

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II - molekulare Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. phys. Dr. rer. nat. Ulrike Beisiegel

Regulation der Adipozytokinsekretion
in einem humanen Adipozytenmodell

Dissertation

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

vorgelegt von

Sebastian Hermann Harms
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinische Fakultät,
der Universität Hamburg am 23. September 2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. Beil

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1. Einleitung	
1.1 Das Fettgewebe	3
1.2 Energiestoffwechsel des Fettgewebes	5
1.2.1 Die anabole Stoffwechselsituation – Lipoproteinstoffwechsel und Lipogenese	5
1.2.2 Die katabole Stoffwechselsituation – Lipolyse	9
1.3 Das Fettgewebe als hormonelles Organ	10
1.4 Die Entgleisung des Stoffwechsels – von der Adipositas zur Insulinresistenz	15
1.4.1 Veränderung des Adipozytokinmusters bei Adipositas	15
1.4.2 Die Manifestation der Insulinresistenz aus Sicht des Adipozyten	18
1.5 Die Untersuchung am humanen mesenchymalen Stammzellmodell	20
1.6 Fragestellung	22
2. Material und Methoden	
2.1 Die adipozytäre Differenzierung	23
2.2 Entnahme der Überstände	25
2.3 Herstellung des Zelllysates	26
2.4 Fettrot- und DAPI-Färbung	26
2.5 Herstellung, Oxidierung und Einsatz der Lipoproteine	27
2.6 Sekretionsmessung	28
2.7 Proteinbestimmung	28
2.8 Triglyceridbestimmung	30
2.9 SDS-Gelelektrophorese	31
2.10 Western-Blot	32
2.11 Panceau-Färbung	33
2.12 Immundetektion	33
3. Ergebnisse	
3.1 Mikroskopische Dokumentation der Differenzierung	36
3.2 Regulation der Adipozytokine	39
3.2.1 Einflussnahme der Zusätze auf die Adipozytokinsekretion	40
3.2.2 Einflussnahme oxidierter LDL-Partikel auf die Adipozytokinsekretion	42
3.2.3 Einflussnahme oxidierter VLDL-Partikel auf die Adipozytokinsekretion	44
3.2.4 Einflussnahme oxidierter und nicht oxidierter VLDL-Partikel auf die Adipozytokinsekretion	46
3.2.5 Einflussnahme von Cholesterin und Ölsäure auf die Adipozytokinsekretion	49

3.3	Triglyceridgehalt	51
3.3.1	Zellulärer Triglyceridgehalt nach Inkubation oxidierter LDL-Partikel	52
3.3.2	Zellulärer Triglyceridgehalt nach Inkubation oxidierter VLDL-Partikel	53
3.3.3	Zellulärer Triglyceridgehalt nach Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln	54
3.4	Expressionsanalyse auf Proteinebene	55
3.4.1	Analyse der Differenzierungsmarker auf Proteinebene	56
3.4.2	Adiponektionexpression nach Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln	59
3.4.3	Expression der Insulinrezeptorsubstrate	60
4.	Diskussion	
4.1	Nachweise der adipozytären Differenzierung	62
4.2	Regulation der Adipocytokinsekretion	63
4.2.1	Regulation durch Differenzierungszusätze	64
4.2.2	Veränderte Adipocytokinsekretion nach Inkubation der Lipoproteine	67
4.2.3	Steigerung der IL-6-Sekretion durch Cholesterin	69
4.2.4	Regulation durch Fettsäuren	70
4.3	Ausblick: Bedeutung der Regulationsmechanismen	72
4.5	Zusammenfassung	73
	Abbildungsverzeichnis	73
	Literaturverzeichnis	74
	Danksagung	88
	Lebenslauf	89
	Eidesstattliche Versicherung	90

Abkürzungsverzeichnis

ACC	acyl-coenzym-A-carboxylase
ADD	adipocyte determination and differentiation
AGPAT	Acylglycerol-3-phosphat Acyltransferase
AMPK	AMP activated protein kinase
ap	activator protein
aP	adipocyte lipid binding protein
ATGL	adipose triglycerid lipase
ATP	adenosintriphosphat
BMI	body mass index
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
ChREBP	carbohydrate responsive element binding protein
CD	cluster of differentiation
CGI-58	<i>Comparative Gene Identifikation-58</i>
CM	Chylomikron
coA	coenzyme-A
CR	Chylomikronenremnant
CRH	corticotrophin releasing hormone
d	day
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DGAT	Diacylglycerol Acyltransferase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent Assay
FABP	fatty acid binding protein
FATP	fatty acid transport protein
FAS	fatty acid synthase
FCS	Fötales Kälberserum
FFA	free fatty acids
gAd	glubular Adiponektin
GAPT	Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GLUT	Glukosetransporter
HDL	high density lipoprotein
HFC	high fat, high calorie
HMG	hydroxymethylglutaryl
hMSC	human mesenchymal stem cells
HRP	horseradish peroxidase
HSL	hormone sensitive lipase
IBMX	isobutylmethylxanthin
ICAM	intracellular adhesion molecule
IDL	intermediate dense lipoprotein
IL	interleukin
IL6R	IL-6-receptor

IKK	inhibitor of NF- κ B kinase
kDa	kilo Dalton
KLBP	keratinocyte lipid binding protein
LDLR	LDL-receptor
LPL	lipoproteinlipase
LRH	liver-receptor homolog
LRH-RE	LRH-responsive element
LRP	LDL-receptor related protein
LXR	liver receptor X
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP	macrophage and monocyte chemoattractant protein
MES	Morpholino Ethansulfonsäure
MSH	melanocyte stimulating hormone
NF- κ B	nuclear factor kappa B
PBS	phosphate buffered saline
PIK	phosphatidylinositol kinase
PKA	Proteinkinase A
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	PPAR responsive element
PUFA	poly unsaturated fatty acids
PVN	paraventrikular nucleus
RNA	ribo nucleoid acid
ROS	reactive oxidative species
RXR	retinoid X receptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrome
SOCS	suppressor of cytokine signalling
SREBP	sterol responsive element binding protein
TBS	Tris buffered saline
tert	telomerase reverse transcriptase
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TNFR	TNF α -receptor
TRH	TSH releasing hormone
TRL	triglyceriderich lipoproteins
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
URP	unfolded protein response
VCAM	vascular adhesion molecule
VLDL	very low density lipoprotein
WAT	white adipose tissue
WHO	world health organisation

1. Einleitung

1.1 Das Fettgewebe

Der menschliche Körper besteht im gesunden Zustand zu einem Fünftel aus Fettgewebe. Beim Mann schwankt dieser Anteil zwischen 10 und 20%, bei der Frau liegt er zwischen 15 und 25%. Neben den Fettzellen (Adipozyten) besteht das Fettgewebe zum großen Teil aus Bindegewebszellen (Fibrozyten), Makrophagen, Stammzellen, Nerven und Gefäßen. Jeder Mensch besitzt zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Arten des Fettgewebes. In der Histologie spricht man hierbei von braunem und weißem Fettgewebe (WAT).

Das braune Fettgewebe ist insbesondere in der frühen Entwicklung des Menschen von großer Bedeutung. Die braunen Fettzellen, die auf Grund ihrer zahlreichen Fetttropfen auch als multilokuläre Fettzellen bezeichnet werden, entstehen bereits in der Embryonalperiode in der 4. bis 8. Schwangerschaftswoche und sind dicht mit einem Kapillarnetz durchzogen. Das braune Fettgewebe dient dem späteren Säugling, der eine ungünstige Relation von Oberfläche zum Volumen aufweist, der Wärmeentwicklung. Die starke Durchblutung des Gewebes wird als Vektor für die Wärme genutzt, um sie im Organismus zu verteilen.

Mikroskopisch sind neben den Fetttropfchen in einer braunen Fettzelle, eine hohe Mitochondrien-anzahl im Vergleich zum weißen Fettgewebe auffallend. Das in diesen enthaltene Enzym Cytochromoxidase ist für die charakteristisch braune Färbung des Gewebes verantwortlich. Die Mitochondrien im braunen Fettgewebe spielen eine große Rolle, da sie direkt für die Wärmeproduktion der Zelle verantwortlich sind. Während in anderen Zellen Mitochondrien der Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) dienen, sorgt hier für die Freisetzung von Wärmeenergie das sog. *uncoupling-protein-1*. Es entkoppelt die für die ATP Gewinnung entscheidende Atmungskette und setzt somit die entstehende Energie, anstatt sie in einer Phosphatesterbindung des ATP zu speichern, frei. Im erwachsenen Organismus spielt das braune Fettgewebe jedoch keine bedeutende Rolle für die Thermogenese.

Das weiße Fettgewebe entwickelt sich beim Menschen in der Fetalperiode und setzt seine Entwicklung postnatal bis in die Pubertät fort. Die Zellen des weißen Fettgewebes sind mit einem Durchmesser von 70-120 µm deutlich größer als die 30 µm großen braunen Fettzellen. Sie werden auf Grund ihrer das ganze Zytoplasma ausfüllenden Fettvakuole auch als unilokuläre Fettzellen bezeichnet.

Die Morphologie einer weißen Fettzelle wird mit der eines Siegelringes verglichen. Der Zellkern ist dabei an den Rand der Zelle gepresst und die Mehrzahl der Zellorganellen befindet

sich dicht an den Zellkern gelagert (paranukleär).

Das weiße Fettgewebe erfüllt im menschlichen Organismus drei wesentliche Aufgaben.

Zum einem dient es isolierend als Kälteschutz in Form von subkutanem Fettgewebe. Zum anderem ist es als sog. Baufett von großer Bedeutung. Dabei sorgt es zum Beispiel für den Schutz innerer Organe, insbesondere um den Dickdarm oder im Omentum Majus, dem großen Bauchnetz, im Unterleib. Besonders lebenswichtige Organe, wie zum Beispiel die Nieren oder die Augäpfel, besitzen zur mechanischen Polsterung eine eigene Kapsel aus weißem Fettgewebe. Seine Funktion als Baufett nimmt das weiße Fettgewebe aber auch bei der äußeren Formgebung wahr, wie etwa in der Wange oder im Gesäß. Das Baufett dient zudem der Polsterung der Hand- und Fußballen. Da das Baufett insgesamt also eine große Bedeutung hat, wird es als Energiedepot nur anlässlich schwerer Hungerzustände oder Erkrankungen, wie beispielsweise der Tumorkachexie, abgebaut.

Seine dritte und wohl evolutionär wichtigste Rolle, spielt das Fettgewebe als Energiespeicher in Form von Triglyceriden. Im Anschluss an die Nahrungsaufnahme (postprandial) werden Nahrungslipide sowie Kohlenhydrate mittels des Fettsäureaufbaus (Lipopogenese) in Triglyceride umgewandelt und können bei Nahrungsknappheit dem Organismus mittels Fettsäureabbau (Lipolyse) wieder bereitgestellt werden. Betrachtet man den Energiegehalt von Fett und dessen durchschnittliche Masse von ca. 8 kg bei einem gesunden Menschen, so könnte das Fettgewebe, bei normaler Belastung des Organismus, diesen für mehr als einen Monat konstant mit Energie versorgen.

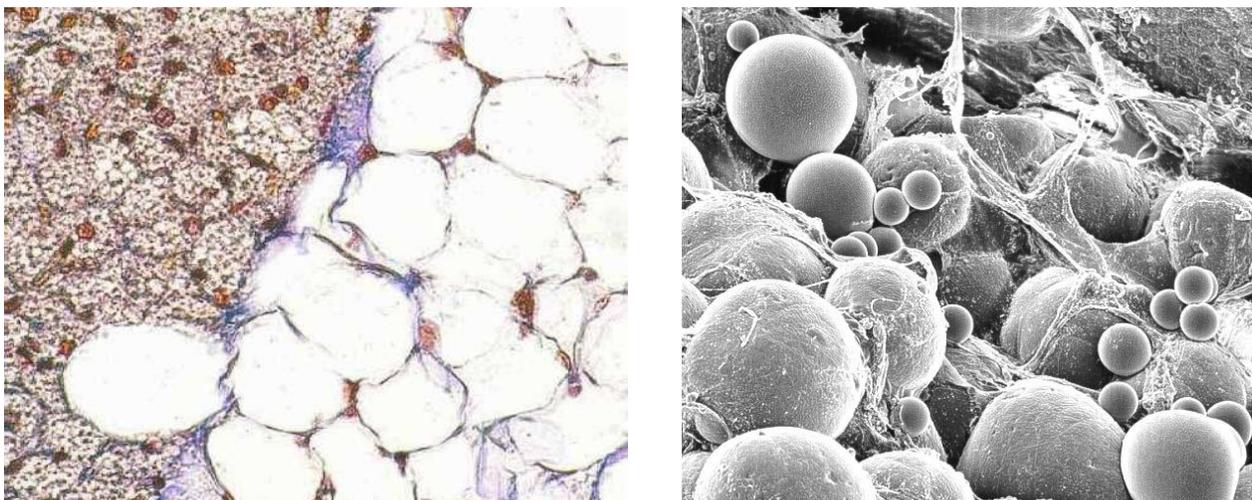


Abbildung 1: Links: Braunes und weißes Fettgewebe einer Rattenniere

Das braune Fettgewebe (links) ist durch multilokuläre Fetttröpfchen, eine hohe Mitochondriendichte und einen runden Zellkern gekennzeichnet. Im weißen Fettgewebe (rechts) wird der Zellkern von der Fettvakuole an den Rand gepresst (Siegelringform). **Rechts: weiße Fettzelle aus dem Knochenmark eines Schafes (Elektronenrastermikroskopie)**

Die rauen kugelförmigen Fettzellen enthalten große Fettvakuolen (glatte, runde Strukturen, die Freisetzung ist ein Artefakt der Präparation) und sind von einem Netz aus Bindegewebszellen umgeben.

Quelle: Histonet, Medizinische Fakultät, Universität Ulm (www.uni-ulm.de/histonet)

Um den Organismus über den Stand der Energiereserven zu informieren, besitzt das Fettgewebe eine weitere wichtige Aufgabe als hormonelles Organ. Dabei wirkt es sowohl endokrin regulierend, insbesondere über den Pfortaderkreislauf, auf den Stoffwechsel des wichtigsten Stoffwechselorgans, der Leber, als auch zentralnervös, um die Nahrungsaufnahme zu steuern. Eine Störung der hormonellen Regulierung durch Über- bzw. Fehlernährung hat einen großen Einfluss auf den gesamten Organismus und ist ein wesentlicher Bestandteil von Stoffwechselkrankheiten wie zum Beispiel der Insulinresistenz, dem wesentlichen Merkmal des Diabetes Typ2. Die Erforschung der Charakteristika hormoneller Faktoren und deren Regulierung stehen noch an ihrem Anfang und sollen mittels dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.2 Energiestoffwechsel des Fettgewebes

Jede Zelle des Organismus besitzt Energiereserven in Form von Triglyceriden und Glykogen. Der Adipozyt stellt neben den Glycogenspeichern der Muskulatur und der Leber den wichtigsten Energieversorger des Organismus dar.

Während die in Muskeln und Leber gespeicherten Glycogenreserven von ca. 400g kurz- bis mittelfristig die Energieversorgung des Menschen sichern, wird der Verbrauch der Fettreserven für die längerfristige Versorgung eingesetzt. Hierbei stehen der Fettsäureabbau (Lipolyse) und die Fettsäuresynthese (Lipogenese) in einem fein abgestimmten Gleichgewicht zueinander, so dass der Adipozyt auf die Bedürfnisse des Organismus optimal reagieren kann. Reguliert wird dieses System durch eine Anzahl von Hormonen, die kurz- und langfristige Effekte hervorrufen.

1.2.1 Die anabole Stoffwechselsituation – Lipoproteinstoffwechsel und Lipogenese

Kurz nach einer Nahrungsaufnahme sorgt Insulin, welches aus den β -Zellen des Pankreas in den Blutkreislauf gelangt, in den Adipozyten direkt für eine Aufnahme von Kohlenhydraten durch Translokation eines Glukosetransporters (GLUT4) in die Zellmembran. Neben diesem ist ein weiterer Transporter vorhanden, GLUT1, der jedoch insulinunabhängig gesteuert wird. Insulin beschleunigt anschließend die Umsetzung von Glucose zu Glycerin im Adipozyten¹.

Ebenfalls werden durch Insulin wichtige Schlüsselenzyme der *de-novo* Lipogenese reguliert. Hierunter versteht man die Synthese von Fettsäuren aus Nicht-Fettsäure-Vorstufen, hauptsächlich Kohlenhydraten. Zu diesen Schlüsselenzymen zählen etwa die *acyl-coenzym-A-*

carboxylase 1 (ACC1) oder die *fatty acid synthase* (FAS), deren Aktivität im Fettgewebe gezeigt werden konnte ².

In vitro steigert Insulin im Adipozyten die Aktivität und Expression von FAS ^{3,4}. In vivo jedoch, vermag eine reine Glucosegabe den Triglyceridgehalt des Fettgewebes nicht zu steigern ⁵. Die Expression und Aktivität von FAS und ACC1 verändert sich sowohl nach kohlehydratreicher, als auch fettreicher Ernährung, im humanen Adipozyten ebenfalls nicht ⁶. Auch weisen fettleibige Patienten keine erhöhte FAS m-RNA-Konzentration im Adipozyten auf ⁷. Frühere Experimente hierzu ließen bereits eine untergeordnete Rolle der *de-novo* Lipogenese vermuten ⁸. Es konnte zudem gezeigt werden, dass schon wenige mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Expression dieser Enzyme in der Leber und im Muskel hemmen ⁹. Neben Insulin und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die regulierend über die Transkriptionsfaktoren *sterol responsive element binding protein 1c* (SREBP-1c) und *liver receptor X* (LXR) wirken ¹⁰, können auch Kohlehydrate über das sog. *carbohydrate responsive element binding protein* (ChREBP) die Transkription dieser Enzyme beeinflussen.¹¹

Somit kann festgestellt werden, dass die Regulation der *de-novo* Lipogenese von Fettsäuren im Adipozyten noch nicht in ihren Einzelheiten geklärt ist, diese jedoch von keiner größeren Bedeutung für den Fettstoffwechsel des Adipozyten zu sein scheint. Da neben diesem Stoffwechselweg, die Aufnahme von Fettsäuren für den Zusammenbau zu Triglyceriden eine wesentlich größere Bedeutung im Adipozyten einnimmt, soll im Folgenden der Lipoproteinstoffwechsel näher erläutert werden.

Im Dünndarm werden die Nahrungslipide zunächst durch die von Pankreas sezernierte Lipase gespalten und können als Fettsäuren, jedoch zum größten Teil als Monoacylglycerin, in die Mukoszellen des Darms aufgenommen werden. Dort erfolgt die Synthese der Triglyceride durch Reveresterung des Monoacylglycerin und Glycerins mit den Fettsäuren. Ein Teil der Fettsäuren wird bereits an das Blut abgegeben, in dem sie dann als sog. *free fatty acids* (FFA), gebunden an Albumin, vorliegen. Die Triglyceride werden in sog. Chylomikronen, die durch das Apolipoprotein B₄₈ gekennzeichnet sind, verpackt und in das Interstitium sezerniert. Von dort gelangen sie über die Lymphwege durch den *Ductus Thoracicus* in den Blutkreislauf. Hier findet ein Austausch der Apolipoproteine E und C2 mit den *high density lipoprotein* (HDL) statt ¹². Fortan können aus den Chylomikronen an der Endotheloberfläche mittels der Lipoproteinlipase (LPL) und dessen Ligand Apoc2 ¹³ die Triglyceride hydrolytisch in Glycerin und Fettsäuren gespalten werden. Im Fettgewebe begünstigt Insulin die Aufnahme von Fettsäuren aus Lipoproteinen durch verstärkte Expression und Aktivierung der LPL ^{14,15}. Gleichzeitig erhöht Insulin die Translokation des *fatty acid transport protein 1* (FATP1) ¹⁶, um die Aufnahme dieser Fettsäuren in den Adipozyten zu verbessern ¹⁷. Neben FATP1 werden im Adipozyten weitere

Transporter für Fettsäuren exprimiert: CD36¹⁸ und FABPpm¹⁹. Neben diesen regulierbaren Transportern ist auch eine passive Diffusion als Transportmechanismus beteiligt.

In der Zelle angekommen, werden die Fettsäuren an ein Transportprotein gebunden, die sog. *fatty acid binding proteins* (FABP). Hierzu zählen das *adipocyte lipid binding protein 2* (aP2) und das *keratinocyte lipid binding protein* (KLBP), wobei aP2 spezifisch im Adipozyten exprimiert wird. Die Relation von aP2 zu KLBP ist in den verschiedenen Fettdepots des Menschen unterschiedlich²⁰.

Um drei Fettsäuren in einem Triglycerid zu speichern, werden diese zunächst mittels der Acyl-CoA Synthetase zu Acyl-CoA aktiviert und anschließend mittels unterschiedlicher Acyl-Transferasen (GAPT, AGPAT, DGAT) an ein aktiviertes Glycerin gebunden. Es wurde postuliert, dass bereits FATP in der Lage sein könnte, die Fettsäuren zu Acyl-CoA zu aktivieren²¹. Die synthetisierten Triglyceride werden im Adipozyten in den sog. *lipid droplets* gespeichert. Um diese vor einem unkontrollierten Abbau zu schützen, sind diese Triglyceridspeicher von einer Proteinhülle aus Perilipin, Adipophilin und TIP47 (PAT-Familie) umgeben²². Sie liegen der Oberfläche, mit Hilfe von hydrophoben Aminosäuresequenzen, an²³. Perilipin *knock-out* Mäuse weisen eine deutlich reduzierte Fettmasse, sowie eine erhöhte Lipolyserate auf²⁴. Diese Art des Schutzes scheint nur in den *lipid droplets* der Adipozyten vorzukommen²³.

Die nach der Hydrolyse der Chylomikronen zurückbleibenden Chylomikronen-Remnants enthalten eine inaktive Form der LPL²⁵, die neben dem ApoE, als Ligand für den hepatischen *LDL-receptor-related protein 1* (LRP1)²⁶, die Aufnahme in den Hepatozyten um ein vielfaches erhöht²⁷.

Im Hepatozyten werden die so anfallenden Lipide mit den endogen synthetisierten zu den sog. *very low density lipoprotein* (VLDL) assembliert und sezerniert. Diese tragen das Apolipoprotein B₁₀₀ und erhalten im Austausch mit HDL, ApoE und -C¹². Die VLDL werden wie die Chylomikronen auch mittels der LPL am Endothel, insbesondere im Fett- und Muskelgewebe, abgebaut. Hierbei entstehen *intermediate dense lipoproteins* (IDL), die in LDL umgewandelt werden. Aufgrund der Abnahme des Triglyceridgehaltes enthalten diese Lipoproteine einen hohen Cholesterinanteil. LDL werden mittels des LDL-Rezeptors (LDLR) in die Zelle aufgenommen und dienen hauptsächlich der Versorgung der Zellen mit Cholesterin. Kommt es auf diesem Wege in der Zelle zur Akkumulation von mit der Nahrung aufgenommenem Cholesterin, so wird die endogene Produktion heruntergefahren. Dies zeigt sich in einer verminderten Expression wichtiger Schlüsselenzyme der Cholesterinbiosynthese, der HMG-CoA-Reduktase, HMG-CoA Synthase, Prenyltransferase und des LDLR.

