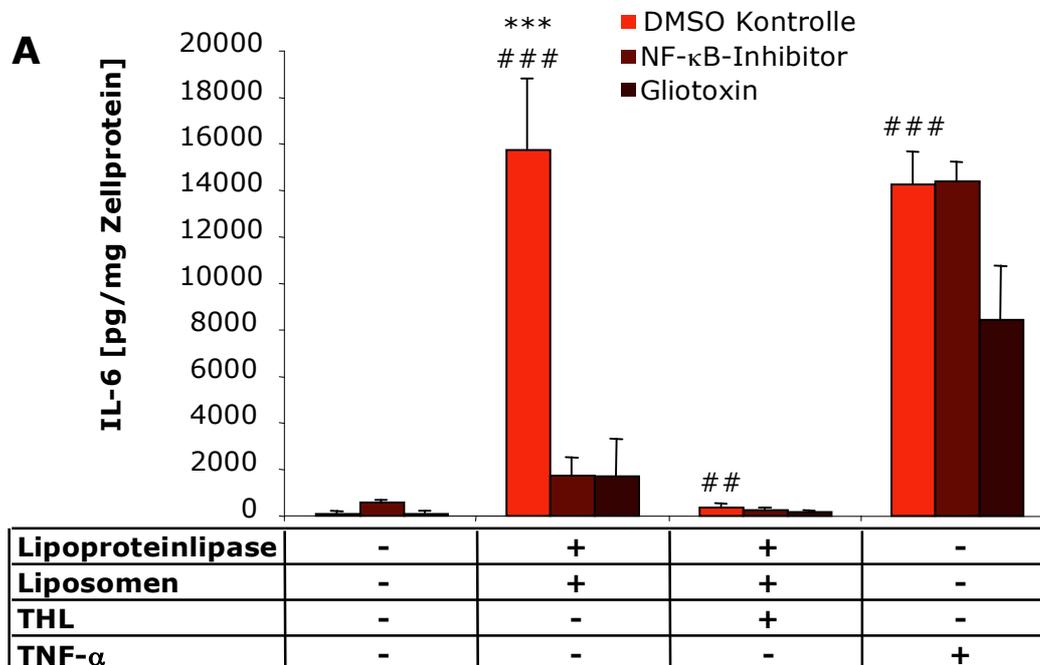


Abbildung 3.10: Inhibition des NF- κ B-Signalweges (Transkriptionsebene)

Die durch Fettsäuren stimulierte IL-6-Transkription kehrt durch Inhibition des NF- κ B-Signalweges auf nahezu Basalwerte zurück (A). Die MCP-1-Transkription wird nicht durch Fettsäuren reguliert (B). Die Adiponektinexpression wird durch TNF-Alpha vermindert, Gliotoxin hat keinen Einfluss (C). Bei n=2 mit vier unabhängigen Messwerten.

Die durch Fettsäuren stimulierte IL-6-Transkription kehrt durch Inhibition des NF- κ B-Signalweges auf nahezu Basalwerte zurück. Gleiches ist für den TNF- α -Stimulus zu beobachten. Die Expression von IL-6 kehrt durch Inhibition der Lipoproteinlipase mit THL auf Basalwerte zurück. Die Expression von MCP-1 wird weder durch die hydrolysierten Lipide, noch durch die Gabe von Gliotoxin beeinflusst. TNF- α führt zu einer gesteigerten Expression von MCP-1, die durch den Inhibitor weiter gesteigert wird. Auf die Transkription von Adiponektin haben weder die Liposomen in Kombination mit der Lipoproteinlipase, noch die Gabe des Gliotoxins einen Einfluss. TNF- α führt zu einer verminderten Transkription von Adiponektin, die durch das Gliotoxin noch weiter verringert wird. Die Bestimmung der Adipozytokinsekretion mittels ELISA fand zusätzlich zur DMSO Kontrolle und dem Gliotoxin in den mit dem NF- κ B-Inhibitor inkubierten Proben statt (Abbildung 3.11 A-C).



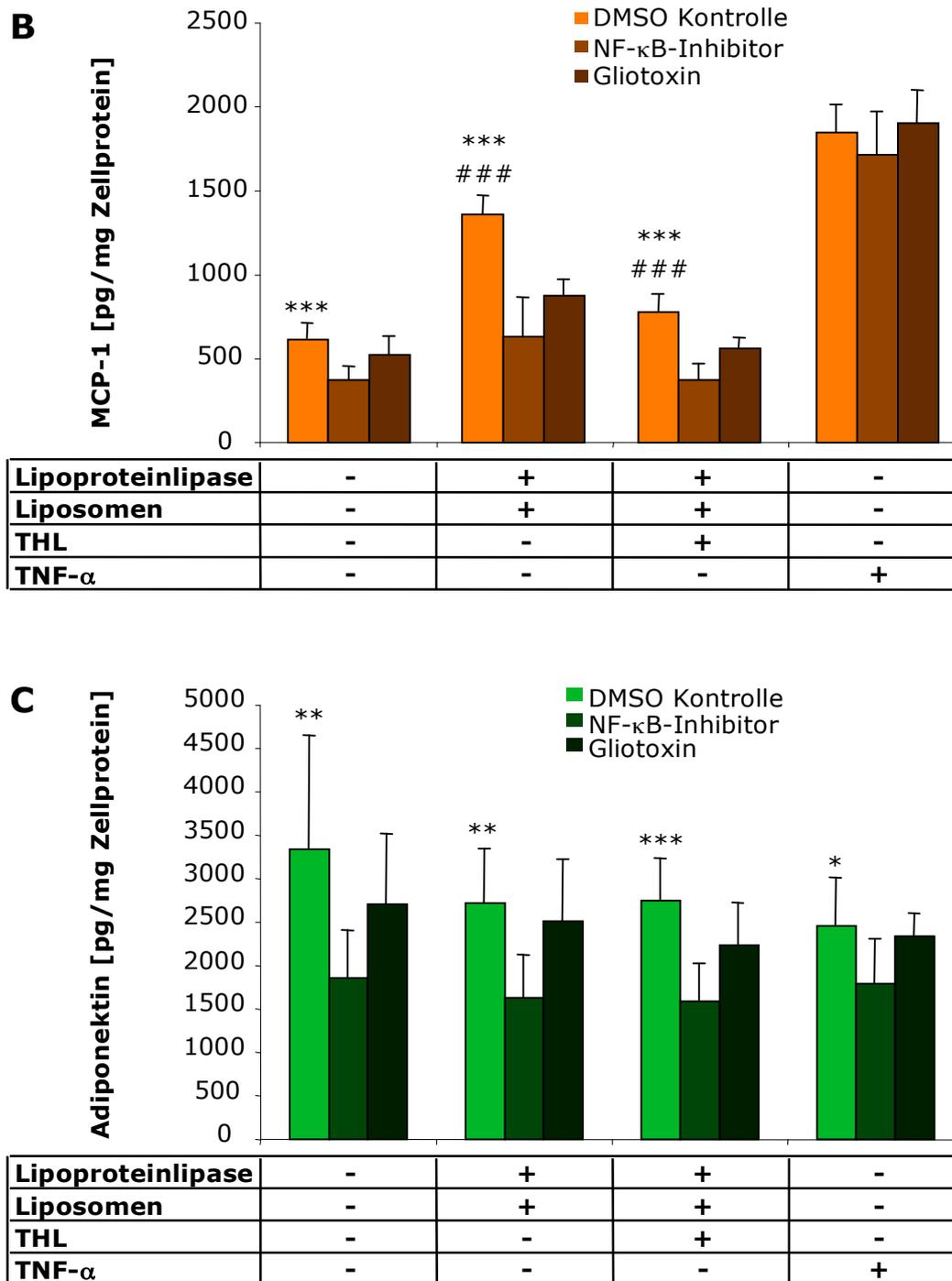


Abbildung 3.11: Inhibition des NF-κB-Signalweges (Sekretionsebene)

Die durch Fettsäuren stimulierte Sekretion der proinflammatorischen Adipozytokine IL-6 und MCP-1 ist durch zwei unterschiedliche Inhibitoren des NF-κB-Signalweges auf nahezu Basalwerte zurückgekehrt (A, B). Die Sekretion von Adiponektin ist unabhängig von den Inkubationszusätzen und dem Gliotoxin. Der NF-κB-Inhibitor senkt die Adiponektinsekretion der Zellen signifikant (C).

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-Test zum Zustand ‚NF-κB-Inhibitor im selben Inkubationsansatz‘ * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, sowie zum Zustand ‚Gliotoxin im selben Inkubationsansatz‘ ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$ bei $n=4$ mit zwei unabhängigen Messwerten.

Die durch die Lipoproteinlipase hydrolysierten Liposomen führen in den hMSC-Tert-Adipozyten zu einer signifikant vermehrten Sekretion der proinflammatorischen Adipozytokine IL-6 und MCP-1. Der inflammatorische Stimulus der Fettsäuren entspricht dem einer TNF- α Konzentration von 2 ng/mL. Durch zwei unterschiedliche Inhibitoren des NF- κ B-Signalweges wird die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine auf nahezu Basalwerte zurückgeführt. Dass der Effekt der hydrolysierten Lipide abhängig von der Lipoproteinlipase ist, zeigt, wie schon in Abschnitt 3.2.1, die Inhibition mit THL. Die durch TNF- α stimulierte IL-6-Sekretion wird durch Gliotoxin, nicht jedoch durch den NF- κ B-Inhibitor, vermindert. Auf MCP-1-Ebene ist kein Einfluss der Inhibitoren auf die TNF- α stimulierte Sekretion zu erkennen. Weder die Liposomen in Kombination mit der Lipoproteinlipase, noch das TNF- α haben einen Einfluss auf die Adiponektinsekretion. Der NF- κ B-Inhibitor senkt die Adiponektinsekretion in allen Ansätzen signifikant herab, Gliotoxin hat keinen Einfluss.