Der Adipozyt gilt als einer der größten Speicherorte für Cholesterinester²⁸. Die Zellgröße und somit dessen Triglyceridgehalt korreliert positiv mit dem Cholesteringehalt der Zelle^{29,30}. Ebenfalls korrelieren der Plasmagehalt an Cholesterin und der Grad an Adipositas^{31,32}, was auf

eine exogene Beladung der Zellen mit Cholesterin schließen lässt. Jedoch steigt mit zunehmendem Fettgehalt der Zelle auch die endogene Cholesterinproduktion ³². Cholesterin gelangt im Körper mit Hilfe der *high density lipoproteins* (HDL) von den peripheren Geweben in die Leber, wo es in der Galle ausgeschieden und zum Teil im enterohepatischen Kreislauf reabsorbiert wird.

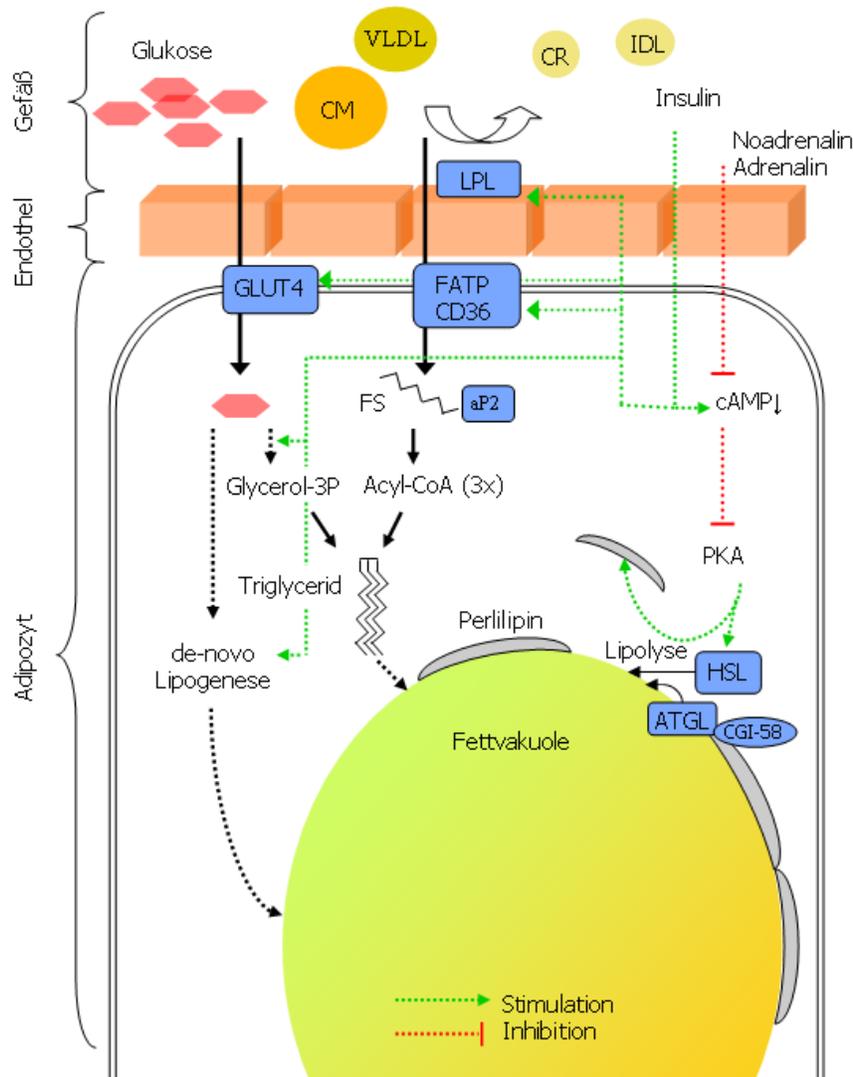


Abbildung 2: Stoffwechsel und Stoffwechselregulation im Adipozyten

Postprandial sorgt Insulin für eine verstärkte Glukose- und Fettsäureaufnahme im Adipozyten durch Translokalisierung des Glukosetransporters (GLUT4), sowie verstärkte Expression und Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) und der Fetttransporter (FATP). Die LPL spaltet die Fettsäuren hydrolytisch aus Chylomikronen (CM) oder *very low density lipoprotein* (VLDL). Im Adipozyten wird Glukose zu Glycerol-3-Phosphat umgesetzt oder der de-novo Lipogenese zugeführt. Glycerol-3P wird mit drei aktivierten Fettsäuren (Acyl-CoA) zu einem Triglycerid assembliert und in der Fettvakuole gespeichert. Sinkt der Insulinreiz oder kommt es zur Stimulation β -adrenerger Rezeptoren durch Adrenalin oder Noradrenalin, so kommt es im Zuge der Signaltransduktion zum Ansteigen der intrazellulären cAMP-Konzentration. Folge ist eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die die Hormonsensitive Lipase (HSL) aktiviert und den Schutzmantel der Fettvakuole aus Perilipinen durchgängig macht. Initiiert wird die Lipolyse von der durch CGI-58 aktivierten *adipose triglyceride lipase* (ATGL).

1.2.2 Die katabole Stoffwechselsituation – Lipolyse

Kommt es zum Absinken des Blutzuckerspiegels, so wird vermehrt Glucagon ausgeschüttet, ein Antagonist von Insulin, der den Abbau der Glycogenreserven im Muskel und der Leber induziert. Im Fettgewebe, welches zwar auch Rezeptoren für Glucagon exprimiert³³, hat der niedrige Insulinspiegel den größten katabolen Effekt.

Kurzfristig kann es durch die Katecholamine Adrenalin oder Noradrenalin zum Abbau der Energiereserven im Adipozyten kommen³⁴. Adrenalin stammt aus der Nebennierenrinde und wirkt endogen auf den gesamten Organismus. Noradrenalin wird direkt von sympathischen Nervenenden, im hiermit reich durchsetzten Fettgewebe, ausgeschüttet³⁵. Katecholamine wirken am Adipozyten über β_2 -Rezeptoren. Diese adrenergen Rezeptoren sind in den verschiedenen Fettdepots des Menschen unterschiedlich stark exprimiert. So zeigen Fettzellen der Hüftregion, sog. gynoide Adipozyten, besonders viele α_2 -Rezeptoren, was sie unempfindlicher gegenüber katecholaminen Reizen macht. β_2 -Rezeptoren sind G-Prototein-gekoppelte Rezeptoren und bewirken, dem Effekt des Insulins entgegengesetzt, einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, was wiederum eine Aktivierung der Proteinkinase A nach sich zieht. Ein gesunkener Insulinreiz hat hierbei die gleiche Wirkung innerhalb der zellulären Signaltransduktion. Die Proteinkinase A (PKA) bewirkt die Aktivierung des wichtigsten Schlüsselenzyms der Lipolyse, der *hormon sensitive lipase* (HSL), sowie die Phosphorylierung des Perilipins A³⁶. Infolge dessen kommt es zu einer Translokation des Perilipins fort vom *lipid droplet* und der HSL hin zum lipid-droplet. Die Dynamik dieses Vorganges scheint bei Ratten mit dem Alter abzunehmen³⁷. Die HSL kann nun die Triglyceride zu Di- und Monoacylglyceriden hydrolysieren. Die Spaltung zur Fettsäure und Glycerin wird im Adipozyten zusätzlich durch eine nicht durch Hormone regulierbare Monoacylglyceridlipase vollzogen³⁸.

Neben der HSL ist eine weitere Lipase, die *adipose triglyceride lipase* (ATGL), beschrieben worden. Diese liegt dem *lipid droplet* direkt an und wird durch das Protein *Comparative Gene Identifikation-58* (CGI-58) aktiviert³⁹. ATGL initiiert die Lipolyse⁴⁰, ist jedoch für die katecholamininduzierte Lipolyse von untergeordneter Bedeutung⁴¹. Kommt es zu einer anabolen Stoffwechselsituation, kann die HSL schnell durch Insulin deaktiviert werden⁴². Neben der hormonellen Regulation der Lipolyse läuft im Adipozyten eine basale Lipolyse ab, die auch von der Größe des Adipozyten abzuhängen scheint⁴³. Neben der Regulation der HSL durch Katecholamine und Insulin wurden weitere Mechanismen zur Aktivierung der HSL mittels des *mitogen activated proteinkinase* (MAPK)-Signaltransduktionsweges postuliert^{44,45}.

Das freigesetzte Glycerin wird über Aquaporin aus dem Adipozyten geschleust und kann dem Stoffwechsel der Leber zugeführt werden. Die Expression dieses Aquaporins ist von Insulin abhängig⁴⁶. Die freigesetzten Fettsäuren werden im Zytosol des Adipozyten an aP2 oder KLBP gebunden und aus dem Adipozyten transportiert, um den Organismus mit Energie zu versorgen. Nervenzellen oder Erythrocyten können diese Fettsäuren nicht abbauen und sind in einer katabolen Stoffwechselsituation auf die Glukoneogenese der Leber angewiesen.

1.3 Das Fettgewebe als hormonelles Organ

Lange Zeit wurde das Fettgewebe als passives Speicherorgan angesehen. Mit einer rasant zunehmenden Inzidenz der Adipositas und deren hohen Korrelation mit Stoffwechselkrankheiten, wie dem Diabetes, gelangte es in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses⁴⁷. Der Adipozyt ist dabei mehr als nur ein passives Speicherorgan. Er ist ein endo-, para- und autokrines hormonelles Organ, welches die Energiehomöostase des Organismus, sowie das Immunsystem, an vielerlei Punkten beeinflusst. Im Folgenden soll eine Auswahl dieser Hormone genauer vorgestellt werden. Ein Überblick der Adipozytokine ist in Tabelle 1 dargestellt.

Eines der am frühesten entdeckten Adipozytokine ist Leptin, ein 16kDa großes Protein, welches von Adipozyten sezerniert wird und endogen primär auf unterschiedliche Kernregionen des Hypothalamus wirkt. Die Konzentration von Leptin im Plasma korreliert dabei mit der Stoffwechselsituation des Organismus. Postprandial kommt es im Adipozyten mit anlaufender Lipogenese zur Sekretion von Leptin⁴⁸. Leptin wirkt an Neuronen über den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg⁴⁹. Hier kommt es im *Nucleus Arcuatus*, neben inhibitorischen Effekten, zur Depolarisation sog. POMC-Neurone und somit unter anderem, zur Freisetzung des melanocyte stimulating hormon (MSH). Dieses Hormon wirkt in einem weiteren Kerngebiet, dem paraventriculären Nucleus (PVN), dem die Hypophyse regulierenden Kerngebiet. Hier kommt es sowohl zur verstärkten Produktion des *thyreotropin releasing hormon* (TRH) und *corticotropin releasing hormon* (CRH), als auch zur Inhibition des Hungersignals. Die durch diese Faktoren in der Hypophyse freigesetzten Hormone TSH und CSH führen in der Peripherie zu einer erhöhten Thermogenese, Insulinsensitivität und β -Oxidation⁵⁰. Eine Mutation im Leptinrezeptor führt unter anderem zur Adipositas⁵¹.

Diese komplexen neuronalen Zusammenhänge konnten zum größten Teil sowohl an Leptin-Rezeptor *knock-out* Mäusen (db/db), als auch Leptin *knock-out* Mäusen (ob/ob), studiert werden und sind noch nicht völlig aufgeklärt^{52,53}. Leptin weist jedoch auch in der Peripherie

mehrere Funktionen auf. So fördert es beispielsweise im Muskelgewebe die β -Oxidation durch Inhibition der *acetyl-CoA-carboxylase* (ACC) ⁵⁴.

Adipozytokin	Wirkort (u.a.)	Wirkung (u.a.)
Leptin	Hypothalamus	Hungerreiz↓, Thermogenese↑, β -Oxidation↑, Insulinsensitivität↑ ⁵⁰
Adiponektin	Fett-, Leber-, Muskelgewebe, Gefäße	Inflammation↓ ⁵⁵ , Glucoseaufnahme↑ ⁵⁷ , β -Oxidation↑ ⁵⁶ ,
Resistin	Muskel- und Lebergewebe	Glucoseaufnahme↓, Insulinsensitivität↓ ⁵⁸
Angiotensinogen	Gefäße, NNR (als Ang II)	Blutdruck↑
TNFα	Fett-, Lebergewebe, Gefäße, Immunsystem	Inflammation↑ ^{59,60} , Glucoseaufnahme↓ ⁶¹ , Triglyceridplasmaspiegel↑ ⁶² , Insulinsensitivität↓ ^{61,63}
IL-6	Fett-, Lebergewebe, Gefäße	Inflammation↑, Glucoseaufnahme↓ ⁶⁴ , Triglyceridplasmaspiegel↑ ^{65,66} , Insulinsensitivität↓ ⁶⁷ ,
Adipsin	Fettgewebe	Triglyceridplasmaspiegel↓ ⁶⁸
MCP1	Fettgewebe, Gefäße, Immunsystem	Inflammation↑ ^{59,60} , Glucoseaufnahme↓ ⁶⁹ , Triglyceridplasmaspiegel↑ ⁶⁹
PAI-1	Gefäße	Thrombusbildung↑

Tabelle 1: Auswahl wichtiger Adipocytokine

Der Adipozyt sezerniert eine Anzahl von Botenstoffen, die u.a. auf Glucose- und Triglyceridstoffwechsel, das Immunsystem, sowie die Insulinsensitivität wirken. TNF α =Tumor-nekrose-faktor α , IL-6= Interleukin-6, Adipsin= acylation-stimulating protein(ASP)/adipocyte trypsin, MCP-1= macrophage and monocyte chemoattractant protein 1, PAI-1 = Plasminogen activating Inhibitor 1, pGlukose = Plasma-Glukose, pTriglyceride = Plasma-Triglyceride

Adiponektin (auch Acrp30 ⁷⁰, GBP28 ⁷¹, adipoQ⁷², apM1 ⁷³), mit einem Molekulargewicht von 30kDa, wird im Körper ausschließlich von reifen Adipozyten produziert ⁷² und liegt in einer Homotrimerform vor, welche sich zu Di- und Trimeren weiter zusammenlagern kann⁷⁴. Das 247 Aminosäuren lange Adiponektin besitzt am N-terminalen Ende eine dem Kollagen ähnliche Domäne und eine am C-Terminus liegende globuläre Domäne. Adiponektin existiert zudem auch in einer kürzeren, prozessierten, ebenfalls aktiven Variante, dem globulären Adiponektin (gAd) ⁷⁵. Die Expression von Adiponektin ist in den unterschiedlichen Fettdepots unterschiedlich stark ausgeprägt ⁴⁸.

In den Adipozyten kann die Expression von Adiponektin durch den peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) gesteigert werden. Hierbei bindet PPAR γ im Komplex mit dem

retinoid X receptor (RXR) an das sog. *PPAR responsive element* (PPRE) in der Promotorregion für Adiponektin. Ein weiterer Botenstoff, der *liver-receptor homolog 1* (LRH-1), kann ebenfalls durch Bindung an den Adiponektinpromotor *LRH1 responsive element* (LRH-RE) die Adiponektintranskription steigern. Eine Punktmutation in den Elementen PPRE und LRH-RE führt zu einer verminderten Adiponektinexpression⁷⁶.

Die Funktionen von Adiponektin sind vielfältig. Die Rezeptoren AdipoR1 und -R2 konnten kürzlich durch cDNA-Sequenzierung ermittelt werden⁷⁷. Der AdipoR1 kommt im Muskelgewebe, der AdipoR2 hingegen, im Lebergewebe vor. Es handelt sich hierbei um heptahelicale Rezeptoren, deren C-terminales Ende, gegenüber allen bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren, extrazellulär zu liegen kommt. Im Muskelgewebe, wie auch in der Leber, erhöht Adiponektin die Aktivität der *adenosinmonophosphat kinase* (AMPK), sowie von PPAR α ^{78,79}. AMPK ist der Energiesensor der Zelle und reagiert auf niedrige ATP-Spiegel durch Aktivierung kataboler Stoffwechselwege, wie der β -Oxidation oder der Glycolyse, sowie der Glukoseaufnahme⁵⁷. PPAR hingegen ist ein Transkriptionsfaktor von CD36, einem Fettsäuretransporter, und der Acyl-CoA-Oxidase, einem Schlüsselenzym der β -Oxidation. Auf diesem Weg wird die Oxidation von Fettsäuren und die Verstoffwechslung von Glukose vorangetrieben⁵⁶. Die Plasmakonzentration von Adiponektin gilt auch als Parameter für die Insulinsensitivität⁸⁰.

Neben seiner Funktion als Regulator der Energiehomöostase nimmt Adiponektin auch eine wesentliche Rolle zur Prävention der Plaque-Entstehung, dem pathologischen Vorgang bei der Entstehung der Artherosklerose, ein. So führt Adiponektin zur Inhibition des *nuclear factor κ -B* (NF- κ B), welcher eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen spielt⁵⁵, als auch deren pathologische Entwicklung zu Schaumzellen, durch verminderte Expression des *scavenger receptor*, der für die unkontrollierte Aufnahme oxidierter LDL Partikel verantwortlich ist⁸¹.

Der Adipozyt produziert neben den genannten Hormonen Adiponektin und Leptin auch eine Reihe inflammatorischer Botenstoffe. Neben den Interleukin-6 (IL-6), dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) zählen hierzu auch unter anderen das *macrophage and monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1).

MCP-1 gehört zur Gruppe der chemotaktisch aktiven Zytokine, auch Chemokine genannt, die Zellen des Immunsystems anlocken. Die Regulation von MCP-1 im Adipozyten ist noch nicht völlig aufgeklärt. Es wird jedoch postuliert, dass Insulin in gesunden, wie auch insulinresistenten, murinen 3T3-L1 Adipozyten die Expression von MCP-1 auf m-RNA-Ebene gleichermaßen signifikant steigert. Dieses Verhalten wird als selektive Insulinresistenz beschrieben⁶⁹. Auch TNF α steigert die Expression von MCP-1 auf mRNA Ebene⁶⁹. MCP-1 wirkt in erster Linie über den CCR2-Rezeptor, der unter anderem auch auf Adipozyten nachgewiesen

werden konnte⁸². Die autokrine Stimulation des Adipozyten mit MCP-1 hat eine Reihe von metabolischen Effekten. MCP-1 ist in der Lage, die Expression der LPL, GLUT4 und aP2 auf mRNA-Ebene im Adipozyten stark zu senken⁶⁹. Somit scheint eine Erhöhung des MCP-1 Spiegels nicht nur die Makrophageninfiltration zu erhöhen. Sie könnte auch zu einer erhöhten Plasmakonzentration an Glucose und Triglyceriden führen.

TNF α gehört ebenfalls zur Gruppe der Zytokine und ist ein 26kDa großes Membranprotein, dass in ein aktives 17kDa großes Protein gespalten wird. Im Fettgewebe wird es sowohl von den Adipozyten selbst, als auch von Matrixzellen sezerniert⁴⁸. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass wie bei MCP-1, auch die Matrixzellen einen wesentlich höheren Anteil zu dessen Sekretion beitragen⁸³. Gegenüber Adiponektin und Leptin wirkt TNF α weniger endogen als auf umliegende Zellen (parakrin) sowie auf die Zelle selbst (autokrin). Es sind zwei Rezeptoren für TNF α bekannt: TNFR1 (p60) und TNFR2 (p80)⁸⁴.

Die Auswirkungen auf den Adipozyten sind sehr vielschichtig. In Bezug auf seinen Stoffwechsel ist TNF α in der Lage, sowohl die Expression auf Proteinebene von GLUT4⁶¹ und Perilipin⁸⁵ zu senken, als auch die Aktivität der LPL negativ zu beeinflussen⁸⁶, sowie insgesamt in primär kultivierten Adipozyten die Lipolyse zu steigern⁸⁷. Dieser Effekt wird wahrscheinlich über den MAPK Signaltransduktionsweg und durch einen Anstieg der cAMP-Konzentration hervorgerufen⁸⁸. Somit kommt es gleichzeitig zur Inhibition der Lipogenese. Auch in vivo ist TNF α in der Lage, die Freisetzung von FFA, zum Beispiel im Fettgewebe von Ratten, deutlich zu erhöhen⁶². In der Leber erhöht TNF α die VLDL Produktion⁸⁹. TNF α hat somit im Organismus wesentlichen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel und trägt zu einer Erhöhung des Triglyceridspiegels bei. Bei Patienten, die unter Infekten und chronischer Entzündung, wie AIDS oder Cystischer Fibrose, leiden und somit erhöhte TNF α -Spiegel aufweisen, konnte im Serum ebenfalls eine Hypertriglyceridämie festgestellt werden^{60,90}.

TNF α hat jedoch auch Auswirkungen auf die endokrine Rolle des Adipozyten selbst. Es kann in Ratten die Expression von Adiponektin (Acrp30) drastisch senken, aber auch die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-6⁶² und MCP-1⁸² erhöhen. Als inflammatorisches Zytokin ist es zudem in der Lage, auf die im Fettgewebe reichlich vorhandenen Gefäße zu wirken. Hier aktiviert TNF α neben MCP-1 sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Endothelzellen den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der durch erhöhte Expression des *intracellular adhesion molecule* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) und MCP-1 die Adhäsion und Einwanderung von Monozyten ermöglicht^{59,91}.

Zudem stört TNF α den Insulinsignaltransduktionsweg durch Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor Substrate 1 und 2⁶³, sowie durch dessen verminderte Expression⁶¹. Die genauen Regulationsmechanismen bezüglich der Insulinwirkung werden hierbei jedoch noch diskutiert.

Bei Abwesenheit von TNF α oder dessen Neutralisation, als auch bei Abwesenheit seines Rezeptors, ist die Funktion des Insulinsignaltransduktionsweges wiederhergestellt⁹²⁻⁹⁴. TNF α ist somit wie Adiponektin und Leptin ein Adipozytokin von besonders vielschichtiger Bedeutung.

Das Adipozytokin Interleukin 6 ist ebenfalls von großer Bedeutung. Es wird sowohl von Zellen des Immunsystems, als auch im Fettgewebe von Adipozyten und Matrixzellen, produziert und sezerniert. Es liegt im Plasma in unterschiedlich glycosylierten Formen vor, die eine Größe von 22-27kDa aufweisen. Gegenüber TNF α ist die relative Sekretionsmenge des Adipozyten von IL-6 weitaus höher. Das vom Fettgewebe sezernierte IL-6 macht gut ein Drittel des IL-6-Plasmaspiegels aus⁹⁵. Die Sekretion vom omentalen Fettgewebe, welches durch den Pfortaderkreislauf der Leber vorgeschaltet ist, produziert die dreifache Menge von IL-6 im Vergleich zu subkutanem Fettgewebe⁹⁶. Die Produktion von IL-6 lässt sich durch Glukokortikoide, wie dem stärksten pharmakologischen Glukokortikoid Dexamethason⁹⁶, als auch durch die Gabe von mehrfach ungesättigten Fettsäuren⁹⁷ und Östrogenen⁹⁸, hemmen. Eine Gabe von gehärteten Fetten steigert hingegen den IL-6 Spiegel im Plasma von Patienten mit moderater Hypercholesterinämie⁹⁹. Ebenso können in vitro β -adrenerge Antagonisten und Insulin die Sekretion von IL-6 steigern^{100,101}. Die Transkription von IL-6 wird auf molekularer Ebene durch die Transkriptionsfaktoren NF-IL6 und NF- κ B induziert^{102,103}.

IL-6 besitzt zwei unterschiedliche Rezeptoren: einen 80kDa großen membrangebundenen, sowie einen kleineren, in gelöster Form vorliegenden, 50kDa großen Rezeptor. Die Signaltransduktion innerhalb der Zelle wird über den IL-6-Rezeptor (IL6-R)-Liganden Komplex an den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg weitergeleitet.

Das Wirkspektrum von IL-6 ist ebenfalls breit. Es weist jedoch Ähnlichkeiten zu dem von TNF α auf. So inhibiert IL-6 die Aktivität der LPL⁶⁵ und steigert die Triglyceridsekretion in der Leber von Ratten⁶⁶. So kommt es zu einem erhöhten Triglyceridgehalt im Plasma. Wie TNF α , reduziert auch IL-6 die Wirkung von Insulin. Dabei aktiviert IL-6 im Hepatozyten den *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)-3 Signalweg⁶⁷, welcher im aktivierten Zustand die Expression des Insulinrezeptors, sowie des Insulinrezeptorsubstrates, negativ rückkoppelnd beeinflusst¹⁰⁴. Durch eine verminderte Insulinwirkung kommt es somit in der Leber zur Enthemmung der Glukoneogenese. Dies hat in Kombination mit einer durch IL-6 verursachten geringeren peripheren Glukoseaufnahme⁶⁴ einen ansteigenden Glucosespiegel zur Folge.

Unter den inflammatorischen Adipozytokinen sind es zusammenfassend also insbesondere IL-6 und TNF α , die eine ungünstige Stoffwechsellage durch Erhöhung der Glucose und Triglyceride im Plasma, sowie durch Senkung der Insulinsensitivität, hervorrufen. Zudem kommt der Umstand, dass inflammatorische Zytokine sich gegenseitig positiv beeinflussen und die Einwanderung von ebenfalls Zytokin-produzierenden Entzündungszellen hervorrufen. Auf diesem Wege wird der Entzündungsprozess im Fettgewebe vorangetrieben.

Es soll jedoch auch betont werden, dass es sich bei den hier beschriebenen Adipozytokinen nur um eine Auswahl handelt und dass die Untersuchung vieler anderer Adipozytokine, wie zum Beispiel Resistin oder Adipsin, gerade in Anbetracht molekularer Wirk- und Regulationsmechanismen beim Menschen, noch in ihren Anfängen steht. Diese Auswahl versucht jedoch zu verdeutlichen, wie aktiv das Fettgewebe als hormonelles Organ wirken kann und dass es in der Lage ist, sowohl den Stoffwechsel des Organismus positiv, wie auch negativ, zu beeinflussen. In dem folgendem Kapitel soll daher die Veränderung des hormonellen Sekretionsmusters des Adipozyten bei zunehmendem Fettgehalt, bzw. bei Adipositas, auf dem Weg zur Insulinresistenz näher beschrieben werden.

1.4 Die Entgleisung des Stoffwechsels - von der Adipositas zur Manifestation der Insulinresistenz

Es ist bekannt, dass die Ausprägung einer Fettleibigkeit, auch Adipositas, sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen im hohem Maße mit der Insulinresistenz korreliert¹⁰⁵.

Die Adipositas ist laut WHO über das Verhältnis von Körpergewicht zur Körperhöhe definiert (*body-mass-index* (BMI)). Personen ab einem BMI von über 25 gelten als übergewichtig, ab 30 als adipös. Der Grad der Adipositas lässt sich von 1-3 einstufen. Entschieden wichtiger als der BMI, ist die Fettverteilung für die Insulinresistenz. Eine Zunahme des abdominalen Fettes korreliert wesentlich höher mit Parametern der Insulinresistenz¹⁰⁶. Die jeweilige Ausprägung der Adipositas ist von Faktoren wie Genetik, Psyche, Ernährung und Grad der körperlichen Aktivität, abhängig. Aus zellbiologischer Sicht ist die Adipositas durch eine Zunahme sowohl der Zellzahl, (Hyperplasie) als auch der Zellgröße, des Adipozyten (Hypertrophie) charakterisiert, wobei sich die Zellgröße bei adipösen Menschen mehr als verdoppeln kann¹⁰⁷. Die Frage ist, in wie weit ein an Triglyceriden zunehmender Adipozyt sein Sekretionsmuster an Adipozytokinen ändert und welchen metabolischen Effekt dies in Bezug auf die Insulinresistenz für den Organismus hat.

1.4.1 Verändertes Adipozytokinmuster bei Adipositas

Die Veränderung der Sekretion einzelner Adipozytokine ist nicht nur von dem adipozytären Gehalt an Triglyceriden abhängig, sondern stellt ein komplexes Gebilde da. Dem liegt zu Grunde, dass die Adipozytokine sich gegenseitig parakrin regulieren. Zudem sezerniert der Adipozyt

inflammatorische Botenstoffe, die eine Infiltration von Entzündungszellen zur Folge haben, welche ihrerseits parakrin den Hormonstoffwechsel des Adipozyten beeinflussen.

Wesentliches Merkmal bei der Adipositas ist einerseits ein Ansteigen der inflammatorischen Zytokine und des Leptins. Andererseits kommt es zum massiven Absinken der Adiponektinspiegel.

Da Leptin normalerweise sowohl der Adipositas, als auch der Insulinresistenz, entgegenwirkt, deutet die erhöhte Sekretion der fetter werdenden Adipozyten auf eine Leptinresistenz hin¹⁰⁸.

Ein bei Adipositas niedriger Adiponektinspiegel im Plasma konnte sowohl im Mausmodell⁷⁹ als auch beim Menschen gezeigt werden^{109,110}. Dies lässt sich direkt auf die Gewichtszunahme zurückführen. So konnte gezeigt werden, dass eine Zunahme des BMI von 32 auf 45 bei Patienten, nach Entnahmen und Kultivierung humaner Adipozyten, einen drastischen Abfall der Adiponektinsekretion und einen deutlichen Anstieg der Interleukinsekretion (IL-6, -8, -10) verursacht⁴⁸. Bei Gewichtsabnahme konnte dementsprechend ein Anstieg der Adiponektinkonzentration beobachtet werden¹¹¹.

Auch die TNF α -Sekretion des Adipozyten steigt bei adipösen Patienten im Vergleich zum gesunden Zustand um ein Vielfaches an und kann durch Gewichtsverlust reduziert werden¹¹²⁻¹¹⁴.

Gleiches gilt für IL-6. Zudem wirkt IL-6 in murinen, differenzierten 3T3-Adipocyten positiv rückkoppelnd auf dessen Expression und kann zudem durch TNF α erhöht werden¹⁰⁰. Es gibt zudem Hinweise, dass die mit der Adipositas ansteigende Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α , die Sekretion und Expression von Adiponektin senkt¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Die erhöhte Expression inflammatorischer Zytokine des Adipozyten verursacht eine Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe, was im Stadium der Adipositas eine leicht chronische Entzündung des Fettgewebes darstellt. Mit zunehmendem Fettgehalt konnte in Mäusen mittels immunhistologischer Färbung von Makrophagen spezifischen Antigen F4/80, beim Menschen CD68, eine Korrelation zwischen Makrophagendichte und Körpergewicht, als auch zwischen Makrophagendichte und Adipozytengröße, nachgewiesen werden^{69,83,118}.

Angelockt werden die im Blutstrom vorliegenden Monozyten durch Chemokine wie MCP-1, das im Stadium der Adipositas vermehrt von den Adipozyten sezerniert wird⁶⁹. Wie bereits dargestellt, ermöglicht MCP-1 die Anhaftung und Durchwanderung der Makrophagen durch das Endothel mit Hilfe von Expressionsinduktion von VCAM und ICAM in der Endothelzelle. Die Makrophagen sezernieren ebenfalls große Mengen an inflammatorischen Mediatoren wie TNF α und IL-6. Es wurde unter unterschiedlichen Versuchsansätzen sogar gezeigt, dass diese Immunzellen die primäre Quelle inflammatorischer Botenstoffe im Fettgewebe darstellen^{83,118}.

Demzufolge kommt es insbesondere durch die erhöhte Konzentration an TNF α zur Potenzierung der Expression inflammatorischer Zytokine im Adipozyten. Entscheidend für den Stoffwechsel des gesamten Organismus ist jedoch, dass es durch diese Potenzierung auf der anderen Seite zu

einer relevanten Minderung der Expression und Sekretion des „protektiven“ Adiponektins kommt.

Die Inflammation scheint somit für die Potenzierung des für den Stoffwechsel ungünstigen Adipozytokinmusters im Adipozyten im Stadium der Adipositas verantwortlich zu sein. (Abb. 3)

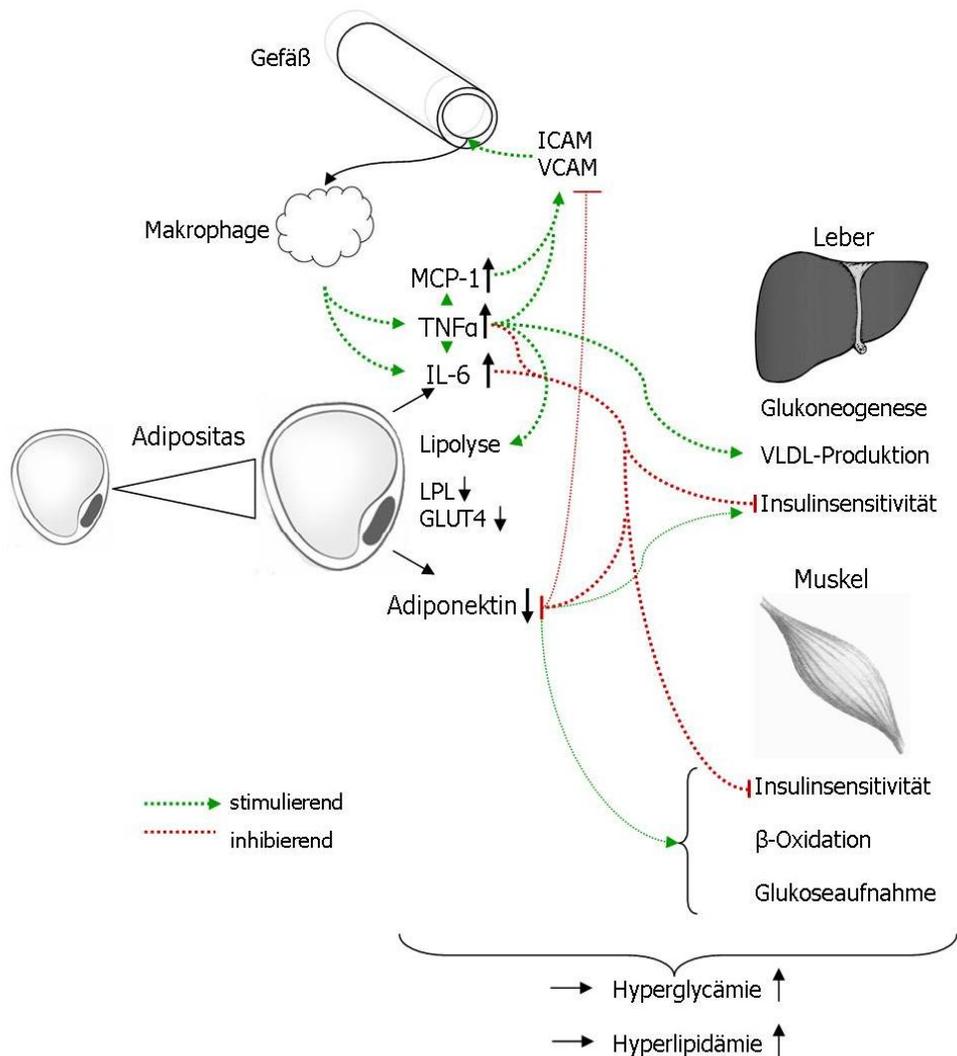


Abbildung 3: Das veränderte Adipozytokinmuster ausgewählter Adipocytokine im Stadium der Adipositas und die folgende Dysregulation des Stoffwechsels

Der Adipozyt sezerniert im Stadium der Adipositas vermehrt MCP-1 TNF α , IL-6 und weniger Adiponektin. Durch die erhöhte Sekretion inflammatorischer Botenstoffe kommt es zur Infiltration von Makrophagen. Diese leicht chronische Entzündung potenziert den Gehalt inflammatorischer Zytokine im Fettgewebe. Dies führt in der Leber zur verstärkten VLDL Produktion. Die Insulinsensitivität im Muskel und in der Leber wird gesenkt. Durch die verminderte Sekretion des Adiponektins entfallen wichtige, für den Stoffwechsel günstige, Eigenschaften, wie eine Erhaltung der Insulinsensitivität und auch eine gesteigerte Glukoseaufnahme und β -Oxidation im Muskel. TNF α und IL-6 supprimieren zudem Adiponektin. Insgesamt kommt es somit zur erhöhten Plasmakonzentration an Glukose und Lipiden.

Diese leichtgradige chronische Entzündung im Fettgewebe und die zunehmende Adipositas dürften auch Ursache dafür sein, dass Marker für oxidativen Stress sowohl mit dem BMI, als auch dem Diabetes korrelieren^{119,120}.

Oxidativer Stress führt zur Entstehung oxidativer Lipoproteine wie oxidiertem LDL (oxLDL), welches wesentlich in die Pathogenese der Atherosklerose involviert ist. Die Konzentration von oxLDL im Plasma kann durch Gewichtsabnahme reduziert werden^{121,122}. Dabei trägt insbesondere eine Zunahme des abdominalen Fettgewebes, gemessen am Hüftumfang, zum Anstieg des oxidativen Stresses bei¹²³.

Es wird diskutiert, ob die Adipozyten den Prozess der Inflammation initiieren. Ursachen dieser Initiierung könnten ein im Adipozyten, durch die Hyperglykämie verursachter Anstieg der *reaktive oxidative spezie* (ROS) sein, die wiederum die Bildung inflammatorischer Zytokine verursachen¹²⁴. Ebenso könnte eine verstärkte Belastung des Endoplasmatischen Retikulums (*er-stress*) zur Initiierung proinflammatorischer Zytokine führen^{125,126}.

Beide Abläufe beeinflussen die inflammatorischen Kinasen *c-Jun-amino-terminal-kinase* (JNK) und *inhibitor of NF- κ B kinase* (IKK), welche wiederum die Transkriptionsregulatoren inflammatorischer Gene durch die Transkriptionsfaktoren *activator protein 1* (ap-1) und NF- κ B regulieren¹²⁷. Der JNK- und IKK-Signaltransduktionsweg stellen die wichtigsten proinflammatorischen Signalwege in Bezug auf die Adipositas dar¹²⁸.

Das veränderte Adipozytokinmuster des adipösen Adipozyten trägt wahrscheinlich direkt zur Entstehung der Insulinresistenz bei, indem es durch Zunahme inflammatorischer Botenstoffe wie TNF α und IL-6 zur Desensibilisierung der Insulinsignalkaskade kommt. Zudem entfallen die protektiven Eigenschaften des Adiponektins auf die Insulinsignaltransduktion.

1.4.2 Manifestation der Insulinresistenz aus Sicht des Adipozyten

Die Ausprägung und Manifestation der Insulinresistenz ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren und Zusammenhänge. Es kommt dabei zu wesentlichen Änderungen sowohl im Glukose- als auch im Fettstoffwechsel, die rückwirkend die Insulinsekretion und -wirkung beeinflussen. Die Desensibilisierung für das Hormon Insulin ist ein schleichender Prozess, an dem der Adipozyt einen wesentlichen Anteil hat.

Neben dem für die Insulinresistenz typischen Adipozytokinmuster, zeichnet sich bei einem mit der Zeit schwächer gewordenen Insulinstimulus eine wesentlich höhere Lipolyse im Adipozyten ab. Dies hat multiple Ursachen, da Insulin sowohl die Aufnahme, den Transport und die Speicherung von Fettsäuren im Adipozyten befördert, als auch deren Abbau und Freisetzung

inhibiert. Ein schwächerer Insulinreiz steigert somit, zusammen mit dem bei der Adipositas angestiegenem TNF α , die Lipolyse. In Kombination mit fettreicher Nahrung können so die Spiegel an freien Fettsäuren im Stadium der beginnenden Insulinresistenz nicht durch den Adipozyten ausreichend reduziert werden. Außerdem kommt es zum verminderten Abbau der Chylomikronen und VLDL am Adipozyten, da es durch den fehlenden Insulinstimulus zur verminderten Expression der LPL kommt. Dieser Zustand wird durch inflammatorische Zytokine verstärkt.

Durch eine ansteigende Konzentration an FFA kann es zur Erhöhung der Insulinsekretion in den β -Zellen kommen¹²⁹. Die durch die Insulinresistenz jedoch chronisch erhöhten Spiegel an FFA können die β -Zellen durch Einlagerung in Form von Triglyceriden ebenso lipotoxisch schädigen und somit zu deren Zerstörung beitragen¹³⁰. Adiponektin ist in der Lage, dies zu verhindern¹³¹. Da dessen Konzentration jedoch mit zunehmender Adipositas sinkt, entfällt dieser schützende Effekt.

Auch andere Organe sind von diesen Einlagerungen in Form von Triglyceriden betroffen. Hierzu zählen insbesondere der Muskel und die Leber. Diese pathologischen Vorgänge werden als Ektopisches-Fettakkumulations-Syndrom bezeichnet¹³². Im Muskelgewebe, welches Fettsäuren normalerweise abbauen kann, ist zudem im insulinresistenten Stadium die β -Oxidation reduziert¹³³. In der Leber hat die Einlagerung von Fettsäuren in Form von Triglyceriden einen Einfluss auf den Lipoproteinstoffwechsel. Die Leber nimmt einen großen Anteil dieser FFA auf. Dies hat in vitro und in vivo, beim Gesunden und ebenso bei der Insulinresistenz, eine erhöhte Sekretion von VLDL-Partikeln in der Leber zur Folge^{134,135}. In HSL *knock-out* Mäusen, deren FFA-Konzentrationen niedrig sind, konnte dementsprechend eine verminderte TG-Sekretion der Leber beobachtet werden¹³⁶. Diese Auswirkungen des erhöhten FFA-Spiegels im Plasma wurde unter anderem an lipoatrophischen Mäusen¹³⁷ und an Lipodystrophie erkrankten Patienten¹³⁸ demonstriert.

Die Insulinresistenz führt somit zum klinischen Bild einer Hyperlipidämie und -lipoproteinämie. Ein ansteigender Spiegel an freien Fettsäuren erhöht direkt die Glukose-Konzentration im Plasma, indem diese sowohl die Aufnahme im Muskelgewebe durch Inhibition der Glukosetransporter und Glukosephosphorylierung reduzieren¹³⁹, als auch die Freisetzung aus der Leber durch erhöhte Glukoneogenese¹⁴⁰ begünstigen. Dieser Effekt summiert sich mit der ohnehin durch die Insulinresistenz bedingte schwächere Aufnahme von Glukose in den peripheren Gewebearten. Es kommt somit zur Verstärkung der Hyperglykämie.

Betrachtet man die Insulinresistenz auf molekularer Signaltransduktionsebene, so konnten bereits mehrere pathologische Veränderungen der Signalkaskade identifiziert werden. So kommt es zum Beispiel sowohl zur Verringerung des Insulinrezeptors auf der Plasmamembran¹⁴¹, als auch zur Einschränkung bei dessen Aktivierung durch Autophosphorylierung der

Tyrosinkinasen¹⁴². Auch stromabwärts der Signalkaskade kann es zu wesentlichen Beeinträchtigungen der Effektormoleküle, wie bereits der Insulinrezeptorsubstrate, kommen^{143,144}. So kommt es beispielsweise auch direkt durch die im Plasma erhöhte FFA-Konzentration zum intrazellulären Anstieg von Acyl-CoA und DAG, was zu einer Phosphorylierung des IRS-1 und weiterhin zur verminderten Aktivität der PI3-Kinase führt¹⁴⁵. Eine verminderte Stimulation durch Adiponektin hat sowohl im Muskel- als auch im Lebergewebe eine erniedrigte β -Oxidation zur Folge. Der hierdurch erhöhte Triglyceridgehalt in diesen Geweben hat einen negativen Effekt auf die Insulinsensitivität, indem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) den Insulinsignaltransduktionsweg behindert¹⁴⁶.

Ein weiteres, bisher nicht dargestelltes Adipozytokin, das *retinol-binding protein 4*, trägt ebenfalls im Stadium der Adipositas zur Entstehung der Insulinresistenz bei. Dies erfolgt durch Inhibition der PI3-Kinase des Insulinsignaltransduktionsweges und der Induktion wichtiger Schlüsselenzyme der Glukoneogenese in der Leber aufgrund einer Hyperglykämie¹⁴⁷.

Negativ rückkoppelnde Mechanismen des Insulinsignaltransduktionswegs wie SOCS3 sind zudem durch den höheren IL-6 Spiegel bei Adipösen dauerhaft aktiviert^{67,104} und verstärken die Insulinresistenz auf Signaltransduktionsebene. Es konnte zudem bei adipösen Menschen eine erhöhte JNK-Aktivität festgestellt werden. Diese Kinase schränkt die Insulinwirkung per Inhibition der Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2, *in vitro*, ein. Es konnte überdies in zwei Mausmodellen durch Inhibition der JNK1 eine Abnahme der Adipositas, wie auch eine Zunahme der Insulinsensitivität beobachtet werden¹⁴⁸.