3.2.3 Aktivierung des TLR4

Die inflammatorische Reaktion der hMSC-Tert-Adipozyten auf den Fettsäurestimulus wird über den NF- κ B-Signalweg vermittelt. Dieser Signalweg kann über unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Im Mausmodell ist beschrieben worden, dass Fettsäuren über die Bindung an den TLR4 den NF- κ B-Signalweg aktivieren [Suganami et al., 2007]. Der TLR4 erkennt das LPS gramnegativer Bakterien und vermittelt die angeborene Immunantwort [Shi et al., 2006]. In humanen Adipozyten führt LPS durch Bindung des TLR4 und daraus resultierender Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zur gesteigerten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α [Bès-Houtmann et al., 2007]. Um zu untersuchen, ob über den TLR4 die Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann, welche durch die Inkubation mit den Fettsäuren erzeugt wird, wurden die Zellen mit LPS in aufsteigender Konzentration von 1 ng/mL über 10 ng/mL zu 100 ng/mL stimuliert. Als Positivkontrolle galt in diesem exemplarischen Experiment TNF- α in den Konzentrationen von 2 ng/mL und 10 ng/mL (Abbildung 3.12 A, B).

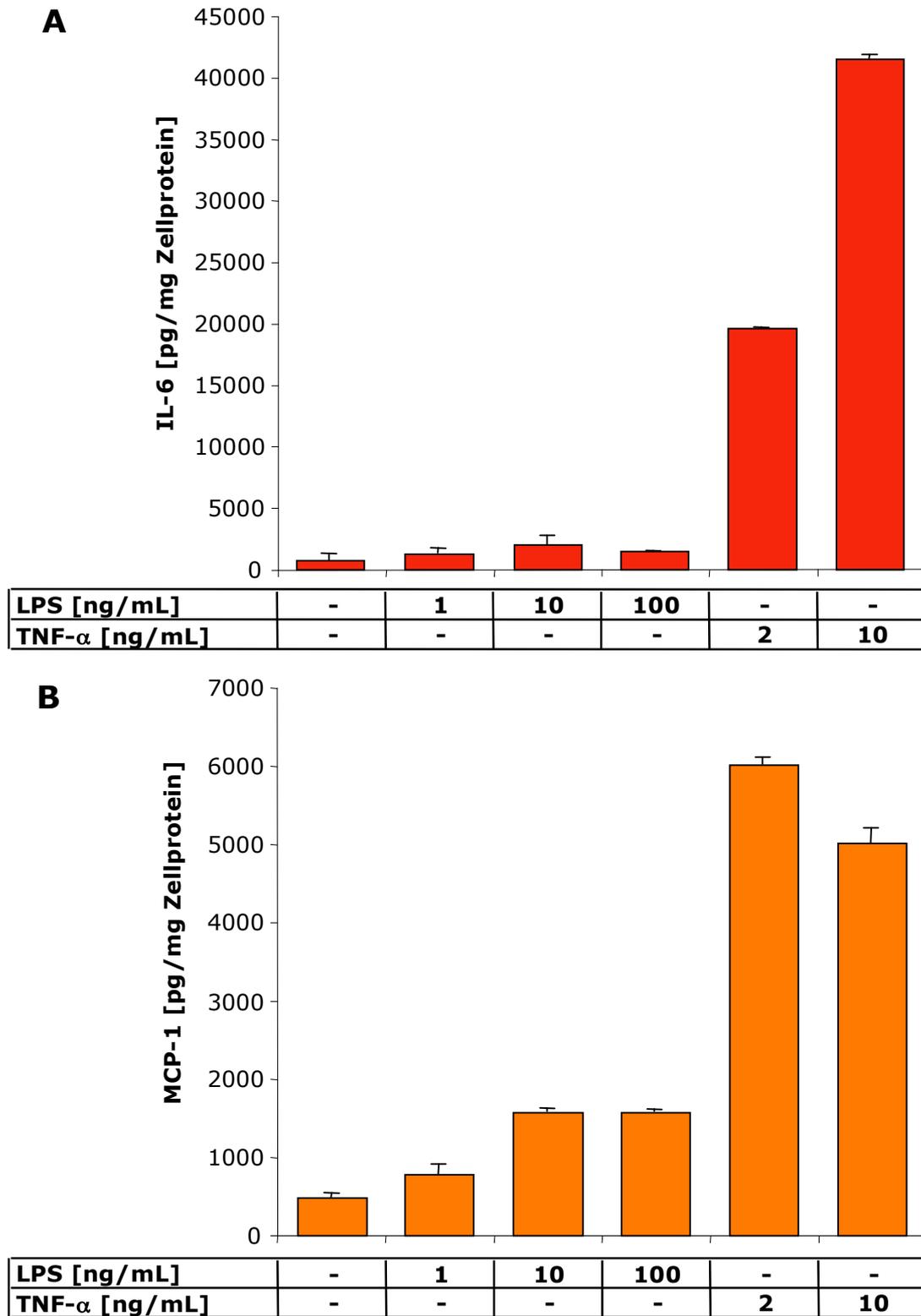


Abbildung 3.12: Aktivierung des TLR4

Die IL-6- und MCP-1-Sekretion wird durch LPS nicht so stark induziert wie durch TNF- α . Die TNF- α stimulierte IL-6-Sekretion ist konzentrationsabhängig (A). Die LPS stimulierte MCP-1-Sekretion ist konzentrationsabhängig und ab einer Konzentration von 10 ng/mL gesättigt (B). Bei n=1 mit zwei unabhängigen Messwerten.

Das LPS führt im Vergleich zum TNF- α zu einem geringeren Anstieg der IL-6-Sekretion der hMSC-Tert-Adipozyten. Auf IL-6-Ebene kommt es durch die Inkubation von 10 ng/mL TNF- α anstatt von 2 ng/mL zu einem weiteren Anstieg der Sekretion. Dieser Anstieg ist auf MCP-1-Ebene nicht vorhanden. Dort ist jedoch ein Anstieg der MCP-1-Sekretion durch den LPS Stimulus erkennbar, welcher ab einer Konzentration von 10 ng/mL gesättigt ist.

4 Diskussion

4.1 RBP4

Im ersten Experiment konnte nachgewiesen werden, dass RBP4 abhängig vom Differenzierungsgrad der hMSC-Tert-Adipozyten zunehmend transkribiert und sekretiert wird (Abbildung 3.2 & 3.3). 1992 wurde erstmalig festgestellt, dass die Transkription von RBP4 mit der Differenzierung muriner Präadipozyten zu reifen Adipozyten ansteigt [Zovich et al., 1992]. Dieser Effekt wurde für humane, adipozytär differenzierte Präadipozyten bestätigt [Janke et al., 2006; Vitkova et al., 2007]. Es wurde bislang nicht untersucht, dass die Differenzierung auch die Sekretion von RBP4 fördert. Nachgewiesen wurde, dass die RBP4-Serumkonzentration mit der viszeralen Fettmasse korreliert [Jia et al., 2007] und dass die RBP4-Serumkonzentration, sowie die Expression in den Adipozyten bei Kalorienrestriktion abnimmt [Vitkova et al., 2007; Haider et al., 2007]. Dies lässt indirekte Rückschlüsse darauf zu, dass die Fettmasse und damit die Differenzierung und der Fettgehalt des einzelnen Adipozyten eine Auswirkung auf das zirkulierende RBP4 hat. Zusätzlich zu den obigen Befunden konnte gezeigt werden, dass RBP4 mit dem BMI korreliert [Graham et al., 2006; Haider et al., 2007], was jedoch kontrovers diskutiert wird [Sell & Eckel, 2007], da *Janke et al.* zeigten, dass für die RBP4-Serumwerte keine Unterschiede zwischen normalgewichtigen, übergewichtigen, sowie adipösen Probandinnen bestanden [Janke et al., 2006;]. *Yao-Borengasser et al.* wiesen dies in einem anderen Patientenkollektiv nach [Yao-Borengasser et al., 2007]. *Yang et al.* zeigten, dass ein selektiv verminderter GLUT4-Gehalt in Mausadipozyten zu einer vermehrten Expression und erhöhten Serumwerten an RBP4 führt. Sie postulierten, dass RBP4 bei niedrigem intrazellulären Glukosegehalt vermehrt von den Adipozyten sekretiert werde [Yang et al., 2005]. In einer exemplarischen Messung konnte gezeigt werden, dass die Glukosekonzentration im Medium keinen Einfluss auf die RBP4-Sekretion hat (Abbildung 3.6). Bislang wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, ob der intrazelluläre Glukosegehalt direkt als Auslöser für die vermehrte RBP4-Expression und

-Sekretion in Frage kommt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die GLUT4- und die RBP4-Expression in Adipozyten positiv miteinander korrelieren, was im Widerspruch zu der von *Yang et al.* postulierten Hypothese steht [Janke et al., 2006; Vitkova et al., 2007; Yao-Borengasser et al., 2007]. Die Korrelation besteht vor allem im viszeralen Fettgewebe [Bajzová et al., 2007]. Diese Kontroverse deutet darauf hin, dass RBP4 in verschiedenen Spezies unterschiedlich reguliert wird.

In dieser Arbeit konnte experimentell gezeigt werden, dass die Inkubation mit VLDL zur vermehrten Sekretion, bei verminderter Expression, von RBP4 führt. Dieser Effekt ist kein transkriptioneller, sondern geschieht auf Proteinebene (Abbildung 3.4 & 3.5). In einer epidemiologischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von RBP4 und VLDL besteht. Diese Korrelation war bei Patienten mit Diabetes, koronarer Herzkrankheit und in der Kontrollgruppe vorhanden [von Eynatten et al., 2007]. Eine weitere Studie untersuchte den Effekt der Gewichtsreduktion auf Plasmalipide und RBP4. Durch Gewichtsabnahme wurden die Plasmakonzentrationen von VLDL und RBP4 signifikant vermindert [Ng et al., 2007]. Auf welchem Mechanismus diese Korrelation beruht ist unklar. Im Rahmen des *Metabolischen Syndroms* kommt es zu einer Verfettung der Leber. Die Fettleber korreliert hoch signifikant und linear mit allen Komponenten des *Metabolischen Syndroms*. Neben weiteren Störungen im Glukose- und Lipidstoffwechsel, werden vermehrt VLDL von der Leber sekretiert [Kotronen & Yki-Järvinen, 2008]. Es wurde auch gezeigt, dass RBP4 im Serum signifikant mit dem Grad der Fettleberausprägung assoziiert ist [Wu et al., 2008; Stefan et al., 2007]. Spekulativ ist, ob dies auf eine vermehrte VLDL-Ausschüttung der Leber und eine dadurch erhöhte RBP4-Sekretion der Adipozyten zurückzuführen ist. Von Eynatten et al. stellten die Hypothese auf, dass RBP4 zu einer vermehrten VLDL-Sekretion der Leber führt, da das Retinol zu Retinsäure verstoffwechselt wird und diese über RXR und RAR zur hepatischen Überproduktion von VLDL führt [von Eynatten et al., 2007].

In den nächsten Experimenten wurde der Einfluss von Lipiden und Retinol-Palmitat auf die RBP4-Transkription und -Sekretion untersucht, da diese beiden Bestandteile als mögliche Einflussfaktoren in Zusammenhang

gebracht wurden. Retinol-Palmitat wurde benutzt, da es im Serum von Typ 2 Diabetes Patienten zusammen mit Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants erhöht ist [Majali et al., 2006]. Aufgrund der Ergebnisse des ersten Experimentes ist anzunehmen, dass die extrahierten Lipide aus dem humanen, hyperlipämischen Plasma die Sekretion von RBP4 beeinflusst haben. Dort wurde eine gesteigerte, jedoch uneinheitliche RBP4-Sekretion durch Retinol-Palmitat, sowie durch die Liposomen beobachtet (Abbildung 3.6). Im darauf folgenden Experiment, diente ein künstlich erstelltes Lipidgemisch zur Liposomensynthese. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Lipolyse einen Einfluss auf die RBP4-Transkription und -Sekretion hat. Die Lipoproteinlipase hydrolysiert nicht nur Triglyzeride zu Fettsäuren, sondern auch Retinyl-Ester zu Retinol und der zugehörigen Fettsäure [Blaner et al., 1994]. In diesen Experimenten wurde keine veränderte RBP4-Sekretion detektiert, wobei auch das Retinol-Palmitat keinen Effekt zeigte (Abbildung 3.8). Retinol-Palmitat hatte auch auf die RBP4-Transkription keinen Einfluss (Abbildung 3.7). Dass Retinol keinen Einfluss auf die RBP4-Sekretion hat, wurde für murine Adipozyten beschrieben [Zovich et al., 1992]. Eine aktuellere Studie hat jedoch vorgeschlagen RBP4 als Surrogatparameter für die Retinolbestimmung im humanen Serum zu verwenden, da eine enge Korrelation der beiden Parameter gezeigt werden konnte [Gamble et al., 2001]. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es wahrscheinlich, dass diese Korrelation durch die Leber und nicht durch das Fettgewebe reguliert wird. In demselben Experiment konnte beobachtet werden, dass die Lipolyse der Fette zu einer geringfügig gesteigerten RBP4-Expression bei gleich bleibender Sekretion führte (Abbildung 3.7 & 3.8). Von Eynatten et al. zeigten, dass die Triglyzeridplasmakonzentration und die Aktivität der hepatischen Lipase mit RBP4 im Serum korreliert [von Eynatten et al., 2007]. Diese Beobachtung steht sowohl im Einklang damit, dass die hydrolysierten Fette die RBP4-Transkription steigern, als auch im Widerspruch, da das vermehrt synthetisierte RBP4 nicht sekretiert wird. Auf den Mechanismus, wie VLDL die RBP4-Sekretion induzieren, kann nicht rückgeschlossen werden. Eindeutig ist, dass es nicht die Lipide und das Retinol-Palmitat sind. Außerdem ist zu hinterfragen, ob RBP4 an der Entstehung der

Insulinresistenz und dem daraus resultierenden Typ 2 Diabetes direkt beteiligt ist oder ob es sich um ein Begleitphänomen, aufgrund von Verschiebungen der Lipoproteinfraktionen im Plasma, handelt, da viele Studien konträre Ergebnisse erzielten.

4.2 IL-6, MCP-1 und Adiponektin

Postprandiale Lipide, welche Lipoproteinlipaseabhängig hydrolysiert werden, führen in hMSC-Tert-Adipozyten zur vermehrten IL-6- und MCP-1-Sekretion und steigern die IL-6-Transkription. Sie haben jedoch keinen Einfluss auf die MCP-1-Transkription, sowie auf die Sekretion und Transkription von Adiponektin. Dieser Effekt ist durch Inhibierung der Lipoproteinlipase mit THL unterdrückbar (Abbildung 3.9 & 3.10). Die Lipoproteinlipase hydrolysiert vor allem Triglyzeride zu freien Fettsäuren (FS) und führt zu einer vermehrten Aufnahme dieser in die Zellen [Beisiegel & Heeren, 1997]. Dass freie FS die Insulinresistenzentstehung fördern, ist im Menschen und im Mausmodell gezeigt worden [Roden et al., 1996; Nguyen et al., 2005]. In den meisten Zellkulturexperimenten, in denen die proinflammatorischen Effekte der freien FS auf Adipozyten untersucht wurden, wurden die Adipozyten direkt mit FS in hohen Konzentrationen inkubiert, was einem unphysiologischen Zustand entspricht [Ajuwon & Spurlock, 2005; Nguyen et al., 2005; Shi et al., 2006; Xi et al., 2007]. Deshalb wurde für diese Experimente der Ansatz ausgewählt, dass die FS aus den postprandialen Lipiden freigesetzt werden. Wie bei diesem Experiment konnte in humanen Adipozyten beobachtet werden, dass FS zur vermehrten IL-6-Transkription und -Sekretion führen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus im Zusammenhang mit der Insulinresistenzentstehung steht [Chung et al., 2005]. Auch MCP-1 wurde in Zusammenhang mit der Insulinresistenzentstehung gebracht, da es für die Makrophageninfiltration in das Fettgewebe verantwortlich gemacht wird [Bruun et al., 2005]. Die bei Übergewichtigen vermehrte MCP-1-Sekretion des Fettgewebes [Murdolo et al., 2007], wurde darauf zurückgeführt, dass die, durch Adipozyten stimulierten, Präadipozyten vermehrt MCP-1 sekretieren und somit die Makrophagenakkumulation fördern [Xu et al., 2003; Wellen & Hotamisligil, 2003]. Außerdem wurde beobachtet, dass Makrophagen

durch von Adipozyten sekretierte freien FS vermehrt MCP-1 transkribieren und sekretieren [Laine et al., 2007]. Bislang wurde nicht gezeigt, dass freie FS auch in humanen Adipozyten zu einer vermehrten MCP-1-Sekretion führen. Hierbei scheint es sich um einen Regulationsmechanismus auf Proteinebene zu handeln, da bei unbeeinflusster Expression die Sekretion gesteigert wird. Dass die Adiponektintranskription und -sekretion unbeeinflusst von FS bleibt, war nicht zu erwarten, da in murinen Adipozyten gezeigt werden konnte, dass unterschiedliche FS die Expression und Sekretion von Adiponektin vermindern [Xi et al., 2007; Bueno et al., 2008]. Außerdem wurde beschrieben, dass mehrfach ungesättigte FS, unabhängig von der Nahrungsaufnahme und dem Übergewicht, zu erhöhten Adiponektinspiegeln bei hochkalorisch ernährten Mäusen führen, was ein Indiz dafür ist, dass Adiponektin durch FS reguliert wird [Flachs et al., 2006]. Da verschiedene FS unterschiedliche Effekte auf murine Adipozyten haben und die in den Experimenten freigesetzten FS keinen Einfluss auf die Adiponektinsekretion hatten, wird es nötig sein, den Einfluss verschiedener FS auf hMSC-Tert-Adipozyten zu untersuchen.

Ein 2 ng/mL TNF- α Stimulus führte zu einer vergleichbaren Steigerung der IL-6-Transkription, sowie der IL-6- und MCP-1-Sekretion, wie die Inkubation mit freien FS. Die Transkription von MCP-1 wurde gesteigert, die von Adiponektin verringert. Die Adiponektinsekretion blieb unbeeinflusst (Abbildung 3.10 & 3.11). Die in den Experimenten gesehenen TNF- α Effekte auf die Expression und Transkription von IL-6 und MCP-1 wurden von Wang & Trayhurn in kultivierten, subkutanen, humanen Adipozyten beschrieben [Wang et al., 2005; Wang & Trayhurn, 2006]. TNF- α verminderte die Adiponektinexpression wie es beschrieben wurde, jedoch führte es nicht zur erwarteten Abnahme der Sekretion [Wang et al., 2005; Wang & Trayhurn, 2006; Simons et al., 2007].