Es soll an dieser Stelle betont werden, dass der zeitliche Ablauf der dargestellten Ereignisse sehr komplex ist und der Ursprung wie auch die Manifestation der Insulinresistenz nach wie vor nicht völlig aufgeklärt sind. Offensichtlich ist jedoch, dass eine verringerte Insulinsensitivität des Adipozyten eine Dysregulation des Lipidstoffwechsels nach sich zieht, die die Insulinresistenz als auch die Hyperglykämie verstärken kann. Zusätzlich kommt es durch das veränderte Adipozytokinmuster zur Verstärkung dieser Ereignisse. Somit rückt der Adipozyt bezüglich der Insulinresistenz in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses.

1.5 Die Untersuchung am humanen mesenchymalen Stammzellmodell

Es gibt mehrere *in-vitro*-Ansätze um die Adipozytokinsekretion von Adipozyten zu charakterisieren. In vielen Fällen erfolgte dies in der Vergangenheit an den bereits vor über 30 Jahren etablierten 3T3-L1- und 3T3-F442A-Zelllinien^{149,150}. Hierbei handelt es sich um murine Fibroblasten (*precursors*), deren Determination bereits festgelegt ist und die nach Konfluenz unter verschiedenen Differenzierungsfaktoren zu Adipozyten ausdifferenzieren können. Andere

Arbeitsgruppen hingegen kultivieren Adipozyten nach chirurgischer Entnahme an adipösen Patienten oder differenzieren Adipozyten aus Präadipozyten, welche aus dem Fettgewebe isoliert werden.

Für die dieser Arbeit zu Grunde liegende Untersuchung wurden humane mesenchymale Stammzellen von gesunden Probanden verwendet. Diese wurden nach Isolation aus Knochenmarksproben durch die Einfügung einer humanen Telomerase reversen Transkriptase (hTERT) mittels retroviraler Vektoren zu einer Zelllinie immortalisiert (hMSC-TERT)¹⁵¹. Diese Stammzellen sind in der Lage, zu den unterschiedlichen Zellarten des Mesenchyms wie Osteoblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, als auch Adipozyten zu differenzieren^{152,153}. Dieses Modell eignet sich besonders gut für Untersuchungen der Adopzytokinregulation, da es sich zum einen um eine humane Zelllinie handelt. Zum anderen können diese Stammzellen vollständig zu reifen Adipozyten ausdifferenzieren und somit den physiologischen und auch den pathophysiologischen Zustand in vivo am ehesten widerspiegeln¹⁵⁴. Ebenso können unvorhersehbare Einflüsse durch Mutationen, wie es bei Liposarkomzelllinien (AW872) oder den Zellen von Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom-Patienten (SGBS) der Fall ist, ausgeschlossen werden.

Die Differenzierung der Adipozyten aus mesenchymalen Stammzellen erfordert ein Gemisch verschiedener Mediatoren. Hierzu zählen Insulin, der Phosphodiesteraseinhibitor Isobutylmethylxanthin (IBMX), der MAPK-Inhibitor U0126, das pharmakologisch Glukokortikoid Dexamethason und der pharmakologische PPAR γ -Antagonist Rosiglitazon. Der Differenzierung liegen komplexe molekulare Regulationsmechanismen zu Grunde, deren ausgiebige Erläuterung nicht Teil dieser Arbeit sein soll, die jedoch detailliert untersucht worden ist^{154,155}.

Bei U0126 handelt es sich um einen MAPK-Inhibitor. Somit wird das Wachstum der Zelle inhibiert und die Differenzierung vorangetrieben. Die genauen Mechanismen sind hierbei noch nicht bekannt. Dexamethason führt zur Induktion des *CCAAT/enhancer binding protein γ* (C/EBP γ) welches zusammen mit dem durch IBMX aktivierten C/EBP β ¹⁵⁶ unter anderem die Expression von PPAR γ induziert¹⁵⁷. Dieser Effekt ist jedoch nur in Anwesenheit von Insulin möglich¹⁵⁸. Die Induktion von PPAR γ wird durch den pharmakologischen Antagonisten Rosiglitazon wesentlich verstärkt. PPAR γ stellt in der Adipogenese den wichtigsten Transkriptionsfaktor dar und führt zur Induktion von einer Reihe hier zu untersuchender Differenzierungsmarker. So führt es zur Induktion der Expression von aP2¹⁵⁹, ApoE¹⁶⁰, GLUT 4¹⁶¹ und LRP1¹⁶². PPAR γ wird zudem durch zwei weitere Transkriptionsfaktoren, das *adipocyte determination and differentiation faktor 1* (ADD-1) (auch SREBP-1c) stimuliert¹⁶³. Diese beiden Transkriptionfaktoren induzieren zudem lipogene Enzyme wie FAS, welches ebenfalls als Differenzierungsmarker gilt.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das bereits etablierte Differenzierungsprotokoll in Anbetracht der Differenzierungszusätze Unterschiede in der Adipozytokinsekretion aufwies. So konnte gezeigt werden, dass unter Entzug sämtlicher Differenzierungsfaktoren für 2 Tage die Sekretion von Adiponektin um ein Vielfaches abfiel und entgegengesetzt die Sekretion von IL-6 um ein Vielfaches anstieg. Dabei wurde ein auf Adiponektin stimulierender und auf IL-6 inhibierender Effekt des Rosiglitazons postuliert. Dieser Sachverhalt bedarf näherer Untersuchung. Interessant hierbei ist, dass das Zellmodell auf diese modulierende Art den Sekretionszustand des Fettgewebes sowohl im gesunden Zustand (IL-6↓, Adiponektin↑), als auch im pathologischen Zustand der Adipositas (IL-6↑, Adiponektin↓) widerspiegelt.

1.6 Fragestellung

Wie dargestellt, handelt es sich beim Fettgewebe nicht um ein passives Speicherorgan. Vielmehr ist es als ein komplexes hormonelles Organ zu bezeichnen, welches mit dem Stoffwechsel des Organismus als auch mit dem Immunsystem interagiert und wesentlich zur Entstehung und Manifestation der Insulinresistenz beiträgt.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, die Regulation wichtiger Adipozytokine durch exogene Stimuli und in Anbetracht des zellulären Triglyceridgehaltes auf Sekretionsebene zu untersuchen. Das kürzlich etablierte hMSC-TERT-Zellmodell soll hierbei helfen, zum einen, unter der Differenzierung, also mit einer Zunahme des Triglyceridgehaltes, das Stadium einer sich entwickelnden Adipositas zu simulieren und die dementsprechende Veränderung im Adipozytokinmuster zu reproduzieren. Zum anderen, soll der Einfluss der Differenzierungsbedingungen auf den Adipozytokinstoffwechsel näher charakterisiert werden. Ferner sollen diesem pathologischen Prozess exogene Substanzen wie oxidierte- und nicht oxidierte Lipoproteine, Cholesterin und FFA, die eine wichtige Rolle beim der Pathogenese der Insulinresistenz spielen, zugeführt werden, um deren Einfluß auf das Adipozytokinmuster zu erfassen.

Um diese Aussagen auf einen stabil differenzierten Zellzustand beziehen zu können, werden neben histologischer Untersuchung Differenzierungsmarker gemessen und der Triglyceridgehalt der Zellen bestimmt.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit soll es sein, zum Verständnis der komplexen, pathologischen Veränderungen im Adipozyten während des Prozesses der Insulinresistenz beizutragen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Adipozytäre Differenzierung

Geräte:

- sterile Werkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
- CO₂-Brutschrank CB210 (Binder, Tuttlingen)
- CASY[®] Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System, Reutlingen)

Zellen:

- hMSC-Tert T20, humane mesenchymale Stammzelllinie

Zellkulturmedium:

- DMEM + 4500 mg/L Glucose + GlutamaxI + Pyruvate (GIBCO 31966-021, Invitrogen)
- Fötale Kälberserum (GIBCO 10270-106, Invitrogen)
- Penicillin-Streptomycin 10.000 units/mL (GIBCO 15140-122, Invitrogen)

Differenzierungszusätze:

- Dexamethason (D4902, Sigma)
- Isobutylmethylxanthin IBMX (I5879, Sigma)
- Insulin human 10 mg/mL (I9278, Sigma)
- Rosiglitazon (71740, Cayman)
- U0126 (662005, Calbiochem)

Arbeitsmaterialien:

- PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Trypsin-EDTA 1x (GIBCO 25300-054, Invitrogen)
- 24 well platten (Nunc 167008)
- Cover Slips, Ø13 mm (Assistent, Sondheim)
- Kulturflaschen N75 (Nunc 178891)
- Zellysispuffer (50mM Tris, 2nM CaCl₂, 80mM NaCl, 1% Triton X, pH 8)

Die mesenchymale Stammzelllinie human-mesenchymal-stem-cell-Telomerase-Reverse-Transkriptase (hMSC-Tert) wird in 10% FCS/1%PenStrep-Kulturmedium in N75-Kulturflaschen gehalten. Die hMSC-Tert müssen ca. alle 5 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet werden. Hierfür wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und jede Flasche mit 4ml Trypsin-EDTA für 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend können die gelösten Zellen mit Hilfe einer Pipette homogenisiert und im genannten Verhältnis neu ausgesetzt werden.

Die für die Differenzierung verwendeten Stammzellen wiesen eine Passagezahl zwischen 76 und 108 auf. Zu Beginn einer Differenzierung werden die Zellen auf 4x24 *well*-Platten ausgesät. Die mittels des *CASY cell counter* ermittelte Zellzahl beträgt hierbei 25.000 Zellen/cm³. Bei einer Fläche von 1,8 cm³ werden somit fünfzigtausend Zellen pro *well* bei einem Volumen von 1ml ausgesetzt.

Die Zellen proliferieren in der Regel innerhalb von 2 Tagen soweit, dass ein konfluenter Zellrasen entsteht. Ist dieser Zustand erreicht, so beginnt die Induktion der Differenzierung (Tag 0). Hierfür wird das 10% FCS Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und jedem *well* 1ml des Differenzierungsmediums mit 5% FCS, 1% PenStrep und den Zusätzen zugesetzt.

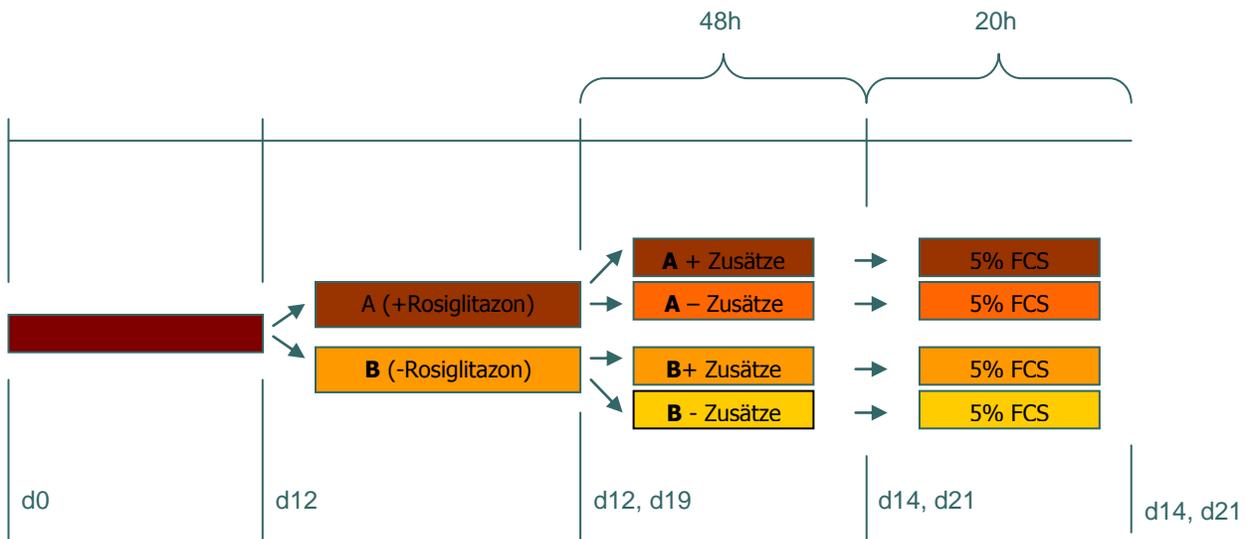


Abbildung 4: Differenzierungsschema der hMSC-Tert

Die hMSC-Tert werden bis zum Tag 12 in Kulturmedium mit 5% FCS und 1% PenStrep sowie 0,1 µM Dexamethason, 450 µM IBMX, 2 µM Insulin, 1 µM Rosiglitazon und 1 µM U0126 differenziert. Am Tag 12 werden die Zellen in A- und B-Protokoll unterteilt, wobei die Zellen des B-Protokolls ohne Zugabe von Rosiglitazon weiter differenzieren. 3 Tage vor Probenentnahme werden die Zellen unter den zu untersuchenden Umständen für 48h inkubiert. Hierbei werden jeweils zusätzlich zum A- und B-Protokoll alle Differenzierungszusätze entzogen (A-/B-) bzw. belassen (A+/B+). Abschließend werden alle Zellen 20 Stunden mit 5% FCS/1%PenStrep-Kulturmedium inkubiert, um in diesem Medium die Adipocytokinkonzentration zu bestimmen.

Unter den fünf zur optimalen Differenzierung nötigen Zuätzen befinden sich 0,1µM Dexamethason, 450µM IBMX, 2µM Insulin, 1µM Rosiglitazon und 1µM U0126. Das Differenzierungsmedium wird ab Tag 0 drei Mal pro Woche gewechselt.

Am 12. Tag werden die Zellen in ein A-Protokoll und ein B-Protokoll, wie in Abbildung 4 zu erkennen, untergliedert. Die Zellen des A-Protokolls werden weiterhin mit den genannten 5 Zusätzen differenziert. Die Zellen des B-Protokolls werden ohne Rosiglitazon differenziert.

Wie in Abbildung 4 bereits zu erkennen, werden am 12. und 19. Tag die beiden Protokolle wieder untergliedert, so dass ein A- und B-Protokoll jeweils mit (+) und ohne (-) Zusätzen entsteht. Für die zu untersuchenden Zellen des 12. Tages gilt hierbei, dass der Zeitraum, zwischen Untergliederung in A- und B-Protokoll und der darauf folgenden weiteren Untergliederung in A+/B+ und A-/B-Protokoll, 8 Stunden beträgt. Somit werden 4 Grundzustände erzeugt, die eine breite Untersuchung von Einflussfaktoren ermöglichen.

Der auf diese Untergliederung folgende Zeitraum von 48 Stunden stellt somit die zu vergleichende Grundlage des Versuchsschemas dar (Standardprotokoll). In diesem Zeitraum wird in den folgenden Experimenten die Veränderung der Adipozytokinsekretion durch zusätzliche Inkubation mit LDL, VLDL, Cholesterin oder Fettsäuren untersucht.

Um die Hormonsekretion der differenzierenden Adipozyten zu untersuchen werden die Zellen aller Zustände (A+/B+/A-/B-) für 20 Stunden mit Kulturmedium (5% FCS/1% PenStrep) inkubiert.

2.2 Entnahme der Überstände

Geräte:

- Zentrifuge (1-15K, Sigma)

Zur Probenentnahme werden nach den beschriebenen 20 Stunden die Überstände abgenommen und in ein 1,5ml Eppendorftube überführt. Um der eventuellen Abnahme von Zellen entgegenzuwirken, werden die gewonnenen Proben für 5 Minuten bei 2000upm in der Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert und die Überstände in ein neues Eppendorftube überführt. Die Proben werden bis zur Analysierung bei -20°C tiefgefroren.

2.3 Herstellung des Zelllysates

Geräte:

- Zentrifuge (1-15K, Sigma)

Materialien:

- PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Zelllysispuffer (50mM Tris, 2nM CaCl₂, 80mM NaCl, 1% Triton X, pH 8)

Nach Abnahme der Überstände wird der Zellrasen mit gekühltem PBS gewaschen. Jedem *well* werden 300µl Zelllysispuffer hinzugegeben. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wird das Zelllysat mit der Pipette homogenisiert und 100µl jeder Probe zur Triglyceridbestimmung separat abgenommen. Die übrigen 200µl werden in ein Eppendorftube überführt und für 15 Minuten bei 13000upm und 4°C abzentrifugiert, um möglichst die Proteine im Zytoplasma unabhängig von den Zelltrümmern untersuchen zu können. Nach der Zentrifugation werden die Überstände in eine neue Eppendorftube überführt. Die Zelllysate werden ebenfalls wie die Überstände bei -20°C gelagert.

2.4 Fettrot- , DAPI - Färbung:

Geräte:

- Inkubator (Heraeus, Hanau)

Material:

- Fettrot bläulich (46290, Fluka)
- 4% Paraformaldehyd (P6148-5006, Sigma)
- PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- DAPI (D8417, Sigma)
- Ethanol (UN1170, Walter C. GmbH)
- Mowiol (475904, Calbiochem)
- Objektträger (76x26mm, Engelbrecht)
- Nagellack

Um den Erfolg der Differenzierung auf mikroskopischer Ebene zu bestätigen, werden die Fettvakuolen der Zellen der Tage 0, 7, 14 und 21 mittels Fettrotfärbung sichtbar gemacht.

Das hierfür nötige Fettrot wird zu 0,3% in 70% Ethanol gelöst und über Nacht bei 56°C inkubiert. Anschließend wird es vor der Verwendung filtriert, um zurückgebliebene Farbkristalle zu entfernen.

Für den Färbeprozess werden die Zellen der genannten Zeitpunkte zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um die Mediumreste vollständig zu entfernen. Anschließend werden die Zellen auf den *cover-slips* für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Es folgen ein Waschschriff mit PBS und zwei weitere zweiminütige mit 50% Ethanol.

Danach erfolgt die Färbung mit 1ml pro *well* der Fettrotlösung für 10 Minuten. Die überschüssigen Rückstände der Färbelösung werden daraufhin dreimal mit 1ml pro *well* 50% Ethanol für jeweils 3 Minuten abgewaschen. Es folgen drei weitere Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 Minuten. Um die Nukleinsäuren der Zellkerne sichtbar zu machen, werden die Zellkerne nun mit frisch angesetzter DAPI-Lösung (0,03µl/ml PBS) für 3 Minuten inkubiert. Abschließend werden die *cover-slips* zwei weitere Male mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die *cover-slips* werden nun mit 0,1% para-Phenyldiamin in Mowiol auf einem Objektträger eingedeckelt. Die getrockneten Präparate werden zum Schutz mit Nagellack umsäumt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Die Zellen können nun mittels Durchlichtmikroskopie auf die Fettrotfärbung und mittels UV-Licht auf ihre Zellkernfärbung hin untersucht werden.

2.5 Herstellung, Oxidierung und Einsatz der Lipoproteine

Geräte:

- Inkubator (Heraeus, Hanau)

Materialien:

- 5µM Kupfersulfat (Heeren)
- 2PD10 Säule (17-0851-01, GE-Healthcare)
- LDL-Partikel 2mg/ml (Heeren)
- VLDL-Partikel 2mg/ml (Heeren)
- PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)

Die Lipoproteine wurden mittels Ultrazentrifugation aus normolipämischen Probandenplasma gewonnen und auf 2mg/ml in PBS verdünnt. Die isolierten Lipoproteine wurden für die Studien zur Verfügung gestellt.

Die Oxidation der Lipoproteine wird mit 5µM Kupfersulfat für 4 Stunden bei 37°C vollzogen. Um das Kupfersulfat zu entfernen, werden die oxidierten LPL durch Gelchromatographiemittels PD-10-Säulen in PBS umgepuffert.

Die oxidierten LDL- sowie VLDL-Partikel werden jeweils im Verhältnis 1:20 dem Medium der einzelnen Zustände der Zellen am Tag 12 und 19 der Differenzierung zugesetzt. Somit liegt in den Zellüberständen eine Konzentration von 0,1mg/ml vor.

2.6 Herstellung und Einsatz des Cholesterins und der Ölsäure

Material:

- Ethanol (UN1170, WalterC. GmbH)
- Cholesterin (Sigma)
- Ölsäure (Sigma)

Das Cholesterin und die Ölsäure wurden in Ethanol in einer Konzentration von 10mg/ml und 28mg/ml gelöst. Der Einsatz in den Überständen der Zellen am Tag 12 und 19 erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000, so dass in den Überständen für Cholesterin eine Endkonzentration von 10µg/ml und für Ölsäure eine Konzentration von 28µg/ml vorliegt.

2.7 Sekretionsmessung

Geräte:

- ELISA-Platten (469949, Nunc)
- ELISA reader Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)
- Zentrifuge (1-15K, Sigma)

Materialien:

- humaner Adiponektin ELISA (Duoset DY1065, R&D Systems)
 - *capture-antibody*: 360 µg/ml PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen) mouse anti-human Adiponektin (Part 840965)
 - *detection-antibody*: 360 µg /ml *reagent-diluent* mouse anti human Adiponektin (Part 840966)
 - Standard: 80ng/ml *reagent-diluent* rekombinantes humanes Adiponektin (Part 840967)

- humaner IL-6 ELISA (Duoset DY206, R&D Systems)
 - *capture-antibody*: 360 µg/ml PBS mouse anti-human Adiponektin (Part 840113)
 - detection antibody: 360 µg /ml *reagent-diluent* mouse anti human Adiponektin (Part 840114)
 - Standard: 80ng/ml *reagent-diluent* rekombinantes humanes Adiponektin (Part 840115)

- PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- *reagent-diluent*: 1%BSA (K41-001, PAA) in PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Wasch-Puffer: 0,05% Tween 20 in PBS (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Substrat: 1ml H₂O₂ (Heeren), 1ml Tetramethylbenzidine (Heeren), 1ml Substratpuffer (Heeren), 25ml a.d.
- Stop Solution 2M h₂SO₄ (Heeren)

Die hormonelle Sekretion von Adiponektin und IL-6 wird unter den beschriebenen Bedingungen an Tag 14 und 21 der Differenzierung in den Zellüberständen mittels *enzyme linked immunoabsorbant assay* (ELISA) quantitativ untersucht.

Die Inkubation der hierfür nötigen Platten mit dem in PBS 1:180 gelösten *capture*-Antikörper erfolgt über Nacht. Die aus den Zellüberständen gewonnenen Proben werden zunächst im *reagent-diluent* für Adiponektin im Verhältnis 1:50 und für IL-6 im Verhältnis 1:250 verdünnt. Die über Nacht mit dem *capture*-Antikörper inkubierten Platten werden mit 4 x 300µl pro *well* Waschpuffer gewaschen und für eine Stunde mit 300µl des *reagent-diluent* geblockt. Nach erneutem Waschen werden die Platten anschließend mit 100µl der verdünnten Proben bestückt. Für Adiponektin wird ein Standard von 2000pg/ml und für IL-6 ein Standard von 300µg/ml verwendet. Die Platten werden anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Hiernach werden die *wells* erneut nach dem gleichen Schema gewaschen und mit 100 µl des in *reagent-diluent* 1:180 verdünnten *detektion*-Antikörper beladen. Es erfolgt eine weitere Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Die Platten werden wiederum nach gleichem Schema gewaschen und anschließend für genau 25 Minuten mit dem in *reagent-diluent* 1:500 verdünnten *horse-radish-peroxidase* (HRP)-Antikörper inkubiert. Es folgt nochmals ein Waschschriff mit 4x 300 µl Waschpuffer.