TNF- α und freie FS regulieren die IL-6-Transkription und -Sekretion in gleicher Intensität, was auf einen ähnlichen Mechanismus hindeuten kann. Dass TNF- α , im Gegensatz zu freien FS, zusätzlich zur Steigerung der MCP-1-Sekretion auch die -Transkription beeinflusst, lässt auf einen anderen Mechanismus schließen. Um den Mechanismus zu

charakterisieren, wurde der NF- κ B-Signalweg inhibiert, da er mit der Insulinresistenzentstehung in Zusammenhang gebracht wurde und zusätzlich beschrieben wurde, dass über ihn die IL-6- und MCP-1-Gene reguliert werden [Shoelson et al., 2007]. Außerdem vermittelt der NF- κ B-Signalweg die TNF- α induzierten Lipolyse in humanen Adipozyten [Laurencikiene et al., 2007]. Die durch freie FS induzierte Transkription und Sekretion von IL-6, sowie die Sekretion von MCP-1, werden über den NF- κ B-Signalweg vermittelt. Adiponektin wird nicht über diesen Signalweg reguliert (Abbildung 3.10 & 3.11). In murinen Adipozyten wurde beschrieben, dass Palmitat über den NF- κ B-Signalweg die IL-6-Transkription und -Sekretion induziert [Ajuwon & Spurlock, 2005]. Dasselbe wurde für konjugierte Linolsäure in primären, humanen Adipozyten nachgewiesen [Chung et al., 2005]. Für MCP-1 wurde dies in Adipozyten bislang nicht beobachtet. Im explantierten, kultivierten, humanen Fettgewebe konnte gezeigt werden, dass MCP-1 aufgrund endogener TNF- α Abgabe vermehrt sekretiert wurde und dies über den NF- κ B-Signalweg reguliert wurde. Dieser Effekt wurde jedoch auf die stromavaskulären Zellen und die Makrophagen zurückgeführt [Fain & Madan et al., 2005]. In humanen Makrophagen wurde beschrieben, dass Palmitat die MCP-1-Expression via NF- κ B induziert [Laine et al., 2007]. Es erscheint logisch, dass Adipoyten und Makrophagen synergistisch auf FS reagieren und die MCP-1-Sekretion steigern, da sie phylogenetisch einem gemeinsamen Ursprung entstammen [Hotamisligil, 2006]. Dass TNF- α die Adiponektintranskription und -sekretion vermindert, ist zwar beschrieben worden [Hector et al., 2007], ein Signalweg über den dieses reguliert wird, konnte allerdings bislang nicht entdeckt werden. In den hMSC-Tert-Adipozyten ist es nicht der NF- κ B-Signalweg. Für die Signaltransduktion der FS vermittelten Entzündungsreaktion scheint ein Unterschied zwischen humanen und murinen Adipozyten zu bestehen. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass dieser Effekt vor allem über JNK reguliert wird [Hirosumi et al., 2002; Nguyen et al., 2005], die Experimente dieser Arbeit zeigen jedoch, dass dies in humanen Adipozyten über NF- κ B vermittelt wird. Mit der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch FS wurde im murinen Zellmodell die Aktivierung des TLR4 in Verbindung gebracht [Shi et al.,

2006]. Der TLR4 vermittelt hauptsächlich die angeborene Immunantwort und bindet das LPS gramnegativer Bakterien [O'Neill, 2004]. In den hMSC-Tert-Adipozyten kann die Inkubation mit LPS nicht eine annähernd so starke Entzündungsreaktion hervor rufen wie TNF- α und die FS (Abbildung 3.12). In humanen Adipozyten wurde gezeigt, dass LPS die IL-6-Sekretion in gleichem Maße wie in dieser Arbeit induziert [Hoch et al., 2008]. *Chung et al.* beschrieben, dass vor allem die Präadipozyten die LPS induzierte Entzündung im humanen Fettgewebe medieren [Chung et al., 2006]. Dass LPS die MCP-1-Sekretion auch in humanen Adipozyten induziert, wurde bisher nicht belegt. Es scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, dass TLR4 die FS induzierte Aktivierung von NF- κ B vermittelt, wie es in murinen Zellmodellen beschrieben wurde [Shi et al., 2006; Song et al., 2006; Suganami et al., 2007].

Im nächsten Schritt wäre zu untersuchen, ob dieser Effekt über den TLR2 vermittelt wird. Der TLR2, der für die angeborene Immunantwort bakterielles Lipoprotein, Lipoteichonsäure, und Peptidoglykane grampositiver Bakterien erkennt, wird auf humanen Adipozyten exprimiert. Da er bei Aktivierung zu einer starken Entzündungsreaktion in den Adipozyten führt, wurde für das Fettgewebe eine Rolle in der angeborenen Immunantwort postuliert [Bès-Houtmann et al., 2007]. Im murinen Zellmodell wurde beschrieben, dass freie FS über den TLR2 die TNF- α Expression induzieren und somit eine Insulinresistenzentstehung fördern [Murakami et al., 2007; Kubota et al., 2008]. Ein weiterer Mechanismus, der in Frage kommt, ist, dass freie FS zu intrazellulärem Stress und dort vor allem zu Stress im endoplasmatischen Retikulum führen [Guo et al., 2007]. Dieser Stress kann den NF- κ B-Signalweg aktivieren und somit fördernd auf die Insulinresistenzentstehung wirken [Wang et al., 2002; Gregor & Hotamisligil, 2007]. Die Entstehung der Insulinresistenz beruht auf einem Zusammenspiel vieler Komponenten, die erst teilweise und unvollständig charakterisiert wurden. Es werden sicherlich noch eine Reihe von Untersuchungen nötig sein, um die pathologischen Mechanismen auf zellulärer Ebene vollständig erklären zu können.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der insulinresistenzfördernden Adipozytokinsekretion anhand der Transkription und Sekretion von RBP4, IL-6, MCP-1 und Adiponektin in adipozytär differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen. Im Mausmodell wurde ein direkter Einfluss von RBP4 auf die Insulinresistenzentstehung beobachtet. Diese Arbeit zeigt, dass es differenzierungsabhängig von den hMSC-Tert-Adipozyten transkribiert und sekretiert wird, was dafür spricht, dass es adipozytenspezifisch ist. VLDL führen in den Adipozyten zu einer gesteigerten RBP4-Sekretion bei verminderter Transkription. Beim *Metabolischen Syndrom* führt die Triglyzerideinlagerung in die Leber zu einer stark vermehrten VLDL-Sekretion mit steigenden Plasmakonzentrationen. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass RBP4 mit VLDL im Plasma korreliert, was durch den beobachteten Mechanismus, dass die Adipozyten VLDL-abhängig RBP4 sekretierten, erklärt werden kann. Bestandteile der VLDL wie Lipide, Retinol-Palmitat und Fettsäuren veränderten die RBP4-Sekretion nicht. Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und MCP-1 werden durch Inkubation der hMSC-Tert-Adipozyten mit hydrolysierten Lipiden vermehrt sekretiert. IL-6 wird zusätzlich vermehrt transkribiert. Diese durch Fettsäuren ausgelöste Entzündungsreaktion wird über den NF- κ B-Signalweg reguliert. In murinen Zellmodellen ist beschrieben worden, dass Fettsäuren den NF- κ B-Signalweg über Bindung des TLR4 aktivieren. Dieser kann jedoch in den hMSC-Tert-Adipozyten durch Inkubation mit LPS keine vergleichbare Entzündungsreaktion hervorrufen, was auf eine unterschiedliche Regulation in humanen und murinen Adipozyten hindeutet. Die Adiponektintranskription und -sekretion bleibt unbeeinflusst von den hydrolysierten Lipiden. Die durch TNF- α verminderte Adiponektintranskription wird nicht über den NF- κ B-Signalweg reguliert. Die Adiponektinsekretion bleibt entgegen der in der Literatur vertretenen Meinung unbeeinflusst. Diese Arbeit legt die enge Verknüpfung metabolischer und inflammatorischer Einflüsse dar, die die Insulinresistenzentstehung in humanen Adipozyten beeinflussen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Überschneidungen metabolischer und entzündlicher Signalwege	6
Abbildung 1.2: Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TLR4.....	7
Abbildung 1.3: Adipozyten regulieren den Glukosestoffwechsel in Leber und Skelettmuskel via RBP4	10
Abbildung 1.4: Transport und Speicherung von Vitamin A	13
Abbildung 2.1: 14-tägige adipozytäre Differenzierung der hMSC-Tert.....	22
Abbildung 2.2: 21-tägige adipozytäre Differenzierung der hMSC-Tert.....	23
Abbildung 3.1: Lipidakkumulation während der Differenzierung	37
Abbildung 3.2: Differenzierungsabhängige RBP4-Expression	39
Abbildung 3.3: Differenzierungsabhängige RBP4-Sekretion	40
Abbildung 3.4: Inkubation mit VLDL (Transkriptionsebene)	41
Abbildung 3.5: Inkubation mit VLDL (Sekretionsebene)	42
Abbildung 3.6: Inkubation mit Liposomen und Retinol-Palmitat	43
Abbildung 3.7: Inkubation der Liposomen mit Lipoproteinlipase (Transkriptionsebene).....	44
Abbildung 3.8: Inkubation der Liposomen mit Lipoproteinlipase (Sekretionsebene)	45
Abbildung 3.9: Fettsäureabhängige Sekretion der Adipozytokine	47
Abbildung 3.10: Inhibition des NF- κ B-Signalweges (Transkriptionsebene)	50
Abbildung 3.11: Inhibition des NF- κ B-Signalweges (Sekretionsebene) ...	52
Abbildung 3.12: Aktivierung des TLR4	54

Literaturverzeichnis

Abdallah, B. M.; Haack-Sørensen, M.; Burns, J. S.; Elsnab, B.; Jakob, F.; Hokland, P. & Kassem, M. (2005), 'Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation.', *Biochem Biophys Res Commun* 326(3), 527-538.

Ajuwon, K. M. & Spurlock, M. E. (2005), 'Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes.', *J Nutr* 135(8), 1841-1846.

Alexandraki, K.; Piperi, C.; Kalofoutis, C.; Singh, J.; Alaveras, A. & Kalofoutis, A. (2006), 'Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines.', *Ann N Y Acad Sci* 1084, 89-117.

Bajzová, M.; Kovaciková, M.; Vitková, M.; Klimcaková, E.; Polak, J.; Kovacová, Z.; Viguerie, N.; Vedral, T.; Mikulá?ek, L.; Sramková, P.; Srp, A.; Hejnová, J.; Langin, D. & Stich, V. (2007), 'Retinol -binding protein 4 expression in visceral and subcutaneous fat in human obesity.', *Physiol Res*, Epub ahead of print, DOI: 18052678.

Balagopal, P.; Graham, T. E.; Kahn, B. B.; Altomare, A.; Funanage, V. & George, D. (2007), 'Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(5), 1971-1974.

Batsis, J. A.; Nieto-Martinez, R. E. & Lopez-Jimenez, F. (2007), 'Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine.', *Clin Pharmacol Ther* 82(5), 509-524.

Beisiegel, U. & Heeren, J. (1997), 'Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors.', *Proc Nutr Soc* 56(2), 731-737.

Bentzon, J. F.; Stenderup, K.; Hansen, F. D.; Schroder, H. D.; Abdallah, B. M.; Jensen, T. G. & Kassem, M. (2005), 'Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene.', *Biochem Biophys Res Commun* 330(3), 633-640.

Berni, R.; Clerici, M.; Malpeli, G.; Cleris, L. & Formelli, F. (1993), 'Retinoids: in vitro interaction with retinol-binding protein and influence on plasma retinol.', *FASEB J* 7(12), 1179-1184.

Bès-Houtmann, S.; Roche, R.; Hoareau, L.; Gonthier, M.; Festy, F.; Caillens, H.; Gasque, P.; d'Hellencourt, C. L. & Cesari, M. (2007), 'Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes.', *Histochem Cell Biol* 127(2), 131-137.

Björnholm, M. & Zierath, J. R. (2005), 'Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes.', *Biochem Soc Trans* 33(Pt 2), 354-357.

Blaner, W. S.; Obunike, J. C.; Kurlandsky, S. B.; al-Haideri, M.; Piantedosi, R.; Deckelbaum, R. J. & Goldberg, I. J. (1994), 'Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells.', *J Biol Chem* 269(24), 16559-16565.

Blüher, S.; Kratzsch, J. & Kiess, W. (2005), 'Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue.', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19(4), 577-587.

Bouloumié, A.; Curat, C. A.; Sengenès, C.; Lolmède, K.; Miranville, A. & Busse, R. (2005), 'Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases.', *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(4), 347-354.

Bruun, J. M.; Lihn, A. S.; Pedersen, S. B. & Richelsen, B. (2005), 'Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT.', *J Clin Endocrinol Metab* 90(4), 2282-2289.

Bueno, A. A.; Oyama, L. M.; de Oliveira, C.; Pisani, L. P.; Ribeiro, E. B.; Silveira, V. L. F. & do Nascimento, C. M. O. (2008), 'Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue.', *Pflugers Arch* 455(4), 701-709.

Carey, A. L.; Bruce, C. R.; Sacchetti, M.; Anderson, M. J.; Olsen, D. B.; Saltin, B.; Hawley, J. A. & Febbraio, M. A. (2004), 'Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness.', *Diabetologia* 47(6), 1029-1037.

Carpenter, S. & O'Neill, L. A. J. (2007), 'How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses?', *Cell Microbiol* 9(8), 1891--1901.

Chacón, M. R.; Fernández-Real, J. M.; Richart, C.; Megía, A.; Gómez, J. M.; Miranda, M.; Caubet, E.; Pastor, R.; Masdevall, C.; Vilarrasa, N.; Ricard, W. & Vendrell, J. (2007), 'Monocyte chemoattractant protein-1 in obesity and type 2 diabetes. Insulin sensitivity study.', *Obesity (Silver Spring)* 15(3), 664-672.

Chambon, P. (1996), 'A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.', *FASEB J* 10(9), 940-954.

Chen, L.; Egan, L.; Li, Z.; Greten, F. R.; Kagnoff, M. F. & Karin, M. (2003), 'The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion.', *Nat Med* 9(5), 575-581.

Cho, Y. M.; Youn, B.; Lee, H.; Lee, N.; Min, S.; Kwak, S. H.; Lee, H. K. & Park, K. S. (2006), 'Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes.', *Diabetes Care* 29(11), 2457-2461.

Christensen, E. I.; Moskaug, J. O.; Vorum, H.; Jacobsen, C.; Gundersen, T. E.; Nykjaer, A.; Blomhoff, R.; Willnow, T. E. & Moestrup, S. K. (1999), 'Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol.', *J Am Soc Nephrol* 10(4), 685-695.

Chung, S.; Brown, J. M.; Provo, J. N.; Hopkins, R. & McIntosh, M. K. (2005), 'Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NFkappaB-dependent cytokine production.', *J Biol Chem* 280(46), 38445-38456.

Chung, S.; Lapoint, K.; Martinez, K.; Kennedy, A.; Sandberg, M. B. & McIntosh, M. K. (2006), 'Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes.', *Endocrinology* 147(11), 5340-5351.

Coppack, S. W. (2005), 'Adipose tissue changes in obesity.', *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5), 1049-1052.

Coppack, S. W. (2001), 'Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue.', *Proc Nutr Soc* 60(3), 349-356.

Demacker, P. N.; Hectors, M. P. & Stalenhoef, A. F. (2000), 'Chylomicron processing in familial dysbetalipoproteinemia and familial combined hyperlipidemia studied with vitamin A and E as markers: a new physiological concept.', *Atherosclerosis* 149(1), 169-180.

Desvergne, B. (2007), 'Retinaldehyde: more than meets the eye.', *Nat Med* 13(6), 671-673.

Duncia, J. V.; Santella, J. B.; Higley, C. A.; Pitts, W. J.; Wityak, J.; Fietze, W. E.; Rankin, F. W.; Sun, J. H.; Earl, R. A.; Tabaka, A. C.; Teleha, C. A.; Blom, K. F.; Favata, M. F.; Manos, E. J.; Daulerio, A. J.; Stradley, D. A.; Horiuchi, K.; Copeland, R. A.; Scherle, P. A.; Trzaskos, J. M.; Magolda, R. L.; Trainor, G. L.; Wexler, R. R.; Hobbs, F. W. & Olson, R. E. (1998), 'MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products.', *Bioorg Med Chem Lett* 8(20), 2839-2844.

During, A. & Harrison, E. H. (2007), 'Mechanisms of provitamin a (Carotenoid) and vitamin a (Retinol) transport into and out of intestinal CACO-2 cells.', *J Lipid Res* 48(10), 2283-2294.

Elks, M. L. & Manganiello, V. C. (1985), 'A role for soluble cAMP phosphodiesterases in differentiation of 3T3-L1 adipocytes.', *J Cell Physiol* 124(2), 191-198.

von Eynatten, M.; Lepper, P. M.; Liu, D.; Lang, K.; Baumann, M.; Nawroth, P. P.; Bierhaus, A.; Dugi, K. A.; Heemann, U.; Allolio, B. & Humpert, P. M. (2007), 'Retinol-binding protein 4 is associated with components of the metabolic syndrome, but not with insulin resistance, in men with type 2 diabetes or coronary artery disease.', *Diabetologia* 50(9), 1930-1937.

Fain, J. N. & Madan, A. K. (2005), 'Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) release by explants of human visceral adipose tissue.', *Int J Obes (Lond)* 29(11), 1299-1307.

Fernández-Real, J. M. & Ricart, W. (2003), 'Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome.', *Endocr Rev* 24(3), 278-301.

Flachs, P.; Mohamed-Ali, V.; Horakova, O.; Rossmeisl, M.; Hosseinzadeh-Attar, M. J.; Hensler, M.; Ruzickova, J. & Kopecky, J. (2006), 'Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet.', *Diabetologia* 49(2), 394-397.

Ford, E. S.; Mokdad, A. H.; Giles, W. H. & Brown, D. W. (2003), 'The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey.', *Diabetes* 52(9), 2346-2352.

Gamble, M. V.; Ramakrishnan, R.; Palafox, N. A.; Briand, K.; Berglund, L. & Blaner, W. S. (2001), 'Retinol binding protein as a surrogate measure for serum retinol: studies in vitamin A-deficient children from the Republic of the Marshall Islands.', *Am J Clin Nutr* 73(3), 594-601.

Gardiner, D. M.; Waring, P. & Howlett, B. J. (2005), 'The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis.', *Microbiology* 151(Pt 4), 1021-1032.

Garrison, J. B.; Shaw, Y.; Chen, C. & Kyprianou, N. (2007), 'Novel quinazoline-based compounds impair prostate tumorigenesis by targeting tumor vascularity.', *Cancer Res* 67(23), 11344-11352.

Gavi, S.; Stuart, L. M.; Kelly, P.; Melendez, M. M.; Mynarcik, D. C.; Gelato, M. C. & McNurlan, M. A. (2007), 'Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(5), 1886-1890.

Giannessi, D.; Maltinti, M. & Ry, S. D. (2007), 'Adiponectin circulating levels: A new emerging biomarker of cardiovascular risk.', *Pharmacol Res* 56(6), 459-467.

Goldberg, I. J.; Scheraldi, C. A.; Yacoub, L. K.; Saxena, U. & Bisgaier, C. L. (1990), 'Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV.', *J Biol Chem* 265(8), 4266-4272.

Graham, T. E.; Yang, Q.; Blüher, M.; Hammarstedt, A.; Ciaraldi, T. P.; Henry, R. R.; Wason, C. J.; Oberbach, A.; Jansson, P.; Smith, U. & Kahn, B. B. (2006), 'Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects.', *N Engl J Med* 354(24), 2552-2563.

Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. (2007), 'Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease.', *J Lipid Res* 48(9), 1905-1914.

Guo, W.; Wong, S.; Xie, W.; Lei, T. & Luo, Z. (2007), 'Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes.', *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2), E576-E586.

Guzik, T. J.; Mangalat, D. & Korbust, R. (2006), 'Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function?', *J Physiol Pharmacol* 57(4), 505-528.

Haider, D. G.; Schindler, K.; Prager, G.; Bohdjalian, A.; Luger, A.; Wolzt, M. & Ludvik, B. (2007), 'Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(3), 1168-1171.

Harrison, E. H. (2005), 'Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A.', *Annu Rev Nutr* 25, 87-103.

Hector, J.; Schwarzloh, B.; Goehring, J.; Strate, T. G.; Hess, U. F.; Deuretzbacher, G.; Hansen-Algenstaedt, N.; Beil, F. & Algenstaedt, P. (2007), 'TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat.', *Horm Metab Res* 39(4), 250-255.

Heeren, J.; Niemeier, A.; Merkel, M. & Beisiegel, U. (2002), 'Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo.', *J Mol Med* 80(9), 576-584.

Herold, G. (2006), *Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung*, 614-626.

Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Görgün, C. Z.; Uysal, K. T.; Maeda, K.; Karin, M. & Hotamisligil, G. S. (2002), 'A central role for JNK in obesity and insulin resistance.', *Nature* 420(6913), 333-336.

Hoch, M.; Eberle, A. N.; Peterli, R.; Peters, T.; Seboek, D.; Keller, U.; Muller, B. & Linscheid, P. (2008), 'LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor-alpha in human adipocytes.', *Cytokine* 41(1), 29-37.

van het Hof, K. H.; West, C. E.; Weststrate, J. A. & Hautvast, J. G. (2000), 'Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids.', *J Nutr* 130(3), 503-506.

- Hotamisligil, G. S. (2006), 'Inflammation and metabolic disorders.', *Nature* 444(7121), 860-867.
- Hotamisligil, G. S. (2003), 'Inflammatory pathways and insulin action.', *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3, S53-S55.
- Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. (1993), 'Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance.', *Science* 259(5091), 87-91.
- Hu, E.; Kim, J. B.; Sarraf, P. & Spiegelman, B. M. (1996), 'Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ .', *Science* 274(5295), 2100-2103.
- Hurst, S. M.; Wilkinson, T. S.; McLoughlin, R. M.; Jones, S.; Horiuchi, S.; Yamamoto, N.; Rose-John, S.; Fuller, G. M.; Topley, N. & Jones, S. A. (2001), 'IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation.', *Immunity* 14(6), 705-714.
- Janke, J.; Engeli, S.; Boschmann, M.; Adams, F.; Böhnke, J.; Luft, F. C.; Sharma, A. M. & Jordan, J. (2006), 'Retinol-binding protein 4 in human obesity.', *Diabetes* 55(10), 2805-2810.
- Jia, W.; Wu, H.; Bao, Y.; Wang, C.; Lu, J.; Zhu, J. & Xiang, K. (2007), 'Association of serum retinol-binding protein 4 and visceral adiposity in Chinese subjects with and without type 2 diabetes.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(8), 3224-3229.
- Jones, S. A. (2005), 'Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6.', *J Immunol* 175(6), 3463-3468.
- Jones, S. A.; Horiuchi, S.; Topley, N.; Yamamoto, N. & Fuller, G. M. (2001), 'The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease.', *FASEB J* 15(1), 43-58.
- Jones, S. A. & Rose-John, S. (2002), 'The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex.', *Biochim Biophys Acta* 1592(3), 251-263.
- Kadowaki, T.; Yamauchi, T. & Kubota, N. (2008), 'The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS.', *FEBS Lett* 582(1), 74-80.
- Kahn, S. E.; Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. (2006), 'Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.', *Nature* 444(7121), 840-846.

Kamei, N.; Tobe, K.; Suzuki, R.; Ohsugi, M.; Watanabe, T.; Kubota, N.; Ohtsuka-Kowatari, N.; Kumagai, K.; Sakamoto, K.; Kobayashi, M.; Yamauchi, T.; Ueki, K.; Oishi, Y.; Nishimura, S.; Manabe, I.; Hashimoto, H.; Ohnishi, Y.; Ogata, H.; Tokuyama, K.; Tsunoda, M.; Ide, T.; Murakami, K.; Nagai, R. & Kadowaki, T. (2006), 'Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance.', *J Biol Chem* 281(36), 26602-26614.

Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Miyachi, H.; Maeda, S.; Egashira, K. & Kasuga, M. (2006), 'MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity.', *J Clin Invest* 116(6), 1494-1505.

Karylowski, O.; Zeigerer, A.; Cohen, A. & McGraw, T. E. (2004), 'GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes.', *Mol Biol Cell* 15(2), 870-882.

Kawaguchi, R.; Yu, J.; Honda, J.; Hu, J.; Whitelegge, J.; Ping, P.; Wiita, P.; Bok, D. & Sun, H. (2007), 'A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A.', *Science* 315(5813), 820-825.

Keil, E. & Fiedler, H. (2000), *Klinische Chemie systematisch*, UNI-MED Verlag, 63.

Kershaw, E. E. & Flier, J. S. (2004), 'Adipose tissue as an endocrine organ.', *J Clin Endocrinol Metab* 89(6), 2548-2556.

Kersten, S.; Desvergne, B. & Wahli, W. (2000), 'Roles of PPARs in health and disease.', *Nature* 405(6785), 421-424.

Khan, A. H. & Pessin, J. E. (2002), 'Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways.', *Diabetologia* 45(11), 1475-1483.

Kiechl, S.; Lorenz, E.; Reindl, M.; Wiedermann, C. J.; Oberhollenzer, F.; Bonora, E.; Willeit, J. & Schwartz, D. A. (2002), 'Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis.', *N Engl J Med* 347(3), 185-192.

Kikuchi, H.; Yamamoto, K.; Horoiwa, S.; Hirai, S.; Kasahara, R.; Hariguchi, N.; Matsumoto, M. & Oshima, Y. (2006), 'Exploration of a new type of antimalarial compounds based on febrifugine.', *J Med Chem* 49(15), 4698-4706.

Koistinen, H. A.; Remitz, A.; Gylling, H.; Miettinen, T. A.; Koivisto, V. A. & Ebeling, P. (2001), 'Dyslipidemia and a reversible decrease in insulin sensitivity induced by therapy with 13-cis-retinoic acid.', *Diabetes Metab Res Rev* 17(5), 391-395.

Kotronen, A. & Yki-Järvinen, H. (2008), 'Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome.', *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(1), 27-38.

Kristiansen, O. P. & Mandrup-Poulsen, T. (2005), 'Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?', *Diabetes* 54 Suppl 2, S114-S124.

Kubota, Y.; Unoki, H.; Bujo, H.; Rikihisa, N.; Udagawa, A.; Yoshimoto, S.; Ichinose, M. & Saito, Y. (2008), 'Low-dose GH supplementation reduces the TLR2 and TNF-alpha expressions in visceral fat.', *Biochem Biophys Res Commun* 368(1), 81-87.

Laine, P. S.; Schwartz, E. A.; Wang, Y.; Zhang, W.; Karnik, S. K.; Musi, N. & Reaven, P. D. (2007), 'Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF-kappaB activation.', *Biochem Biophys Res Commun* 358(1), 150-155.

Laurencikiene, J.; van Harmelen, V.; Nordström, E. A.; Dicker, A.; Blomqvist, L.; Näslund, E.; Langin, D.; Arner, P. & Rydén, M. (2007), 'NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes.', *J Lipid Res* 48(5), 1069-1077.

Lee, Y. H. & White, M. F. (2004), 'Insulin receptor substrate proteins and diabetes.', *Arch Pharm Res* 27(4), 361-370.

Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1996), 'The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.', *Cell* 86(6), 973-983.

Li, E. & Tso, P. (2003), 'Vitamin A uptake from foods.', *Curr Opin Lipidol* 14(3), 241-247.

Look AHEAD Research Group; Pi-Sunyer, Xavier; Blackburn, George; Brancati, Frederick L; Bray, George A; Bright, Renee; Clark, Jeanne M; Curtis, Jeffrey M; Espeland, Mark A; Foreyt, John P; Graves, Kathryn; Haffner, Steven M; Harrison, Barbara; Hill, James O; Horton, Edward S; Jakicic, John; Jeffery, Robert W; Johnson, Karen C; Kahn, Steven; Kelley, David E; Kitabchi, Abbas E; Knowler, William C; Lewis, Cora E; Maschak-Carey, Barbara J; Montgomery, Brenda; Nathan, David M; Patricio, Jennifer; Peters, Anne; Redmon, J. Bruce; Reeves, Rebecca S; Ryan, Donna H; Safford, Monika; Dorsten, Brent Van; Wadden, Thomas A; Wagenknecht, Lynne; Wesche-Thobaben, Jacqueline; Wing, Rena R & Yanovski, Susan Z (2007), 'Reduction in weight and cardiovascular disease risk factors in individuals with type 2 diabetes: one-year results of the look AHEAD trial.', *Diabetes Care* 30(6), 1374-1383.

Lookene, A.; Skottova, N. & Olivecrona, G. (1994), 'Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat).', *Eur J Biochem* 222(2), 395-403.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), 'Protein measurement with the Folin phenol reagent.', *J Biol Chem* 193(1), 265-275.

Lusis, A. J. (2000), 'Atherosclerosis.', *Nature* 407(6801), 233-241.

Mackay, C. R. (2001), 'Chemokines: immunology's high impact factors.', *Nat Immunol* 2(2), 95-101.