Jedem *well* werden nun zügig 250µl des Substrates zugesetzt. Es sollte ein blauer Farbumschlag in den *wells* zu beobachten sein. Nach 20 Minuten wird die enzymatische Reaktion der HRP durch 50µl 2M Schwefelsäure gestoppt. Die nun gelb zu erkennende, unterschiedliche optische Dichte wird sowohl bei 450 als auch 540 nm im Photometer gemessen. Die Werte der Messung bei 540nm werden später zur Auswertung jenen bei 450 nm abgezogen. Dieser Vorgang dient dazu, den optischen Fehler, der durch die Platte selbst verursacht wird, zu minimieren.

Den Leerwert stellt eine dem jeweiligen Adipozytokin entsprechend verdünnte 5%FCS/Kulturmedium-Probe dar. Die mit Hilfe der Eichgrade ermittelten Adiponektin und IL-6 Konzentrationen werden im Folgenden auf die Proteinkonzentration in jedem einzelnen *well* bezogen, um mögliche Konzentrationsdifferenzen, die durch die unterschiedliche Zellzahl hervorgerufen sind, zwischen den einzelnen *wells* zu minimieren.

2.8 Proteinbestimmung

Geräte:

- 96-well-Platte (Nunc, Dänemark)
- ELISAREADER Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)

Materialien:

- 0,1M NaOH
- Lösung A (2% Na₂CO₃, 0,02% Natriumkaliumtartrat in 0,1 M NaOH)
- Lösung B (0,5M KuSO₄ Pentahydrat, 5% SDS in a.d)
- Folin (UN3264, MERCK)
- Standard (23209, PIERCE)

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte aus den 200 µl pro *well* gewonnenen Zelllysates mittels der Methode nach Lowry.

Hierfür werden die Proben und der Standard 1:5 in 100µl 0,1M NaOH verdünnt. Die Konzentration des zu verdünnenden Standards betrug 2mg/ml. Anschließend wird jedem Ansatz 1ml einer Lösung C hinzugegeben, die zu 49 Teilen aus Lösung A und zu 1 Teil aus Lösung B besteht. Die Proben werden durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Abschließend werden jedem Ansatz 100µl einer 1:2 in aqua dest. verdünnten Folinlösung zugesetzt. Es ist ein blauer Farbumschlag zu beobachten. Die Proben werden nochmals durchmischt und für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Nun können jeweils 200 µl des Probenansatzes auf eine 96-well-Platte übertragen werden. Die Messung der optischen Dichte der Ansätze erfolgt bei 750nm im Photometer. Den Leerwert stellt der in 0,1M NaOH 1:5 verdünnte Zelllysispuffer dar. Die Konzentrationen können anhand der Steigung der Eichgeraden errechnet werden.

2.9 Triglyceridbestimmung

Geräte:

- 96-well-Platte (Nunc, Dänemark)
- Inkubator (Heraeus, Hanau)
- ELISA reader Biotrak II Plate Reader und Software Biochrom Data Capture (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)

Material:

- PBS -CaCl₂ -MgCl₂ (GIBCO 14190-094, Invitrogen)
- Messkit (Triglyceride GPO-PAP 1488899, Roche)

Die vor der Abzentrifugation des Zelllysates gewonnenen Proben werden auf ihren Triglyceridgehalt mit Hilfe eines enzymatischen Kits hin analysiert.

Hierfür wird die Probe mit der Pipette gründlich homogenisiert und anschließend auf der 96-well-Platte 1:10 auf 100µl PBS verdünnt. Anschließend werden jedem Ansatz 200 µl der Messkit-Reagenz hinzugegeben und die Platte bei 37°C für 10 Minuten inkubiert.

Abschließend kann nun die optische Dichte bei 540nm im Photometer gemessen und mit Hilfe der Eichgeraden die Konzentration bestimmt werden. Als Leerwert gilt hier der 1:10 in PBS verdünnte Zelllysispuffer.

2.10 SDS Gelelektrophorese

Geräte:

- Elektrophoresekammer und Zubehör X-Cell Sure Lock (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Material:

- Probenmix:
 - 50% Probenpuffer 10% SDS in 250mM Tris pH 8
 - 25% Bromphenolblau (17-1329-01, Pharmacia Biotech) in 87% Glycerin
 - 25% Mercaptoethanol (28625, Serva)
- Gradientengele 4-12% (NP0321 Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Laufpuffer MES-Puffer 20x (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Proteinmarker RPN 800 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA)

Um die Expression wichtiger Differenzierungsmarker wie auch die des Adiponektins auf Proteinebene zu analysieren, werden die Proben des Zelllysates in 4-12% Gradientengelen aufgetrennt, mittels *western-blot* auf einer Nitrocellulosemembran fixiert und abschließend mittels Immundetektion erfasst.

Hierfür werden die Proben und der Probenmix im Verhältnis 65/35 gemischt und jeweils 20µl pro Spur auf dem Gel aufgetragen. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 0,5µg/µl und somit einer Masse von 10 µg Protein pro Spur. Die Auftrennung erfolgt in einem MES-SDS-Puffersystem bei einer Spannung von 200 mV für ca. 30 Minuten nach einer Einlaufphase bei 80mV. Als Standard dient hierbei ein farblich markierter Proteinstandard. Nach Durchlauf der Proben wird das Gel aus der Kammer entfernt und für den *western-blot* vorbereitet.

2.11 Western-Blot

Geräte:

- Blottingkammer und Zubehör TRANS Blot Cell (BioRad, USA)

Material:

- Blotting Puffer: 150mM Glycin, 20mM Tris, 20% MeOH

- Nitrocellulosemembran PROTRAN, Porengröße 0,45 µm (Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel)
- Blotting Papier (3mmCHR Whatman)

Das Blotting der Gele erfolgt über Nacht in Blotting Puffer bei 200mA und 4°C. Hierbei wurde eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Am darauffolgenden Tag kann die gleichmäßige Beladung der einzelnen Gelkammern mittels Pancau-Färbung überprüft werden.

2.12 Ponceau Färbung

Material:

- Ponceau S-Lösung: 0,2% in 3% Trichloressigsäure (Serva)

Die Membran wird für 10 Minuten in der Ponceau-Färbelösung gegeben und anschließend mit aqua dest. entfärbt, bis die Banden klar erkennbar sind. Die Membranen werden mittels eines Scanners dokumentiert, je nach Antikörperdetektion zurechtgeschnitten und beschriftet und in aqua dest. vollständig entfärbt.

2.13 Immundetektion

Geräte:

- Filmentwickler (Kodak)
- Hoefer Processor Plus (Amersham Biosciences, USA)

Material:

- Waschlösung: 0,1% Tween in TBS (1,4M NaCl, 200mM Tris, pH 7,6)
- Blocklösung: 10% Milchpulver in TBS/ 0,1% Tween (Adiponektin: 10% Milchpulver, 2% BSA (11930, Sigma) in TBS/ 0,1% Tween)
- Entwicklungsreagenz pro Membran:
 - 2ml Lösung A: 0,25mg Luminol/ml 0,1M Tris-HCl, pH 8,6
 - 500µl Lösung B: 1,1mg para-Hydroxy Cumarinsäure/ml DMSO
 - 1,5 µl H₂O₂

- 1. Antikörper: siehe Tabelle 2, verdünnt in entsprechender Blocklösung:

Protein	Größe [kDa]	Antikörper	Hersteller	Verdünnung
FAS	265	mouse-anti-human	610962 BD, Biosciences	1:200
IRS-1	170	rabbit-anti-human	06-248, Upstate	1:5000
IRS-2	170	rabbit-anti-human	06-506, Upstate	1:5000
LRP1	85	sheep-anti-human	(Heeren et al. ¹⁶⁴)	1:200
β-Aktin	42	mouse-anti-human	A5441, Sigma	1:30.000
apoE	34	rabbit-anti-human	084(601), DAKO	1:5000
Adiponektin	34	mouse-anti-human	Ab22554, abchem	1:500
aP2	15	Rabbit-anti-human	Lilly company	1:5000

Tabelle 2: 1. Antikörper zur Immundetektion

Die entsprechenden Abschnitte der Nitrocellulosemembran wurden mit den gezeigten 1. Antikörper in 5% BSA in TBS/0,1%Tween über Nacht inkubiert. FAS=*fatty acid synthase*, IRS=Insulinrezeptorsubstrat, LRP=*LDL-receptor related protein*, apoE=*apolipoprotein E*, aP2=*adipocyte lipid binding protein*

- 2. Antikörper: siehe Tabelle 3, verdünnt in entsprechender Blocklösung

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
GARPO	111-035-144 Jackson-Immuno-Research	1:5000
GAMPO	111-035-146 Jackson-Immuno-Research	1:5000
GASPO	111-035-147 Jackson-Immuno-Research	1:5000

Tabelle 3: 2. Antikörper zur Immundetektion

Die gezeigten 2. Antikörper mit Ausnahme der GAMPO für die Adiponektin-detektion (10%Milchpulver,2%BSA in TBS/0,1%Tween) wurden in einer Blocklösung aus 10%Milchpulver in TBS/0,1% Tween eingesetzt. Die entsprechenden Membranabschnitte wurden für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. GARPO=*goat anti rabbit peroxidase*, GAMPO=*goat anti mouse peroxidase*, GASPO=*goat anti sheep peroxidase*

Nach vollständiger Entfärbung der Membran wird diese für 2 Stunden in Blocklösung inkubiert. Für die auf Adiponektin hin zu detektierende Membran geschieht dies mit 2%BSA/10%

Milchpulver in TBS/0,1%Tween. Für alle übrigen zu detektierenden Proteine erfolgt die Blockierung der Membranen in 10% Milchpulver in TBS/0,1%Tween.

Nach der Blockierung wird die Membran kurz in TBS/0,1%Tween abgespült und über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die gebrauchten Antikörper und deren Verdünnung in 5% BSA in TBS/0,1% Tween sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Anschließend wird mit Hilfe des *Processors* die Membran 3 x 10 Minuten in TBS/0,1% Tween automatisch gewaschen und für 1,5 Stunden mit dem entsprechenden in Blocklösung verdünnten Peroxidase-gekoppelten Antikörper inkubiert. Deren Verdünnung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Es folgen drei weitere Waschschrte mit TBS/0,1%Tween für jeweils 10 Minuten.

Abschließend werden die Membranen mit ECL beschichtet und für exakt 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige ECL wurde mit Hilfe von Whatman-Papier entfernt und die Membranen in einer Entwicklungskassette angeordnet.

Die Entwicklung erfolgt jeweils für 5 Sekunden, 30 Sekunden, 2 -, 4 -, 10 - und 30 Minuten, um eine optimale Erfassung der jeweiligen Banden zu gewährleisten.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in folgende Abschnitte unterteilen: im ersten Teil (3.1) wird die Differenzierung des verwendeten Adipozytenmodells anhand mikroskopischer Aufnahmen bei Durchlichtmikroskopie, sowie Fettrot- und DAPI-Färbung, dokumentiert.

Im darauffolgenden Teil (3.2) wird die Adipozytokinsekretion der einzelnen Versuche dargestellt. Hierzu zählen die Untersuchung der Einflussnahme der Differenzierungszusätze (3.2.1), die veränderte Sekretion nach Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln (3.2.2), oxidierten VLDL-Partikeln (3.2.3) sowie im Folgenden der Vergleich nach Inkubation mit oxidierten als auch nicht oxidierten, nativen VLDL-Partikeln (3.2.4). Um den Einfluss der verschiedenen Lipoproteinkomponenten auf die Adipozytokin-Sekretion zu untersuchen, wurden die Adipozyten ebenfalls mit Cholesterin und Fettsäuren inkubiert (3.2.5).

Im dritten Kapitel (3.3) wurden zu den Sekretions-Ergebnissen der jeweiligen Experimente, der Triglyceridgehalt der Zellen nach Inkubation mit oxidiertem LDL- (3.3.1) und oxidierten VLDL-Partikeln (3.3.2), wie auch bei vergleichender Inkubation oxidierten und nicht oxidierten VLDL-Partikel (3.3.3), bestimmt.

Im letzten Kapitel (3.4) wird der Erfolg der Differenzierung anhand der Differenzierungsmarker FAS, LRP, apoE, Adiponektin und ap2 auf Proteinexpressionsebene in Abhängigkeit von den verschiedenen Inkubationen in den Experimenten untersucht.

3.1 Mikroskopische Dokumentation der Differenzierung

Neben der Bewertung der Differenzierung durch Expressionsanalysen wichtiger Differenzierungsmarker werden morphologische Kriterien des adipozytären Phänotyps beschrieben. Die Differenzierung von humanen und murinen Adipozyten ist durch die Entstehung sog. *lipid-droplets* charakterisiert, die im Laufe sich erhöhender, zellulärer Triglyceridspiegel akkumulieren und große Lipidvakuolen bilden.

Ein ausdifferenzierter Adipozyt ist durch eine einzige Lipidvakuole, die den Großteil des Zytoplasmas einnimmt, und einen an den Rand gedrängten Zellkern, charakterisiert. Man spricht in der Histologie auch von sog. Siegelringzellen.

Um den Verlauf der Differenzierung histologisch zu beschreiben, erfolgte sowohl eine Durchlichtmikroskopie (Abb. 5), als auch eine Fettrot-DAPI-Färbung der Zellen (Abb. 6) jeweils im Abstand von einer Woche am Tag 0, 7, 14 und 21 der Differenzierung der hMSC-Tert.

In Abbildung 5 ist der Verlauf der Differenzierung am Tag 7, 14 und 21 mittels Durchlichtmikroskopie dokumentiert. Am Tag 0 waren mit dieser Methode keine nennenswerten Strukturen auszumachen. Deutlich zu erkennen sind stark lichtbrechende, runde Strukturen, die im Laufe der Differenzierung zuerst an Anzahl und schließlich an Größe gewinnen.

Am Tag 7 treten diese Strukturen vereinzelt im Zellbild auf. Sie sind ungleichmäßig verteilt und scheinen in Gruppierungen vorzuliegen. Am Tag 14 nimmt deren Anzahl und vereinzelt deren Größe stark zu. Am Tag 21 sind schließlich große vesikuläre Strukturen im gesamten Zellbild auszumachen. Zudem nimmt auch der Zellhintergrund, das heißt die gesamte Zellzahl pro *well*, zu. Dies ist an dem grau-fleckigen Hintergrund zu erkennen.

Da es sich bei den vesikulären, stark lichtbrechenden Strukturen höchstwahrscheinlich um zu Lipidtröpfchen akkumulierte Triglyceride handelt, wird zum Nachweis eine Fettrot-DAPI-Färbung durchgeführt. Eine Auswahl mikroskopischer Aufnahmen nach diesen Färbungen ist in Abbildung 6 (siehe Seite 39) zusammengefasst. Wie hier zu erkennen ist, konnten triglyceridhaltige Vesikel an den Tagen 7, 14 und 21 bei 100facher Vergrößerung eindeutig nachgewiesen werden. Diese treten an Tag 7 nur vereinzelt, ungleichmäßig und gruppiert auf. An Tag 14 ist das gesamte Zellbild hingegen mit zum Teil größeren Lipidvesikel übersät, deren Größe im Verlauf der Differenzierung am Tag 21 stark zunimmt.

Am Tag 0 hingegen sind selbst bei 630facher Vergrößerung keine mit Fettrot anzufärbenden Strukturen erkennbar. Hier hingegen sind die mit DAPI angefärbten Nukleinsäuren in den Zellkernen gut sichtbar. Ebenfalls charakteristisch ist die zentral im Bild zu erkennende Zellteilung der Stammzellen. In ihrer Morphologie weisen diese eine durchaus typische Homologie zu Fibroblasten mit ihren brückenartigen Zellausläufern (Nexus) auf.

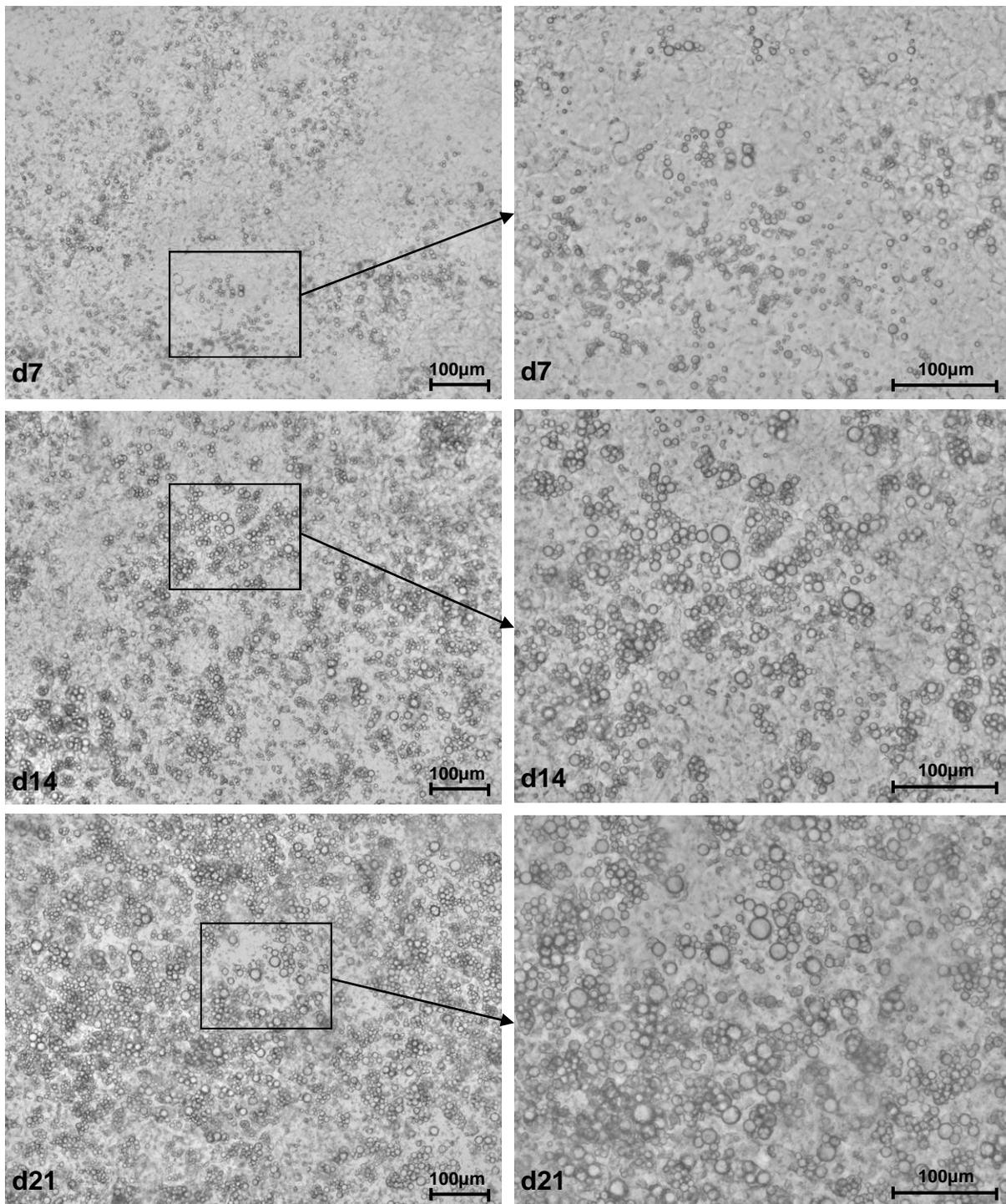


Abbildung 5: Durchlichtmikroskopie der adipozytäre Differenzierung

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen bei Durchlicht in 100facher (links) und einem Ausschnitt der Ersteren in 200facher Vergrößerung (rechts) der Tage 7,14 und 21.

Am Tag 7 beginnen ungleichmäßig kleine Lipidtröpfchen sich gruppiert zu bilden, die sich dann am Tag 14 stark vermehren, und vereinzelt auch in ihrer Größe zunehmen. Am Tag 21 haben die Lipidvesikel stark an Größe zugenommen, so dass die für den Phänotyp des reifen Adipozyten charakteristischen monovakulären Strukturen zu erkennen sind.