Majali, K. A.; Cooper, M. B.; Staels, B.; Luc, G.; Taskinen, M. & Betteridge, D. J. (2006), 'The effect of sensitisation to insulin with pioglitazone on fasting and postprandial lipid metabolism, lipoprotein modification by lipases, and lipid transfer activities in type 2 diabetic patients.', *Diabetologia* 49(3), 527-537.

Martin, O. J.; Lee, A. & McGraw, T. E. (2006), 'GLUT4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin-modulated bipartite dynamic mechanism.', *J Biol Chem* 281(1), 484-490.

McCarthy, A. M. & Elmendorf, J. S. (2007), 'GLUT4's itinerary in health & disease.', *Indian J Med Res* 125(3), 373-388.

McLoughlin, R. M.; Hurst, S. M.; Nowell, M. A.; Harris, D. A.; Horiuchi, S.; Morgan, L. W.; Wilkinson, T. S.; Yamamoto, N.; Topley, N. & Jones, S. A. (2004), 'Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms.', *J Immunol* 172(9), 5676-5683.

Mine, S.; Okada, Y.; Tanikawa, T.; Kawahara, C.; Tabata, T. & Tanaka, Y. (2006), 'Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus.', *Biochem Biophys Res Commun* 344(3), 780-785.

Murakami, K.; Bujo, H.; Unoki, H. & Saito, Y. (2007), 'High fat intake induces a population of adipocytes to co-express TLR2 and TNF α in mice with insulin resistance.', *Biochem Biophys Res Commun* 354(3), 727-734.

Murdolo, G.; Hammarstedt, A.; Sandqvist, M.; Schmelz, M.; Herder, C.; Smith, U. & Jansson, P. (2007), 'Monocyte chemoattractant protein-1 in subcutaneous abdominal adipose tissue: characterization of interstitial concentration and regulation of gene expression by insulin.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(7), 2688-2695.

Murdolo, G. & Smith, U. (2006), 'The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis.', *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1, S35-S38.

N'soukpoé-Kossi, C. N.; Sedaghat-Herati, R.; Ragi, C.; Hotchandani, S. & Tajmir-Riahi, H. A. (2007), 'Retinol and retinoic acid bind human serum albumin: stability and structural features.', *Int J Biol Macromol* 40(5), 484-490.

Napoli, J. L. (1999), 'Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism.', *Biochim Biophys Acta* 1440(2-3), 139-162.

Ng, T. W. K.; Watts, G. F.; Barrett, P. H. R.; Rye, K. & Chan, D. C. (2007), 'Effect of weight loss on LDL and HDL kinetics in the metabolic syndrome: associations with changes in plasma retinol-binding protein-4 and adiponectin levels.', *Diabetes Care* 30(11), 2945-2950.

Nguyen, M. T. A.; Satoh, H.; Favelyukis, S.; Babendure, J. L.; Imamura, T.; Sbodio, J. I.; Zalevsky, J.; Dahiyat, B. I.; Chi, N. & Olefsky, J. M. (2005), 'JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes.', *J Biol Chem* 280(42), 35361-35371.

O'Neill, L. A. J. (2004), 'Immunology. After the toll rush.', *Science* 303(5663), 1481-1482.

Öst, A.; Danielsson, A.; Lidén, M.; Eriksson, U.; Nystrom, F. H. & Strålfors, P. (2007), 'Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes.', *FASEB J* 21(13), 3696-3704.

Pahl, H. L.; Krauss, B.; Schulze-Osthoff, K.; Decker, T.; Traenckner, E. B.; Vogt, M.; Myers, C.; Parks, T.; Warring, P.; Mühlbacher, A.; Czernilofsky, A. P. & Baeuerle, P. A. (1996), 'The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB.', *J Exp Med* 183(4), 1829-1840.

Pajvani, U. B.; Hawkins, M.; Combs, T. P.; Rajala, M. W.; Doebber, T.; Berger, J. P.; Wagner, J. A.; Wu, M.; Knopps, A.; Xiang, A. H.; Utzschneider, K. M.; Kahn, S. E.; Olefsky, J. M.; Buchanan, T. A. & Scherer, P. E. (2004), 'Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity.', *J Biol Chem* 279(13), 12152-12162.

Pickup, J. C. (2004), 'Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes.', *Diabetes Care* 27(3), 813-823.

Power, C. A.; Meyer, A.; Nemeth, K.; Bacon, K. B.; Hoogewerf, A. J.; Proudfoot, A. E. & Wells, T. N. (1995), 'Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line.', *J Biol Chem* 270(33), 19495-19500.

Prawitt, J.; Niemeier, A.; Kassem, M.; Beisiegel, U. & Heeren, J. (2008), 'Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells.', *Exp Cell Res* 314(4) 814-824.

Promintzer, M.; Krebs, M.; Todoric, J.; Luger, A.; Bischof, M. G.; Nowotny, P.; Wagner, O.; Esterbauer, H. & Anderwald, C. (2007), 'Insulin Resistance is Unrelated to Circulating Retinol Binding Protein and Protein C Inhibitor.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(11), 4306-4312.

Rajala, M. W. & Scherer, P. E. (2003), 'Minireview: The adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis.', *Endocrinology* 144(9), 3765-3773.

Renz-Polster (2004), *Basislehrbuch Innere Medizin*, Urban & Fischer, 3. Auflage, 803-804.

Roden, M.; Price, T. B.; Perseghin, G.; Petersen, K. F.; Rothman, D. L.; Cline, G. W. & Shulman, G. I. (1996), 'Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.', *J Clin Invest* 97(12), 2859-2865.

Rodondi, N.; Darioli, R.; Ramelet, A.; Hohl, D.; Lenain, V.; Perdrix, J.; Wietlisbach, V.; Riesen, W. F.; Walther, T.; Medinger, L.; Nicod, P.; Desvergne, B. & Mooser, V. (2002), 'High risk for hyperlipidemia and the metabolic syndrome after an episode of hypertriglyceridemia during 13-cis retinoic acid therapy for acne: a pharmacogenetic study.', *Ann Intern Med* 136(8), 582-589.

Rollins, B. J. (1997), 'Chemokines.', *Blood* 90(3), 909-928.

Rossi, D. & Zlotnik, A. (2000), 'The biology of chemokines and their receptors.', *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.

Saltiel, A. R. (2000), 'Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases.', *J Clin Invest* 106(2), 163-164.

Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. (2001), 'Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.', *Nature* 414(6865), 799-806.

Scheller, J.; Ohnesorge, N. & Rose-John, S. (2006), 'Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer.', *Scand J Immunol* 63(5), 321-329.

Scherer, P. E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G. & Lodish, H. F. (1995), 'A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes.', *J Biol Chem* 270(45), 26746-26749.

Schmitz-Peiffer, C. (2000), 'Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply.', *Cell Signal* 12(9-10), 583-594.

Scholz, D.; Cai, W. J. & Schaper, W. (2001), 'Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease.', *Angiogenesis* 4(4), 247-257.

Sell, H. & Eckel, J. (2007), 'Regulation of retinol binding protein 4 production in primary human adipocytes by adiponectin, troglitazone and TNF-alpha.', *Diabetologia* 50(10), 2221-2223.

Sesti, G. (2006), 'Pathophysiology of insulin resistance.', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20(4), 665-679.

Sha, W. C. (1998), 'Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor.', *J Exp Med* 187(2), 143-146.

Shepherd, P. R.; Gnudi, L.; Tozzo, E.; Yang, H.; Leach, F. & Kahn, B. B. (1993), 'Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue.', *J Biol Chem* 268(30), 22243-22246.

Shepherd, P. R. & Kahn, B. B. (1999), 'Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus.', *N Engl J Med* 341(4), 248-257.

Shi, H.; Kokoeva, M. V.; Inouye, K.; Tzamelis, I.; Yin, H. & Flier, J. S. (2006), 'TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.', *J Clin Invest* 116(11), 3015-3025.

Shoelson, S. E.; Herrero, L. & Naaz, A. (2007), 'Obesity, inflammation, and insulin resistance.', *Gastroenterology* 132(6), 2169-2180.

Shoelson, S. E.; Lee, J. & Goldfine, A. B. (2006), 'Inflammation and insulin resistance.', *J Clin Invest* 116(7), 1793-1801.

Siegenthaler (2005), *Differenzialdiagnose Innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose*, Georg Thieme Verlag KG, 19. vollständig neu bearbeitete Auflage, 40-42.

Simons, P. J.; van den Pangaart, P. S.; Aerts, J. M. F. G. & Boon, L. (2007), 'Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization.', *J Endocrinol* 192(2), 289-299.

Simonsen, J. L.; Rosada, C.; Serakinci, N.; Justesen, J.; Stenderup, K.; Rattan, S. I. S.; Jensen, T. G. & Kassem, M. (2002), 'Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells.', *Nat Biotechnol* 20(6), 592-596.

Singhal, V.; Schwenk, W. F. & Kumar, S. (2007), 'Evaluation and management of childhood and adolescent obesity.', *Mayo Clin Proc* 82(10), 1258-1264.

Smith, R. M.; Charron, M. J.; Shah, N.; Lodish, H. F. & Jarett, L. (1991), 'Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15), 6893-6897.

Song, M. J.; Kim, K. H.; Yoon, J. M. & Kim, J. B. (2006), 'Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes.', *Biochem Biophys Res Commun* 346(3), 739-745.

Spellman, C. W. (2007), 'Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus.', *J Am Osteopath Assoc* 107 Suppl, S1-S5.

Spranger, J.; Kroke, A.; Möhlig, M.; Hoffmann, K.; Bergmann, M. M.; Ristow, M.; Boeing, H. & Pfeiffer, A. F. H. (2003), 'Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study.', *Diabetes* 52(3), 812-817.