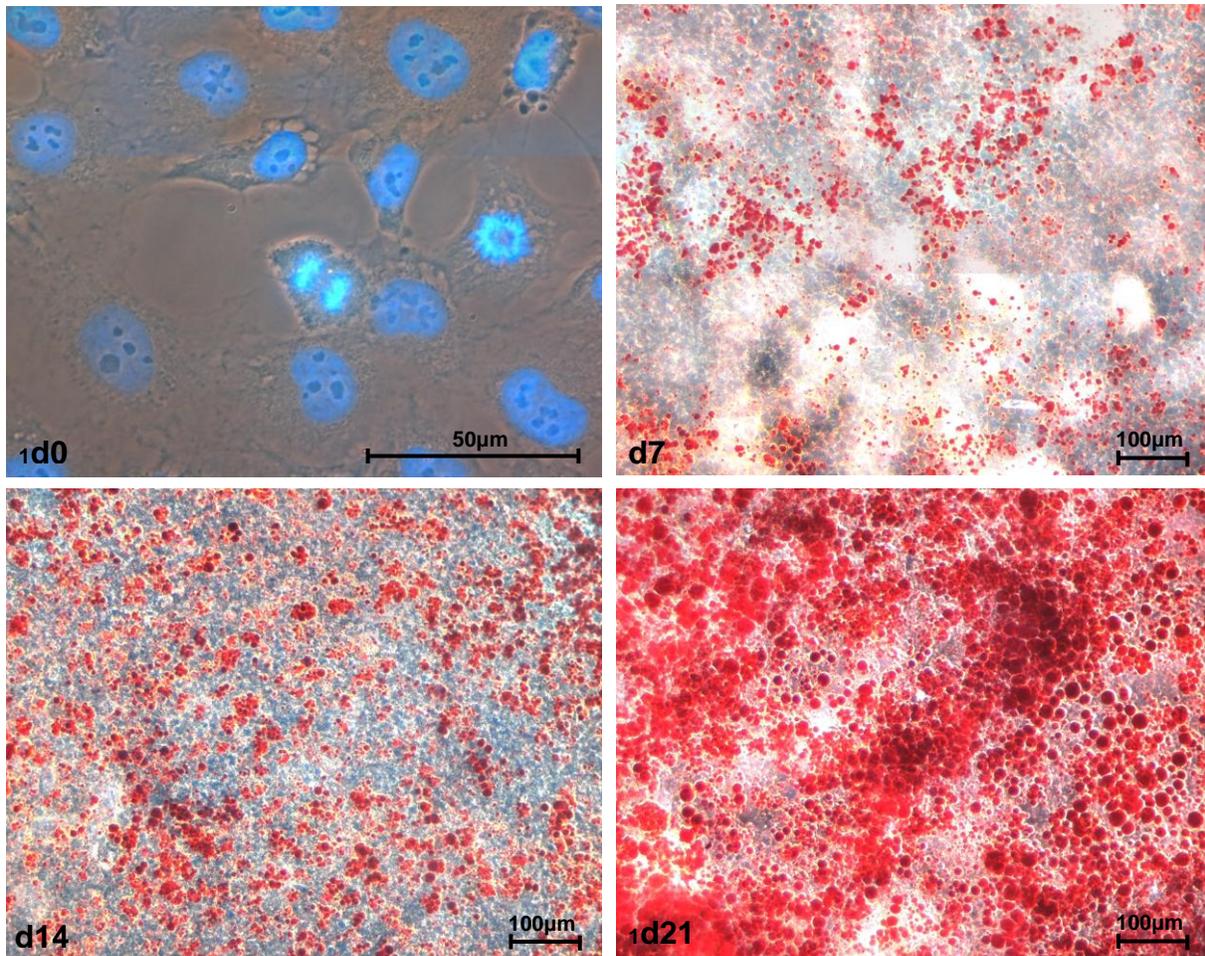


Abbildung 6: Fettrot-Dapi-Färbung der adipozytären Differenzierung

Die Aufnahmen der Fettrot- und DAPI-gefärbten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung am Tag 0,7,14 und 21 wurden bei Durchlicht- (Fettrot) und UV-Licht (Zellkerne) erstellt. Am Tag 0 sind in 630facher Vergrößerung neben den mit DAPI angefärbten Zellkernen keine in Fettrot angefärbten Vesikel in den Zellen zu erkennen. Gut zu erkennen sind bei dieser Vergrößerung die für die Stammzellen typischen Zellfortsätze (Nexus) sowie die zentrale im Bild gelegene Zellteilung. Am Tag 7 hingegen treten die fettrot gefärbten Lipidvesikel bei 100facher Vergrößerung ungleichmäßig gruppiert auf, um sich dann an Tag 14 in ihrer Anzahl zu vermehren und schließlich am Tag 21 auch deutlich erkennbar zu vergrößern.

3.2 Regulation der Adipozytokine

In den folgenden Experimenten sollte mit Hilfe der ELISA-Technik das Sekretionsverhalten der Zellen unter den unterschiedlichsten Bedingungen charakterisiert werden. Ziel dieser Versuche war es, auf der einen Seite ein verändertes Sekretionsverhalten mit fortschreitender Differenzierung, auf der anderen Seite die Einflussnahme oxidierter Lipoproteine und deren Bestandteile auf die Adipozytokinsekretion nachzuweisen. Darauf folgend sollte eine Beziehung zwischen Sekretionsverhalten und Triglyceridgehalt ermittelt werden können und eine Aussage darüber getroffen werden, in wieweit eine 48-stündige Inkubation der Zellen mit Lipoproteinen den Triglyceridgehalt steigert.

3.2.1 Einflussnahme der Zusätze auf die Adipozytokinsekretion

Um zunächst die Einflussnahme der Differenzierungszusätze auf die Adipozytokinsekretion zu untersuchen, wurden die Zellen des A- und B-Protokolls, wie in Abbildung 4 beschrieben, sowohl mit als auch ohne Zusätze für 48 Stunden inkubiert.

Der in dieser Arbeitsgruppe bereits beschriebene Unterschied im Sekretionsverhalten konnte, wie im Standardprotokoll in Abbildung 7 für Adiponektin und in Abbildung 8 für Interleukin 6 zu erkennen, reproduziert werden. Die Zellen an Tag 14 und 21 des Standardprotokolls, die für 48 Stunden mit den Zusätzen im Differenzierungsmedium inkubiert wurden (d14+/d21+), zeigen sowohl im A- als auch im B-Protokoll im Vergleich zum Zustand „ohne Zusätze“ (d14-/d21-) eine signifikante Erhöhung der Adiponektinsekretion um ca. 129%.

Für Interleukin 6 wurde ein gegenläufiges Expressionsverhalten detektiert (Abb. 8). Bei Anwesenheit der Differenzierungszusätze sinkt die IL-6-Sekretion in Protokollen A und B um im Mittel 88%. Um diese deutliche Differenz zwischen den Versuchsbedingungen „mit Zusätzen“ und denen „ohne Zusätze“ zu erklären, wurden zwei der Zusätze, Dexamethason und Rosiglitazon, getrennt von den übrigen Zusätzen untersucht. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, zeigen die Zellen des B-Protokolls, also nach längerem Entzug von Rosiglitazon, bei alleiniger Inkubation mit Rosiglitazon für 48 Stunden einen signifikanten Anstieg der Adiponektinsekretion sowohl am Tag 14 ($p=1 \cdot 10^{-6}$) als auch am Tag 21 ($p=0,002$). Die Sekretion der Zellen des A-Protokolls, welche bis 68 Stunden vor Probenentnahme konstant mit Rosiglitazon behandelt wurden, stieg im Vergleich zum Zustand „ohne Zusätze“ nicht signifikant an. Bei alleiniger Inkubation mit Dexamethason kommt es weder an Tag 14 noch 21 des A- oder B- Protokolls zu einem signifikantem Anstieg der Adiponektinsekretion.

Bei alleiniger Inkubation der Zellen mit dem Differenzierungszusatz Dexamethason für 48 Stunden wurde ein drastischer Abfall der IL-6 Sekretion am Tag 14 (A-Protokoll: $p=2*10^{-6}$, B-Protokoll: $p=8*10^{-9}$) und am 21. Tag (A-Protokoll: $p=1*10^{-5}$, B-Protokoll: $p=4,7*10^{-4}$) detektiert. Nach alleiniger Inkubation mit Rosiglitazon kam es jedoch weder an Tag 14 noch 21 in beiden Protokollen zu einer signifikanten Veränderung der IL-6-Sekretion.

Dieser hier gezeigte, sich entgegengesetzt verhaltende Unterschied der Adiponektin- und IL-6-Sekretion im Zustand „mit-“, bzw. „ohne Zusätze“ konnte im Standardprotokoll aller folgenden Experimente reproduziert werden.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass der Differenzierungszusatz Dexamethason die Sekretion des Adipozytokins IL-6 deutlich vermindert und das Zellen des B-Protokolls, welche mit dem PPAR γ -Antagonisten Rosiglitazon stimuliert wurden, eine signifikant erhöhte Adiponektinsekretion aufwiesen.

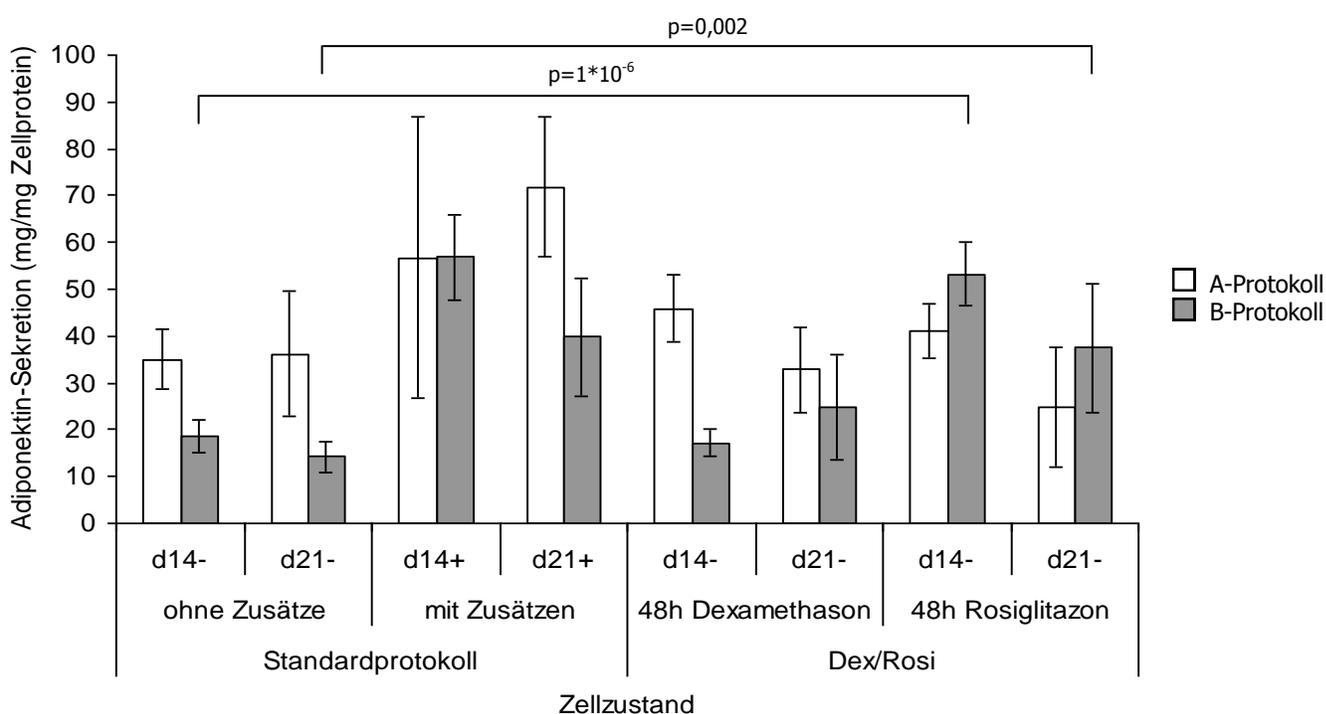


Abbildung 7: Adiponektinsekretion in Adipozyten in Abhängigkeit der Differenzierungszusätze

Die Adiponektinsekretion wurde jeweils an Tag 14 und 21 gemessen. Unter den Bedingungen des Standardprotokolls wurden die Zellen des A- bzw. B-Protokolls für 48 Stunden jeweils mit (+) und ohne Zusätze (-) inkubiert. Der hieraus resultierende Sekretionsunterschied im A- und B-Protokoll wurde auf die verwendeten Zusätze Dexamethason und Rosiglitazon hin untersucht. Hierbei konnte bei alleiniger Inkubation mit Rosiglitazon im B-Protokoll eine signifikante Steigerung der Sekretion hervorgerufen werden. Dexamethason allein konnte die Adiponektinsekretion nicht signifikant beeinflussen. n=6

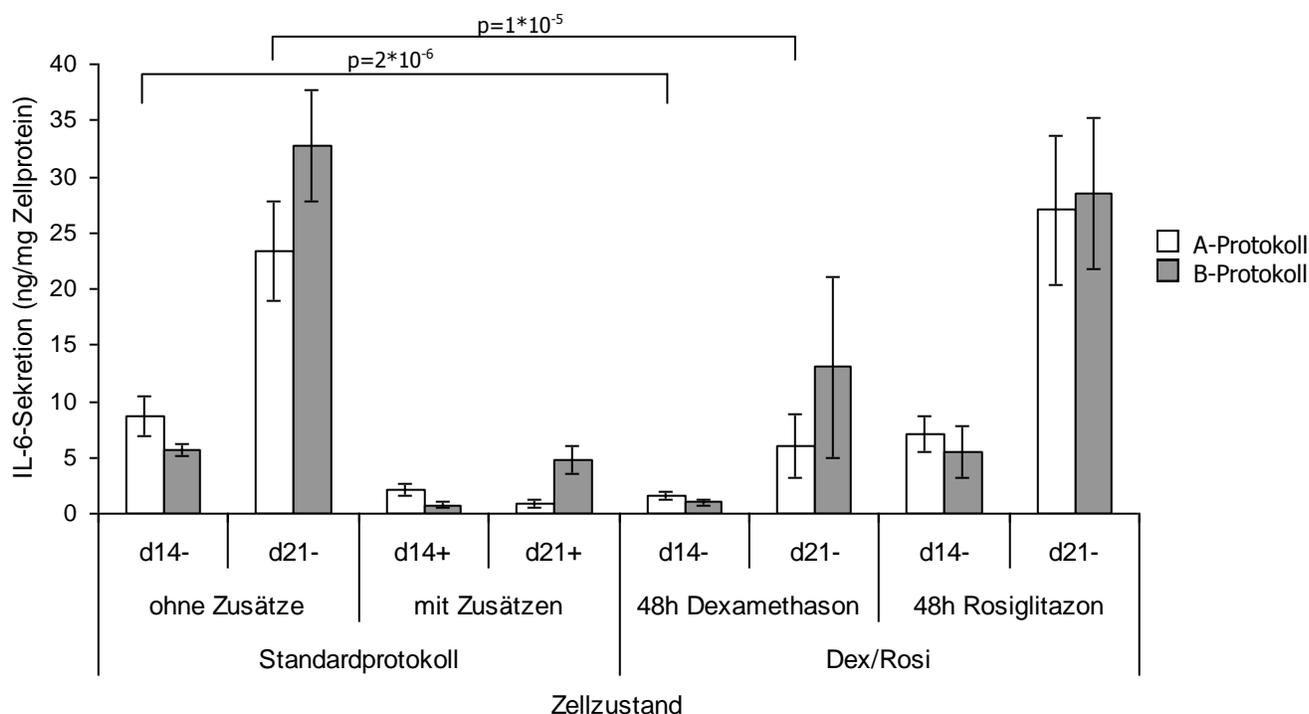


Abbildung 8: IL-6 Sekretion in Adipozyten in Abhängigkeit der Differenzierungszusätze

Die IL-6 Sekretion wurde jeweils an Tag 14 und 21 der Differenzierung bestimmt. Im Standardprotokoll wurden die Zellen des A- bzw. B-Protokolls für 48 Stunden jeweils mit (+) und ohne Zusätze (-) inkubiert. Der hieraus resultierende Sekretionsunterschied im A- und B-Protokoll wurde auf die verwendeten Zusätze Dexamethason und Rosiglitazon hin untersucht. Während eine alleinige Inkubation mit Rosiglitazon die Sekretion nicht zu beeinflussen scheint, konnte Dexamethason die Sekretion an Tag 14 und 21 das A- und B-Protokolls signifikant reduzieren. n=6

3.2.2 Einflussnahme oxidierter LDL-Partikeln auf die Adipozytokinsekretion

Um die Einflussnahme der bei Entzündungsreaktionen entstehenden oxidierten Lipoproteine, wie zum Beispiel oxidierter LDL-Partikel, auf das Sekretionsverhalten der Adipozyten zu bestimmen, wurden den Überständen oxidierte LDL-Partikel in subphysiologischer Konzentration zugesetzt.

Das hierdurch veränderte Sekretionsverhalten für Adiponektin (Abb. 9) und Interleukin 6 (Abb. 10) wurde mit dem bereits beschriebenen Standardprotokoll verglichen.

Zunächst fällt auf, dass die Adiponektinkonzentration, wie in Abbildung 9 zu erkennen, quantitativ, im Vergleich zu vorherigen und folgenden Versuchen, geringer ist. Dies könnte auf einen systembedingten Messfehler, wie auch auf eine weniger erfolgreiche Differenzierung zurückzuführen sein. Wie in Abbildung 9 zu erkennen, ließ sich durch zusätzliche Inkubation mit 0,1mg/ml oxidierter LDL-Partikel für 48 Stunden die Adiponektinkonzentration im A-Protokoll im Zustand „mit Zusätzen“ (A+) sowohl am Tag 14 ($p=0,001$) als auch am Tag 21 ($p=0,0006$)

signifikant senken. Wie bereits gezeigt sind im B-Protokoll die Konzentrationen in den Überständen wesentlich niedriger. Hier konnte kein signifikanter Einfluss der oxidierten LDL-Partikel nachgewiesen werden. Die Sekretion der Zellen des A- als auch B-Protokolls, denen die Zusätze für 48 Stunden entzogen wurden (A-/B-), zeigten ebenfalls keine Beeinflussung durch die zusätzliche Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln.

In Bezug auf die IL-6 Sekretion wurde kein eindeutiger Einfluss von oxLDL auf die Sekretion detektiert (Abb. 10).

Während insbesondere im B-Protokoll im Zustand „mit Zusätzen“ an Tag 14 die IL-6 Sekretion in Folge der Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln anzusteigen scheint, fällt sie unter diesen Bedingungen in beiden Protokollen am Tag 21 ab.

Um ein eindeutiges Ergebnis zu erzielen, wurde dieser Versuch dreimal durchgeführt. Hierbei kam es ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der Adiponektinsekretion und einer ähnlich uneindeutigen Veränderung im IL-6-Sekretionsverhalten. Um die Daten zusammenfassen zu können, waren die Konzentrationsbereiche der durchgeführten Versuche jedoch zu verschieden. Dies könnte sowohl auf einen systembedingten Messfehler, als auch auf eine unterschiedlich schnell voranschreitende Differenzierung zurückzuführen sein.

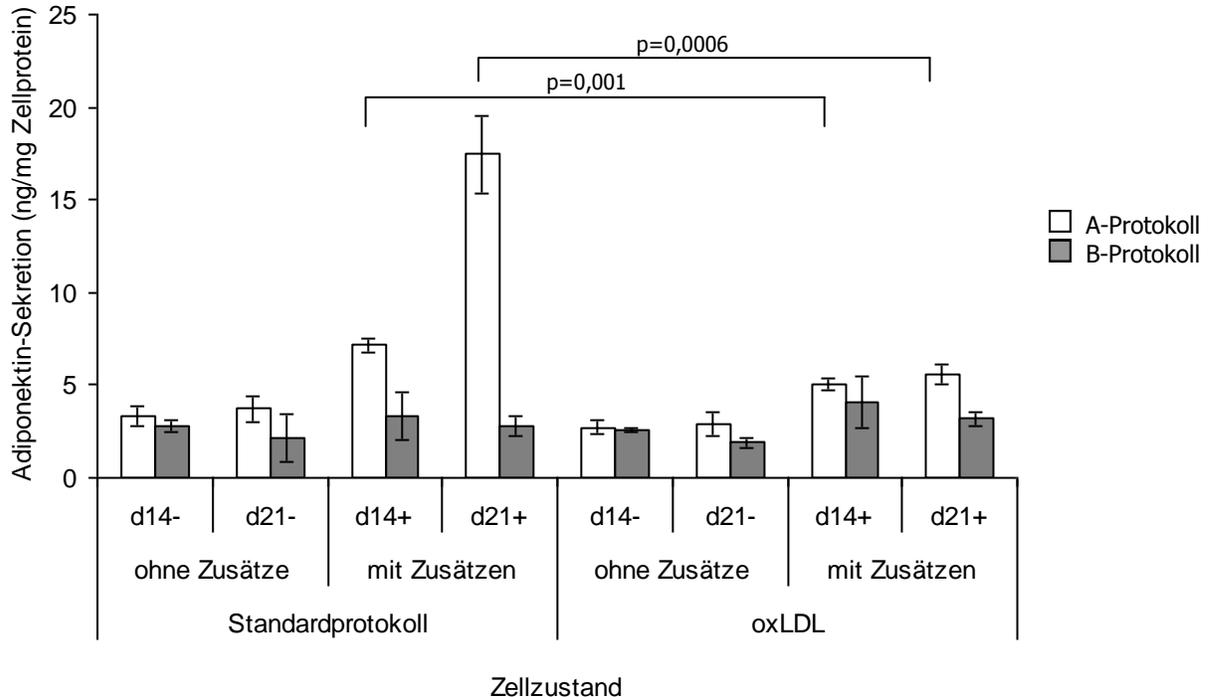


Abbildung 9: Adiponektinsekretion nach mit Inkubation oxidierten LDL-Partikeln

Die Sekretion von Adiponektin wurde an den Tagen 14 und 21 gemessen. Die zuvor gezeigte Differenz im Standardprotokoll konnte reproduziert werden. Die durch die Zusätze gesteigerte Adiponektinsekretion wurde im A-Protokoll durch oxidierte LDL-Partikel signifikant gesenkt werden. n=3

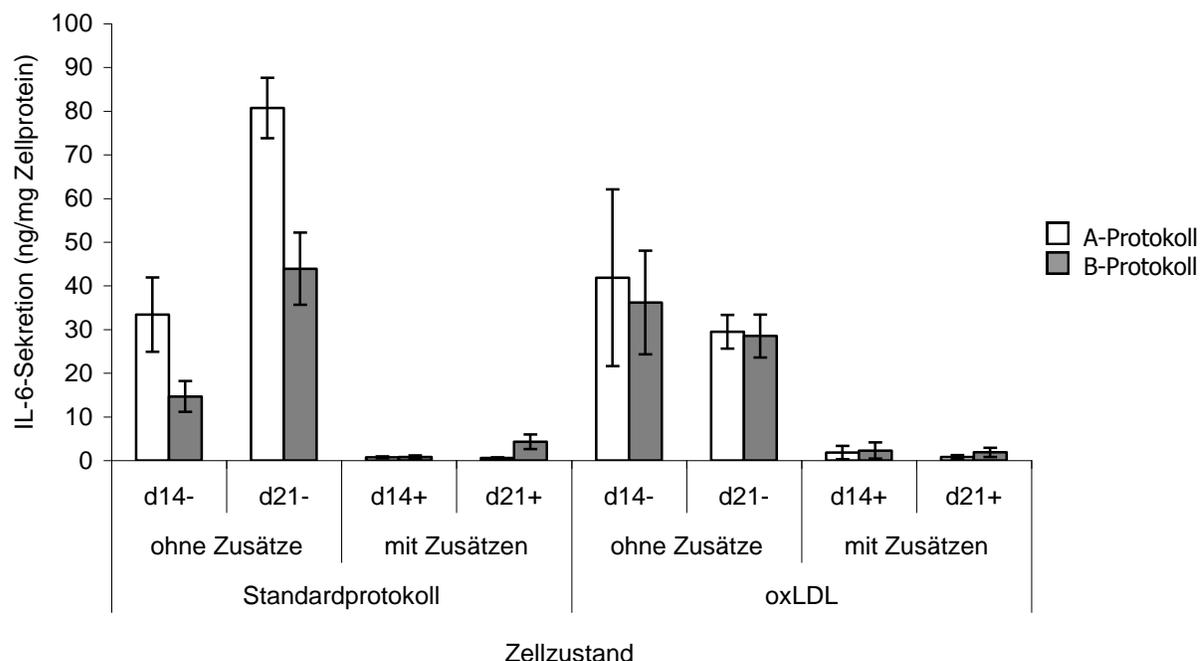


Abbildung 10: IL-6 Sekretion nach Inkubation oxidierter LDL-Partikel

Die Sekretion von IL-6 wurde an den Tagen 14 und 21 im Überstand bestimmt. Der bereits beschriebene Sekretionsunterschied „mit- /ohne Zusätze“ im Standardprotokoll konnte reproduziert werden. Nach Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln stieg die IL-6-Sekretion im A-Protokoll wie auch im B-Protokoll am Tag 14, fiel jedoch an Tag 21 ab. n=3

Zusammenfassend konnte somit ein eindeutiger inhibitorischer Einfluss der oxidierten LDL-Partikel auf die Adiponektinsekretion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der IL-6-Sekretion lassen keine weiteren Schlüsse zu.