Stefan, N.; Hennige, A. M.; Staiger, H.; Machann, J.; Schick, F.; Schleicher, E.; Fritsche, A. & Häring, H. (2007), 'High circulating retinol-binding protein 4 is associated with elevated liver fat but not with total, subcutaneous, visceral, or intramyocellular fat in humans.', *Diabetes Care* 30(5), 1173-1178.

Suganami, T.; Tanimoto-Koyama, K.; Nishida, J.; Itoh, M.; Yuan, X.; Mizuarai, S.; Kotani, H.; Yamaoka, S.; Miyake, K.; Aoe, S.; Kamei, Y. & Ogawa, Y. (2007), 'Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages.', *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(1), 84-91.

Takebayashi, K.; Suetsugu, M.; Wakabayashi, S.; Aso, Y. & Inukai, T. (2007), 'Retinol binding protein-4 levels and clinical features of type 2 diabetes patients.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(7), 2712-2719.

Takeuchi, O. & Akira, S. (2001), 'Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system.', *Int Immunopharmacol* 1(4), 625-635.

Tamori, Y.; Sakaue, H. & Kasuga, M. (2006), 'RBP4, an unexpected adipokine.', *Nat Med* 12(1), 30-1; discussion 31.

Tanaka, Y.; Adams, D. H.; Hubscher, S.; Hirano, H.; Siebenlist, U. & Shaw, S. (1993), 'T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta.', *Nature* 361(6407), 79-82.

Tilg, H. & Moschen, A. R. (2006), 'Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.', *Nat Rev Immunol* 6(10), 772-783.

Tobe, M.; Isobe, Y.; Tomizawa, H.; Nagasaki, T.; Takahashi, H. & Hayashi, H. (2003), 'A novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation: structure-activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives.', *Bioorg Med Chem* 11(18), 3869-3878.

Tontonoz, P.; Hu, E. & Spiegelman, B. M. (1994), 'Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor.', *Cell* 79(7), 1147-1156.

Trujillo, M. E. & Scherer, P. E. (2005), 'Adiponectin-journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome.', *J Intern Med* 257(2), 167-175.

Tsuchida, A.; Yamauchi, T.; Ito, Y.; Hada, Y.; Maki, T.; Takekawa, S.; Kamon, J.; Kobayashi, M.; Suzuki, R.; Hara, K.; Kubota, N.; Terauchi, Y.; Froguel, P.; Nakae, J.; Kasuga, M.; Accili, D.; Tobe, K.; Ueki, K.; Nagai, R. & Kadowaki, T. (2004), 'Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity.', *J Biol Chem* 279(29), 30817-30822.

Tsutsumi, C.; Okuno, M.; Tannous, L.; Piantedosi, R.; Allan, M.; Goodman, D. S. & Blaner, W. S. (1992), 'Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes.', *J Biol Chem* 267(3), 1805-1810.

Ukkola, O. & Santaniemi, M. (2002), 'Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities?', *J Mol Med* 80(11), 696-702.

Villarroya, F.; Iglesias, R. & Giralt, M. (2004), 'Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes.', *Curr Med Chem* 11(6), 795-805.

Vitkova, M.; Klimcakova, E.; Kovacicova, M.; Valle, C.; Moro, C.; Polak, J.; Hanacek, J.; Capel, F.; Viguerie, N.; Richterova, B.; Bajzova, M.; Hejnova, J.; Stich, V. & Langin, D. (2007), 'Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(6), 2330-2335.

Wako, Y.; Suzuki, K.; Goto, Y. & Kimura, S. (1986), 'Vitamin A transport in plasma of diabetic patients.', *Tohoku J Exp Med* 149(2), 133-143.

Wang, B.; Jenkins, J. R. & Trayhurn, P. (2005), 'Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha.', *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(4), E731-E740.

Wang, B. & Trayhurn, P. (2006), 'Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture.', *Pflugers Arch* 452(4), 418-427.

Wang, T.; Zhang, X. & Li, J. J. (2002), 'The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses.', *Int Immunopharmacol* 2(11), 1509-1520.

Weisberg, S. P.; Hunter, D.; Huber, R.; Lemieux, J.; Slaymaker, S.; Vaddi, K.; Charo, I.; Leibel, R. L. & Ferrante, A. W. (2006), 'CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding.', *J Clin Invest* 116(1), 115-124.

Weisberg, S. P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R. L. & Ferrante, A. W. (2003), 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.', *J Clin Invest* 112(12), 1796-1808.

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. (2005), 'Inflammation, stress, and diabetes.', *J Clin Invest* 115(5), 1111-1119.

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. (2003), 'Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue.', *J Clin Invest* 112(12), 1785-1788.

Wiper-Bergeron, N.; Salem, H. A.; Tomlinson, J. J.; Wu, D. & Haché, R. J. G. (2007), 'Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8), 2703-2708.

Wu, H.; Jia, W.; Bao, Y.; Lu, J.; Zhu, J.; Wang, R.; Chen, Y. & Xiang, K. (2008), 'Serum retinol binding protein 4 and nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus.', *Diabetes Res Clin Pract* 79(2), 185-190.

Wu, S.; Tan, M.; Hu, Y.; Wang, J.; Scheuner, D. & Kaufman, R. J. (2004), 'Ultraviolet light activates NFkappaB through translational inhibition of IkappaBalpha synthesis.', *J Biol Chem* 279(33), 34898-34902.

Xi, L.; Qian, Z.; Xu, G.; Zhou, C. & Sun, S. (2007), 'Crocin attenuates palmitate-induced insulin insensitivity and disordered tumor necrosis factor-alpha and adiponectin expression in rat adipocytes.', *Br J Pharmacol* 151(5), 610-617.

Xu, H.; Barnes, G. T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C. J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J. S.; Tartaglia, L. A. & Chen, H. (2003), 'Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.', *J Clin Invest* 112(12), 1821-1830.

Yamauchi, T.; Nio, Y.; Maki, T.; Kobayashi, M.; Takazawa, T.; Iwabu, M.; Okada-Iwabu, M.; Kawamoto, S.; Kubota, N.; Kubota, T.; Ito, Y.; Kamon, J.; Tsuchida, A.; Kumagai, K.; Kozono, H.; Hada, Y.; Ogata, H.; Tokuyama, K.; Tsunoda, M.; Ide, T.; Murakami, K.; Awazawa, M.; Takamoto, I.; Froguel, P.; Hara, K.; Tobe, K.; Nagai, R.; Ueki, K. & Kadowaki, T. (2007), 'Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions.', *Nat Med* 13(3), 332-339.

Yamauchi, T.; Waki, H.; Kamon, J.; Murakami, K.; Motojima, K.; Komeda, K.; Miki, H.; Kubota, N.; Terauchi, Y.; Tsuchida, A.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; Yamauchi, N.; Ide, T.; Hori, W.; Kato, S.; Fukayama, M.; Akanuma, Y.; Ezaki, O.; Itai, A.; Nagai, R.; Kimura, S.; Tobe, K.; Kagechika, H.; Shudo, K. & Kadowaki, T. (2001), 'Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes.', *J Clin Invest* 108(7), 1001-1013.

Yang, Q.; Graham, T. E.; Mody, N.; Preitner, F.; Peroni, O. D.; Zabolotny, J. M.; Kotani, K.; Quadro, L. & Kahn, B. B. (2005), 'Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes.', *Nature* 436(7049), 356-362.

Yao-Borengasser, A.; Varma, V.; Bodles, A. M.; Rasouli, N.; Phanavanh, B.; Lee, M.; Starks, T.; Kern, L. M.; Spencer, H. J.; Rashidi, A. A.; McGehee, R. E.; Fried, S. K. & Kern, P. A. (2007), 'Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone.', *J Clin Endocrinol Metab* 92(7), 2590-2597.

Youngren, J. F. (2007), 'Regulation of insulin receptor function.', *Cell Mol Life Sci* 64(7-8), 873-891.

Yuan, M.; Konstantopoulos, N.; Lee, J.; Hansen, L.; Li, Z. W.; Karin, M. & Shoelson, S. E. (2001), 'Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta.', *Science* 293(5535), 1673-1677.

Zhang, Z.; Li, X.; Lv, W.; Yang, Y.; Gao, H.; Yang, J.; Shen, Y. & Ning, G. (2008), 'Ginsenoside Re Reduces Insulin Resistance through Inhibition of JNK and NF-kappaB.', *Mol Endocrinol* 22(1), 186-195.

Ziouzenkova, O.; Orasanu, G.; Sharlach, M.; Akiyama, T. E.; Berger, J. P.; Viereck, J.; Hamilton, J. A.; Tang, G.; Dolnikowski, G. G.; Vogel, S.; Duyster, G. & Plutzky, J. (2007), 'Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity.', *Nat Med* 13(6), 695-702.

Zobali, F.; Avci, A.; Canbolat, O. & Karasu, C. (2002), 'Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment.', *Cell Biochem Funct* 20(2), 75-80.

Zovich, D. C.; Orologa, A.; Okuno, M.; Kong, L. W.; Talmage, D. A.; Piantedosi, R.; Goodman, D. S. & Blaner, W. S. (1992), 'Differentiation-dependent expression of retinoid-binding proteins in BFC-1 beta adipocytes.', *J Biol Chem* 267(20), 13884-13889.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel danke ich herzlich dafür, dass ich diese Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II durchführen durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Jörg Heeren, nicht allein für das Thema, sondern insbesondere für die Betreuung und für die wertvollen Anregungen.

Den Mitarbeiterinnen des Labors Sandra Ehret, Dorothee Lasrich und Birgit Henkel danke ich für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Janne Prawitt für die Überlassung von Arbeitsprotokollen.

Herrn Dr. Ludger Scheja möchte ich herzlich für viele interessante und hilfreiche Diskussionen danken.

Zuletzt möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts danken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Erklärung

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: _____