3.2.3 Einflussnahme oxidierter VLDL-Partikel auf die Adipozytokinsekretion

Im Vergleich zu den cholesterinreichen LDL-Partikeln wurden triglyceridreiche VLDL-Partikel in oxidierter Form unter gleichen Bedingungen den Zellen zugesetzt und deren Einfluss auf die Sekretion von IL-6 und Adiponektin an den Tagen 14 und 21 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 11 und 12 dokumentiert.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen, ließ sich der bereits beschriebene Sekretionsunterschied zwischen den Zuständen „ohne-„ und „mit Zusätzen“ im Standardprotokoll reproduzieren. Auffällig ist hier jedoch, dass im Vergleich zu vorherigen, wie auch folgenden, Experimenten die Adiponektin-Sekretion am Tag 14 in allen Fraktionen deutlich höher liegt als jene am Tag 21. Es ist also eine abnehmende Tendenz mit fortschreitender Differenzierung zu beobachten. Bei

zusätzlicher Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln ließ sich in allen Fraktionen eine signifikante Senkung der Adiponektinsekretion nachweisen.

Im Zustand „ohne Zusätze“ sank diese am Tag 14 um 53,8% ($p=0,031$) und am Tag 21 um 57,3% ($p=0,03$). Bei Zugabe der Differenzierungszusätze bis zum Messzeitpunkt im Zustand „mit Zusätzen“ sank die Sekretion am Tag 14 um 24,5% ($p=0,04$) und am Tag 21 um 35,4% ($p=0,009$). Die Senkung der Sekretion im B-Protokoll durch Zugabe von oxidierten VLDL-Partikeln war nur teilweise signifikant.

Zusammenfassend senken oxidierte VLDL-Partikel die Adiponektinsekretion unabhängig von der Gabe der Differenzierungszusätze.

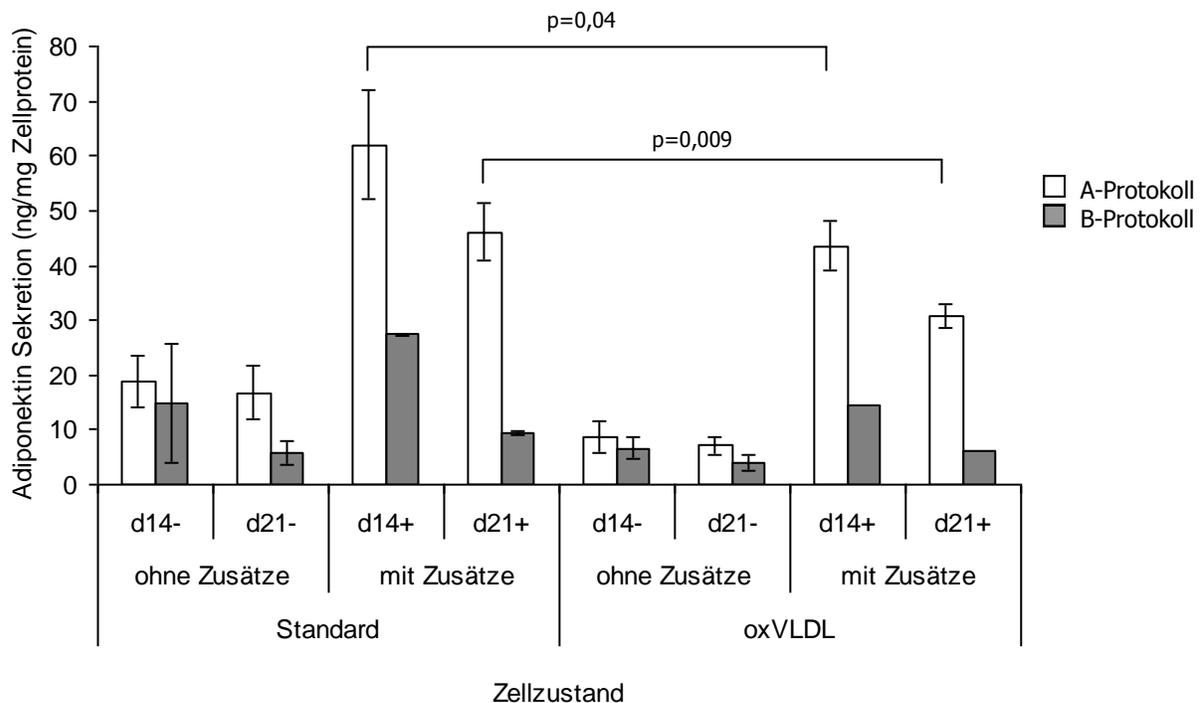


Abbildung 11: Adiponektinsekretion nach Inkubation oxidierter VLDL-Partikel

Die Bestimmung der Sekretion erfolgte wie in vorherigen Experimenten ebenfalls an Tag 14 und 21. Das Standardprotokoll ließ sich erfolgreich reproduzieren, wobei die Sekretion ausgehend von einer hohen Sekretion am Tag 14 bis zum Tag 21 abnimmt. Im Vergleich kommt es nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln für 48 Stunden insbesondere im A-Protokoll zu einer signifikanten Senkung der Sekretion an Tag 14 und 21 sowohl im Zustand „mit –“, als auch „ohne Zusätze“. $n=3$

In Abbildung 12 ist die IL-6-Sekretion dieses Versuches dargestellt. Nach einer 48stündigen Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln ist im Zustand „mit Zusätzen“ sowohl im A- als auch im B-Protokoll eine deutliche Steigerung der Sekretion an den Tagen 14 und 21 zu beobachten. An Tag 14 steigt hier die IL-6 Sekretion im A-Protokoll um +387,4% ($p=0,003$) und im B-protokoll um +243,7% ($p=0,001$). An Tag 21 steigt die Sekretion im A-Protokoll um +129,5% ($p=0,003$) und im B-Protokoll um +91,4% ($p=0,018$). Im Vergleich zum Standardprotokoll nimmt hier auch die Sekretion mit vorschreitender Differenzierung zu.

Im Zustand „mit Zusätzen“, also bei Inhibition der Sekretion durch den Differenzierungszusatz Dexamethason (3.2.1), konnte eine durchschnittliche Steigerung der Sekretion um +208% beobachtet werden. Die einzelnen Fraktionen waren hier jedoch nicht signifikant.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln insbesondere in jenen Zellen des A-Protokoll, denen bis zum Zeitpunkt der Messung ein Differenzierungsmedium zugesetzt wurde, eine Reduktion der Adiponektinsekretion hervorruft, während die IL-6-Sekretion in allen Fraktionen nach Inkubation mit oxidierten VLDL ansteigt.

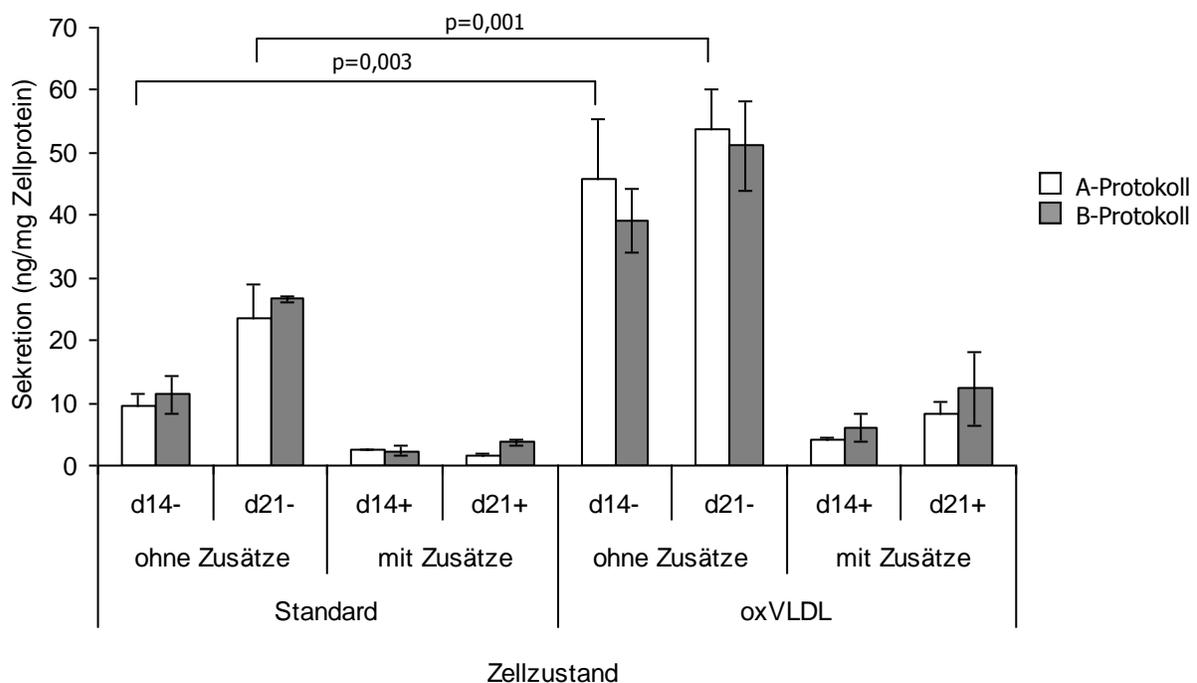


Abbildung 12: IL-6 Sekretion nach Inkubation oxidierten VLDL-Partikel

Die Sekretion von IL-6 wurde im Überstand an den Tagen 14 und 21 der Differenzierung gemessen. Das bereits in 3.2.1 beschriebene Standardprotokoll konnte reproduziert werden. Nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln (oxVLDL) ließ sich sowohl im A- als auch im B-Protokoll eine signifikante Steigerung der Sekretion im Zustand „ohne Zusätze“ am Tag 14 und 21 beobachten. $n=3$

3.2.4 Vergleichende Einflussnahme oxidiertes und nicht oxidiertes VLDL-Partikel auf die Adipocytokinsekretion

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Oxidierung der Lipoproteine tatsächlich die Ursache der mit der Lipoproteininkubation ansteigenden IL-6 Sekretion und der abfallenden Adiponektinsekretion war, wurde eine vergleichbare Analyse der Sekretionsmuster unter Zugabe oxidiertes und nicht oxidiertes VLDL-Partikel der gleichen Spenderprobe durchgeführt.

Da in den bisherigen Experimenten die jeweiligen Unterschiede der Fraktionen untereinander im A-Protokoll am kontrastreichsten waren, wurden in diesem Experiment nur Zellen verwendet, die nach dem A-Protokoll differenziert wurden. Die Messergebnisse der Adiponektinsekretion sind in Abbildung 13 und jene der IL-6-Sekretion in Abbildung 14 zusammengefasst.

Vergleicht man in Abbildung 13 das Sekretionsverhalten der Zellen des Standardprotokolls mit jenem der Zellen, denen unter gleichen Bedingungen oxidiertes VLDL und nicht oxidiertes VLDL-Partikel zugesetzt wurden, so werden zwei Dinge deutlich: Zum einem kommt es, wie in Abschnitt 3.2.3 schon gezeigt, zur Senkung der Adiponektinsekretion an beiden Tagen sowohl im Zustand „mit Zusätzen“ als auch „ohne Zusätze“ nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln. Zweitens wird deutlich, dass es offensichtlich keinen Unterschied im Sekretionsverhalten gibt, je nachdem ob die Zellen mit oxidierten oder nicht-oxidierten VLDL Partikeln inkubiert wurden.

Die Senkung der Adiponektinsekretion bei Zugabe nicht-oxidiertes VLDL-Partikel betrug hierbei im Zustand „ohne Zusätze“ (-) an Tag 14 -67,7% ($p=2 \cdot 10^{-5}$) und -69,9% an Tag 21 ($p=1 \cdot 10^{-5}$). Wurden die Differenzierungszusätze bis zum Messzeitpunkt eingesetzt (14+/21+), so betrug die Senkung nach VLDL-Inkubation an Tag 14 -68,9% ($p=7 \cdot 10^{-5}$) und an Tag 21 -62,6% ($p=8 \cdot 10^{-7}$). Nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln sank die Sekretion im Zustand „ohne Zusätze“ (-) am Tag 14 um -73,4% ($p=2,3 \cdot 10^{-5}$) und am Tag 21 um -74,4% ($p=2,4 \cdot 10^{-6}$). Im Zustand „mit Zusätzen“ (+) sank die Sekretion an Tag 14 um -66,1% ($p=1,4 \cdot 10^{-4}$) und am Tag 21 um -60,5% ($p=1,3 \cdot 10^{-6}$).

Im Mittel aller Fraktionen betrug der senkende Effekt bei Inkubation mit VLDL -67,3% und bei oxidiertem VLDL -68,6%. Dieser Unterschied ist somit minimal und nicht signifikant ($p=0,91$).

In Bezug auf die in Abbildung 14 (siehe Seite 49) gezeigte IL-6-Sekretion der Zellen kann auch hier zunächst festgestellt werden, dass das bereits wiederholt beschriebene Sekretionsmotiv des Standardprotokolls reproduziert wurde.

Vergleicht man das IL-6-Sekretionsverhalten der Zellen nach Inkubation mit oxidierten und nicht oxidierten VLDL-Partikeln zum Standardprotokoll (Abb. 14), so werden auch hier zwei Dinge deutlich:

Zum einen steigt, wie auch schon in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, die IL-6 Sekretion durch Zugabe oxidierter VLDL-Partikel im Zustand „ohne Zusätze“ (-) stark an. Zum andern vermögen jedoch auch nicht oxidierte VLDL-Partikel die Sekretion sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 in gleichen Maßen signifikant zu steigern. Der in Abschnitt 3.2.1 beschriebene, die IL-6-Sekretion inhibierende Effekt des Differenzierungszusatzes Dexamethason wird hierbei in keiner Fraktion behoben. Nach Inkubation mit nicht oxidierten VLDL-Partikeln kam es zu einer Steigerung der IL-6 Sekretion am Tag 14 um +300,2% ($p=4*10^{-4}$) und am Tag 21 um +148,9% ($p=7*10^{-4}$). Die Zugabe von oxidierten VLDL-Partikeln steigerte die IL-6 Sekretion am Tag 14 um +196,5% ($p=7*10^{-4}$) und an Tag 21 um +98,3% ($p=0,001$).

Somit kann zusammengefasst werden, dass es zwischen der Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln bezüglich der Adiponektin- als auch IL-6 Sekretion keinen signifikanten Unterschied gibt. Beide Lipoproteinformen senken in gleichem Maße die Adiponektin- und steigern die IL-6-Sekretion der Adipozyten.

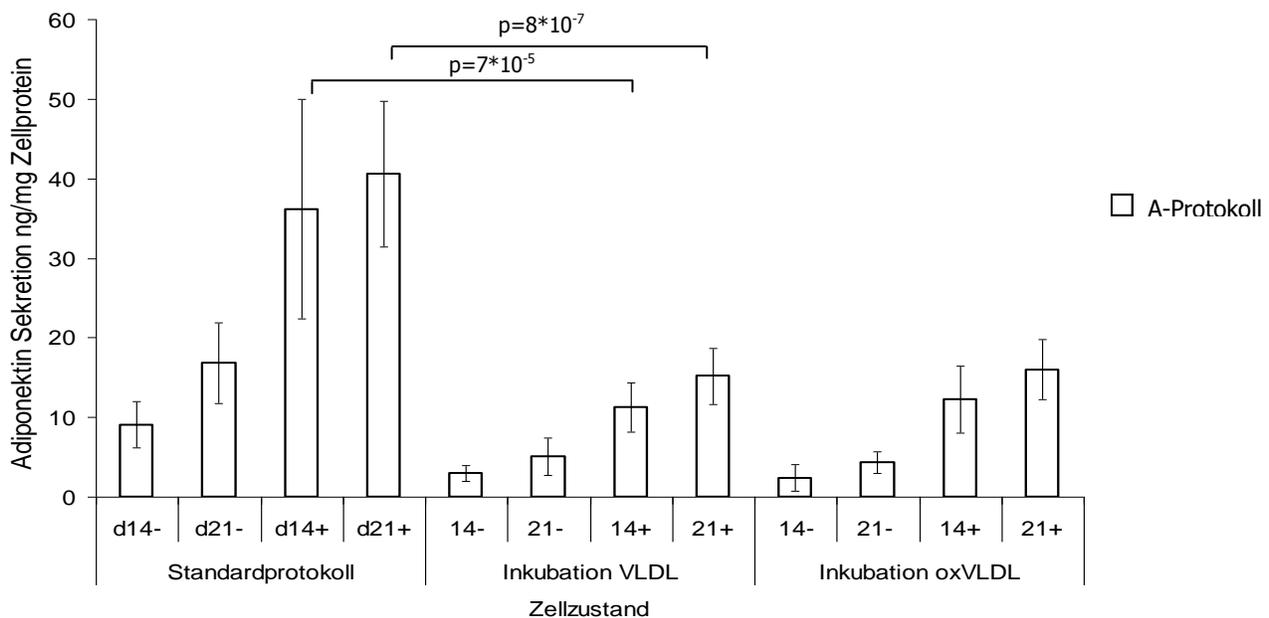


Abbildung 13: Adiponektinsekretion nach Zugabe oxidierter und nicht oxidierter VLDL-Partikel

Die Adiponektinkonzentration wurden an den Tagen 14 und 21 in den Überständen der Zellen des A-Protokolls bestimmt. Wie auch in vorherigen Experimenten konnte das Sekretionsmotiv des Standardprotokolls reproduziert werden. Bei einer zusätzlichen Inkubation mit oxidierten und nicht oxidierten VLDL-Partikeln kommt es in allen Fraktionen zu einem signifikanten Absinken der Sekretion. Der Sekretionsunterschied zwischen Zellen, die für 48 Stunden VLDL-, und jenen, die für diesen Zeitraum oxidierte VLDL-Partikel zugesetzt bekamen ist marginal und nicht signifikant. $n=9$

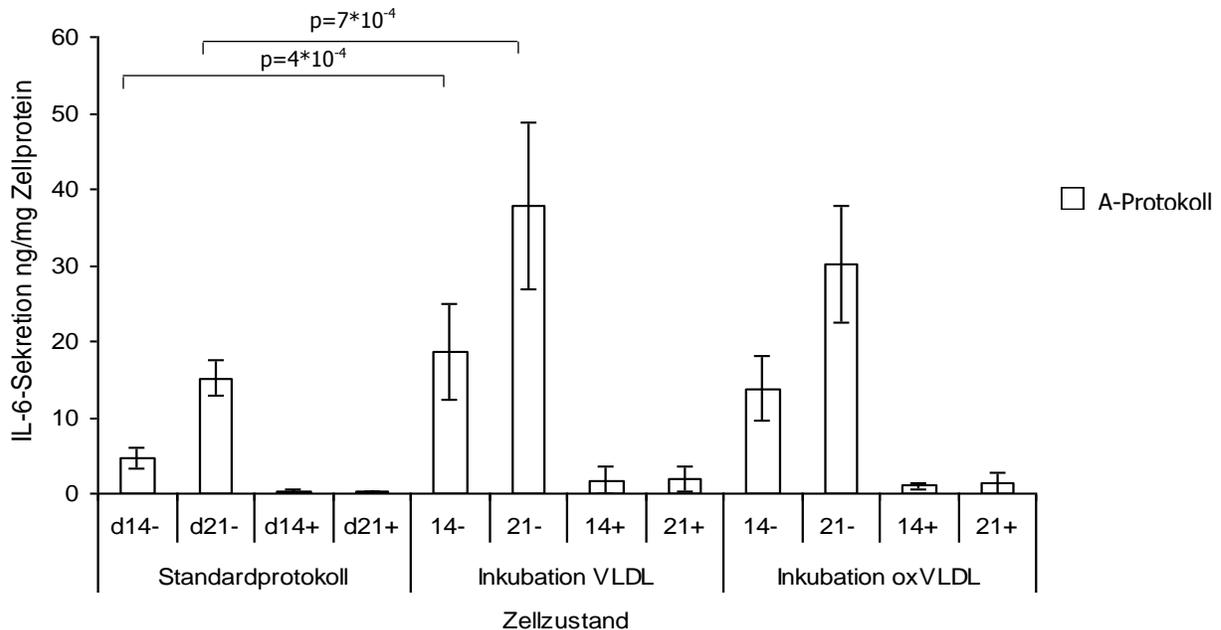


Abbildung 14: IL-6 Sekretion nach Inkubation oxidierter und nicht oxidierter VLDL-Partikel

Die Sekretion wurde an den Tagen 14 und 21 jeweils im Zustand „mit Zusätzen“ (+) als auch „ohne Zusätze“ (-) in den Überständen bestimmt. Auch in diesem Experiment ließ sich das in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Standardprotokoll reproduzieren. Bei zusätzlicher Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln stieg die IL-6 Sekretion in den Fraktionen „ohne Zusätze“ signifikant an. n=6

3.2.5 Einflussnahme von Cholesterin und Ölsäure auf die Adopzytokine

Lipoproteine bestehen im Wesentlichen aus 4 Teilen: Cholesterin, Triglyceriden, Phospholipiden und den unterschiedlichen Apolipoproteinen. In Anbetracht der bisher gezeigten Experimente sollte der regulierend wirkende Anteil genauer eingegrenzt werden. Hierzu wurden die Zellen, die ebenso wie in vorherigen Experimenten nach dem Schema des Standardprotokolls differenziert wurden, zusätzlich zum Standardprotokoll mit 10µ/ml Cholesterin und zum Vergleich mit 28µg/ml Ölsäure für 48 Stunden inkubiert.

Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 15 für Adiponektin und Abbildung 16 für Interleukin 6 zusammengefasst.

Betrachtet man das in Abbildung 15 dargestellte Sekretionsverhalten des Adiponektins der Adipocyten, so kann auch hier wieder die Reproduzierbarkeit des Standardprotokolls dokumentiert werden. Eine zusätzliche Inkubation mit Cholesterin oder Ölsäure führt unter keiner Bedingung zu einer signifikanten Änderung der Adiponektinsekretion.

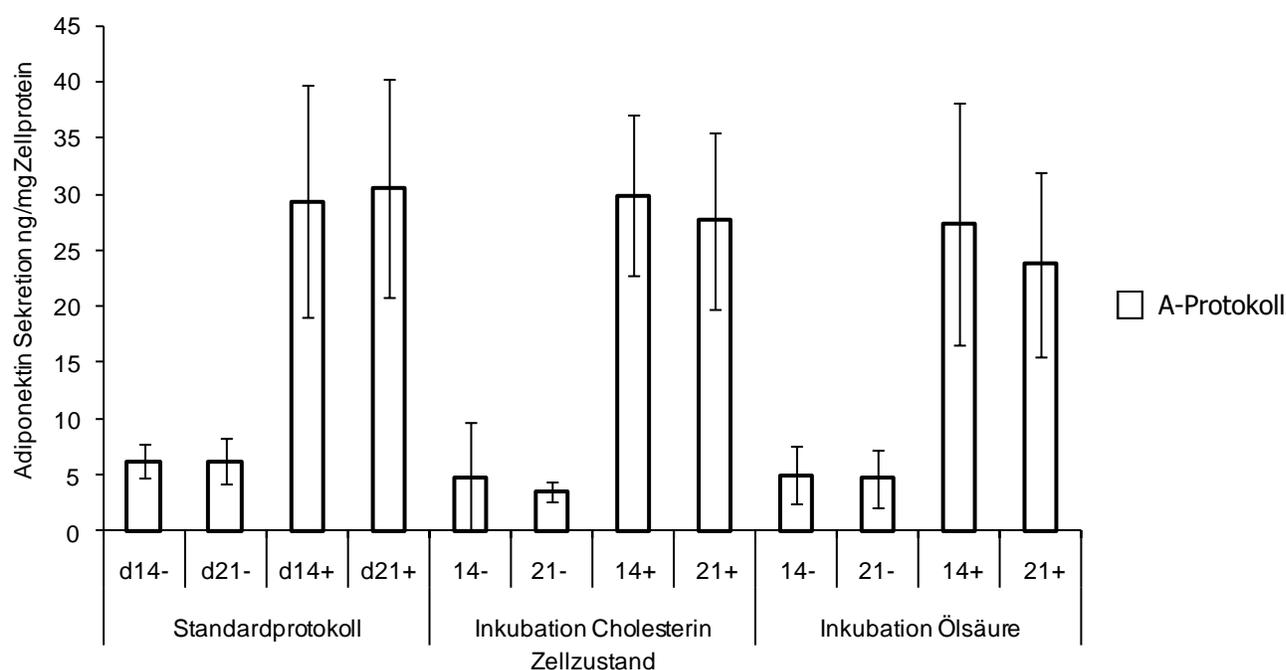


Abbildung 15: Adiponektinsekretion nach Zugabe von Cholesterin bzw. Ölsäure

Die Messung der Adiponektinsekretion erfolgte an Tag 14 und 21 der Differenzierung. Das reproduzierbare Standardprotokoll zeigte bei zusätzlicher Inkubation mit Cholesterin oder Ölsäure keine Änderung im Sekretionsverhalten der Zellen. n=9

In Abbildung 16 ist die IL-6 Sekretionsmessung dieses Versuches dargestellt. Auch hier kann zuerst eine Reproduzierbarkeit des Standardprotokolls festgestellt werden. Bei einer zusätzlichen Inkubation mit 28µg/ml Ölsäure kommt es unter keiner Bedingung zu einem signifikant veränderten Sekretionsverhalten der Adipozyten.

Eine Inkubation der Zellen mit 10µg/ml Cholesterin hingegen führt zu einer drastischen Steigerung der Sekretion in allen Fraktionen. Im Zustand „ohne Zusätze“ (-) stieg die Sekretion an Tag 14 um den Faktor 12 ($p=2,5 \cdot 10^{-9}$) und am Tag 21 um +133% ($p=1,4 \cdot 10^{-6}$).

Besonders interessant in diesem Experiment ist, dass der in Abschnitt 3.2.1 beschriebene inhibierende Effekt des Differenzierungszusatzes Dexamethason bei einer Zugabe von Cholesterin in das Differenzierungsmedium sich aufzuheben scheint.

Unter einer Inkubation mit allen Differenzierungszusätzen bis zum Zeitpunkt der Messung (+) konnte daher noch ein weitaus höherer Anstieg der IL-6-Sekretion gemessen werden. Es kam an Tag 14 zu einem Anstieg um den Faktor 130 von 0,16ng auf 20,9ng IL-6 pro mg Zellprotein ($p=3,5 \cdot 10^{-4}$). An Tag 21 stieg die Sekretion um den Faktor 34 von 0,29 auf 10ng IL-6 pro mg Zellprotein ($p=0,021$).

Aus diesem Experiment lässt sich folgern, dass Cholesterin zwar keinen Einfluss auf die Sekretion von Adiponektin auszuüben scheint, jedoch verstärkt in der Lage ist, die IL-6 Sekretion insbesondere am Tag 14 der Differenzierung um ein Vielfaches zu steigern. Ölsäure hingegen zeigt keinen Einfluss auf die Adiponektin- oder IL-6-Sekretion.

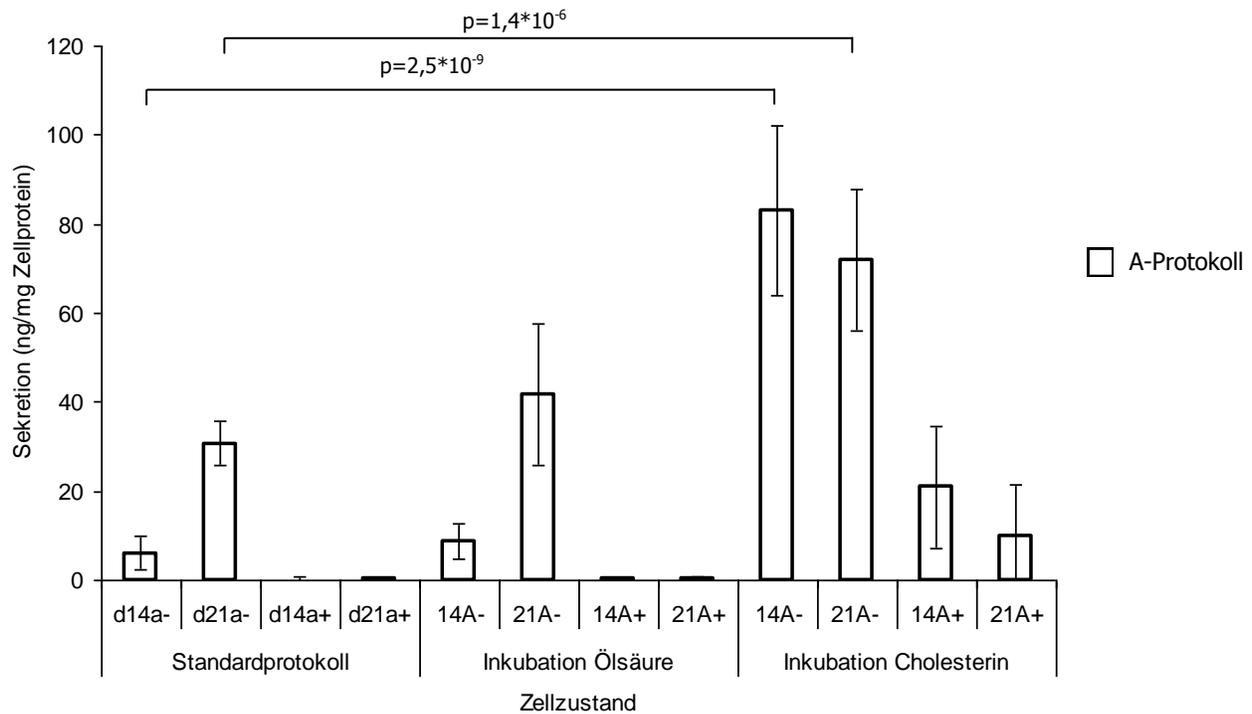


Abbildung 16: IL-6-Sekretion nach Inkubation mit Ölsäure und Cholesterin

Dargestellt ist die IL-6 Sekretion der Adipozyten an Tag 14 und 21 der Differenzierung. Das in Abschnitt 3.2.1 erläuterte Standardprotokoll konnte wiederholt reproduziert werden. Eine Inkubation mit 28µg/ml Ölsäure führte zu keiner signifikanten Veränderung. Bei Inkubation der Zellen mit 10µg/ml Cholesterin für 48 Stunden kam es jedoch unter allen Bedingungen zu einem drastischen Anstieg der IL-6-Sekretion. n=9

3.3 Triglyceridgehalt der Zelle

Die Messung des Triglyceridgehaltes der Zellen war ein weiterer wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Ziel war es, den zunehmenden Fettgehalt der Zellen bei fortschreitender Differenzierung zu dokumentieren, um mögliche Korrelationen zwischen diesem und der Adipozytokinsekretion zu untersuchen. Außerdem sollte eine mögliche Steigerung des Triglyceridgehaltes nach der Inkubation mit triglyceridreichen Lipoproteinen, wie VLDL, untersucht werden.

3.3.1 Zellulärer Triglyceridgehalt nach Inkubation oxidierter LDL-Partikel

Um die Einflussnahme der eingesetzten LDL-Partikel auf die intrazelluläre Triglyceridkonzentration zu bestimmen (Abb. 17), wurde das Zelllysate jener Zellen verwendet, deren Sekretionsverhalten bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde. Ebenso wie die Adipozytokinkonzentration in den Überständen wurde auch die Triglyceridkonzentration der Zellysate auf die Proteinkonzentration des jeweiligen *wells* bezogen, um den Einfluss einer Ungleichmäßigkeit in der Zellzahl möglichst zu minimieren.

Wie in Abbildung 17 zu erkennen, kann zunächst festgestellt werden, dass der Triglyceridgehalt der Zellen im Laufe der Differenzierung von Tag 14 auf Tag 21 im Standardprotokoll ansteigt. Im Mittel beträgt dieser Anstieg 76,3% und ist jeweils in den einzelnen vergleichbaren Fraktionen signifikant. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zwischen dem Triglyceridgehalt der nach A- oder B- Protokoll differenzierten Zellen keinen signifikanten Unterschied gibt. In Bezug auf die zusätzliche Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln konnte im Vergleich zum Standardprotokoll keine eindeutige Steigerung der intrazellulären Triglyceride nachgewiesen werden. Einzig die Zellen im Zustand „ohne Zusätze“ zeigten einen Anstieg im Vergleich zum Standardprotokoll von im Mittel 44,1%, der jedoch in seinen jeweils vergleichbaren Fraktionen nicht immer signifikant ist.

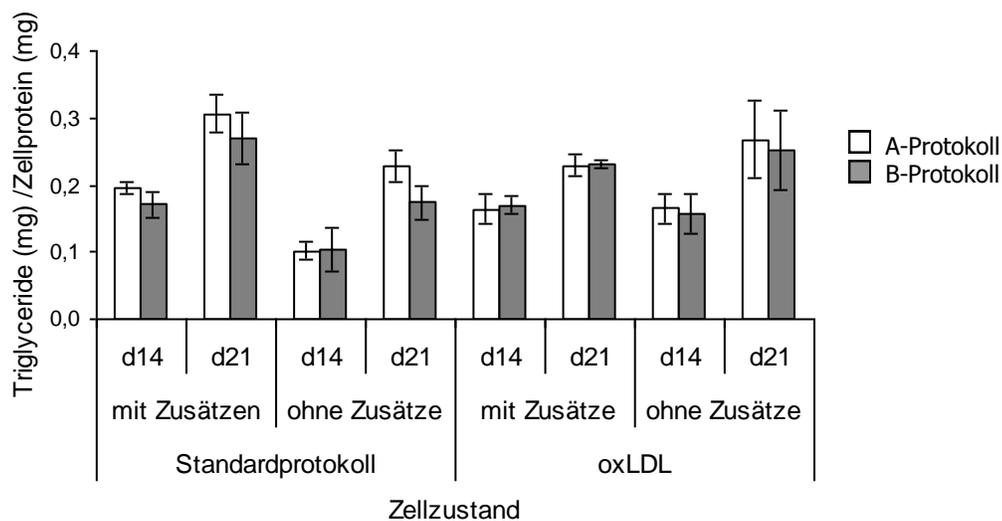


Abbildung 17: Triglyceridbestimmung nach Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln

Der Triglyceridgehalt wurde an den Tagen 14 und 21 bestimmt. Es war eine Zunahme der Konzentration zwischen diesen Zeitpunkten im Standardprotokoll zu beobachten (MW= +76,3%). Die Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln führte im Vergleich zum Standardprotokoll nur im Zustand „ohne Zusätze“ zu einer Steigerung der intrazellulären Triglyceridkonzentration. (MW= +44,1%). n=3

Somit kann keine eindeutige Aussage über einen durch LDL verursachten Anstieg des intrazellulären Triglyceridgehaltes getroffen werden. Eindeutig gezeigt wurde jedoch, dass die Zellen des Standardprotokolls und jene, die zusätzlich mit LDL inkubiert wurden, einen Anstieg des Triglyceridgehaltes mit fortschreitender Differenzierung zeigten.

3.3.2 Zellulärer Triglyceridgehalt nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln

Neben LDL wurde auch die Einflussnahme der VLDL-Partikel auf den intrazellulären Triglyceridgehalt untersucht.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, konnte ebenfalls der, mit der Differenzierung zunehmende, Triglyceridgehalt der Zelle nachgewiesen werden. Allerdings scheint dieser nicht so ausgeprägt, wie der, der in Abschnitt 3.3.1 untersuchten Proben. Ebenfalls auffällig ist, dass der gemessene Unterschied im Standardprotokoll zwischen dem Zustand „mit Zusätzen“ (+) und „ohne Zusätze“ (-), mit Ausnahme von 14A+ zu 21A+ nicht so ausgeprägt zu sein scheint. Die Zellen weisen auch insgesamt einen höheren Gehalt an Triglyceriden auf, was auf eine effizientere Differenzierung im Vergleich zu Abschnitt 3.3.1 schließen lässt.

Betrachtet man die Messergebnisse, welche nach Inkubation mit oxidierten VLDL erzielt wurden, so fällt zunächst auf, dass die Zellen, die bis zum Zeitpunkt der Messung 48 Stunden lang „ohne Zusätze“ (-) inkubiert wurden, unter zusätzlicher Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikel wesentlich höhere Triglyceridpiegel aufwiesen, als jene im Standardprotokoll. Hier beträgt der Anstieg im Mittel +45,8%. Jene Zellen, die bis zum Zeitpunkt der Messung weiter mit dem Differenzierungszusätzen behandelt wurden (+), konnten zwar einen Anstieg von im Schnitt nur +5% des Triglyceridspiegels verzeichnen. Dieser Anstieg war jedoch auf die einzelnen Fraktionen bezogen nicht signifikant.

Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln kein signifikanter Anstieg der intrazellulären Triglyceridspiegel gemessen wurde. Einzig unter den Bedingungen „ohne Zusätze“ wurde ein deutlicher Anstieg gezeigt detektiert. Insgesamt konnte in Bezug auf die Differenzierung kein einheitlicher Unterschied zwischen A- und B-Protokoll festgestellt werden.

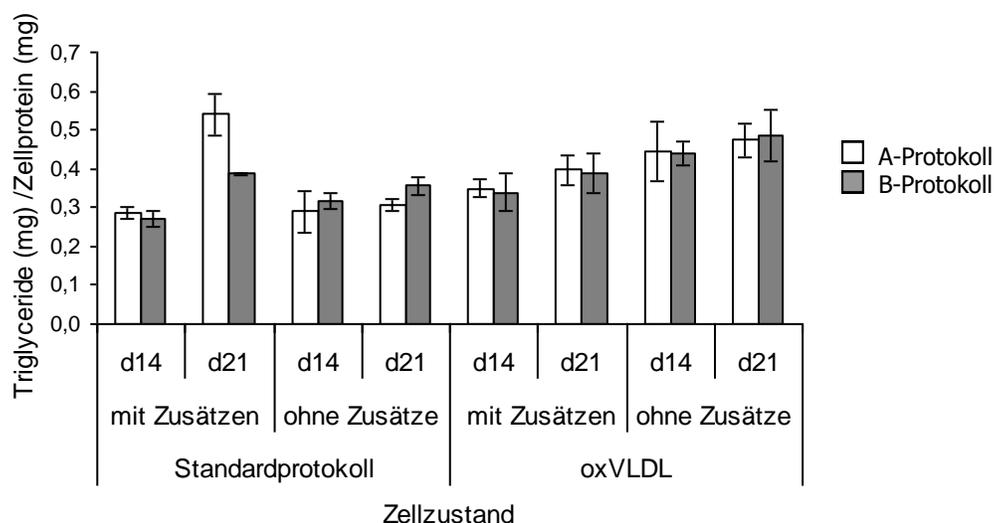


Abbildung 18: Triglyceridbestimmung nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln

Der Triglyceridgehalt wurde an den Tagen 14 und 21 bestimmt. Es ist eine Zunahme der Konzentration zwischen diesen Zeitpunkten zu beobachten (MW=+24,4%). Die Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln führte im Vergleich zum Standardprotokoll nur im Zustand „ohne Zusätze“ zu einer Steigerung der intrazellulären Triglyceridkonzentration (MW= +45,8%). n=3

3.3.3 Zellulärer Triglyceridgehalt nach Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln

Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, inwieweit der Oxidationsstatus der Lipoproteine den Triglyceridgehalt im Adipocyten beeinflusst, wurde der Triglyceridgehalt der Zellen nach Inkubation sowohl mit oxidierten, als auch nicht oxidierten VLDL-Partikeln gemessen und mit den Messwerten des Standardprotokolls verglichen. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 19 dokumentiert. Hierbei wurden jeweils drei Proben aus drei unterschiedlichen Differenzierungen von Zellen des A-Protokolls untersucht.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, kann wiederholt eine deutliche Steigerung der intrazellulären Triglyceridkonzentration im Laufe der Differenzierung der Zellen beobachtet werden.

Vergleicht man den mittleren Triglyceridgehalt aller Fraktionen des Standardprotokolls mit jenem nach zusätzlicher Inkubation mit VLDL bzw. oxidierten VLDL-Partikeln, so konnte in beiden Fällen ein deutlicher Anstieg gemessen werden.

Hierbei kam es zu einem durchschnittlichen Anstieg der intrazellulären Triglyceridkonzentration nach VLDL-Inkubation um +28,3% im Zustand „ohne Zusätze“ und im Zustand „mit Zusätzen“ um +15,9%. Nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln stieg der intrazelluläre Triglyceridgehalt im Zustand „mit Zusätzen“ im Schnitt um +19,7% und im Zustand „ohne Zusätze“ um durchschnittlich +21,4%.

Insgesamt kann also festgestellt werden, dass in diesen drei aufeinander folgenden Differenzierungen der Triglyceridgehalt der Zelle durch eine Inkubation mit Lipoproteinen leicht gesteigert werden konnte. Jedoch kam es nicht zu einem signifikanten Unterschied zwischen der Inkubation mit oxidierten und nicht-oxidierten VLDL-Partikeln.

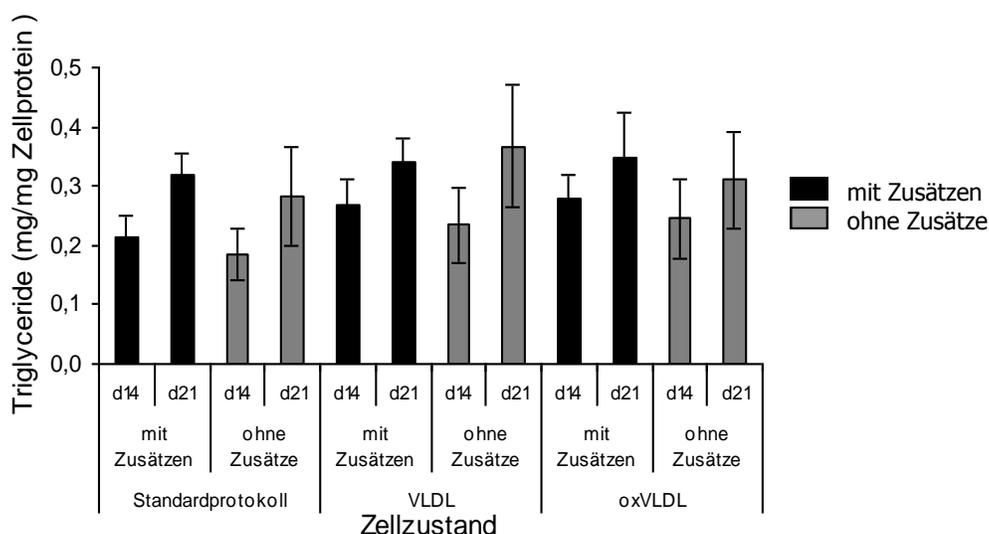


Abbildung 19: Triglyceridgehalt nach Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln

Der Triglyceridgehalt wurde in Zellen des A-Protokolls an den Tagen 14 und 21 der Differenzierung gemessen (Standardprotokoll). Im Vergleich hierzu wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln inkubiert. Hierbei kam es zu einem durchschnittlichen Anstieg der intrazellulären Triglyceridkonzentration nach VLDL-Inkubation um +28,3% im Zustand „ohne Zusätze“ und +15,9% im Zustand „mit Zusätzen“. Nach Inkubation mit oxidierten VLDL (oxVLDL) stieg der intrazelluläre Triglyceridgehalt im Zustand „mit Zusätzen“ im Schnitt um +19,7% und im Zustand „ohne Zusätze“ um durchschnittlich +21,4%. n=9

3.4 Expressionsanalyse auf Proteinebene

Um den Erfolg der Differenzierung anhand der Expression wichtiger Differenzierungsmarker zu belegen, erfolgte eine Expressionsanalyse auf Proteinebene mittels der *Western-blot* Technik. Während der Differenzierung der Zellen kommt es zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Induktion und Expression sog. Differenzierungsmarker. Zu den in diesem Experiment untersuchten Differenzierungsmarkern zählen FAS, LRP, apoE und ap2.

Ziel dieses Versuches war es, das Vorhandensein wichtiger Differenzierungsmarker an den Tagen 14 und 21 zu belegen. Des Weiteren sollten die Adiponektinexpression auf Proteinebene untersucht werden und mögliche Veränderungen im Insulinsignaltransduktionsweg anhand von IRS-1 und -2 exemplarisch erhoben werden.

3.4.1 Analyse der Differenzierungsmarker auf Proteinebene

Der Erfolg der Differenzierung wurde in jenen Zellen nachgewiesen, deren Adipozytokinsekretion in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.4 dokumentiert und beschrieben wurde.

In Abbildung 20 sind zwei mit Panceau gefärbte Membranen beispielhaft dargestellt. Diese Färbung verdeutlicht die gleichmäßige Beladung aller Spuren mit je 10mg Protein.

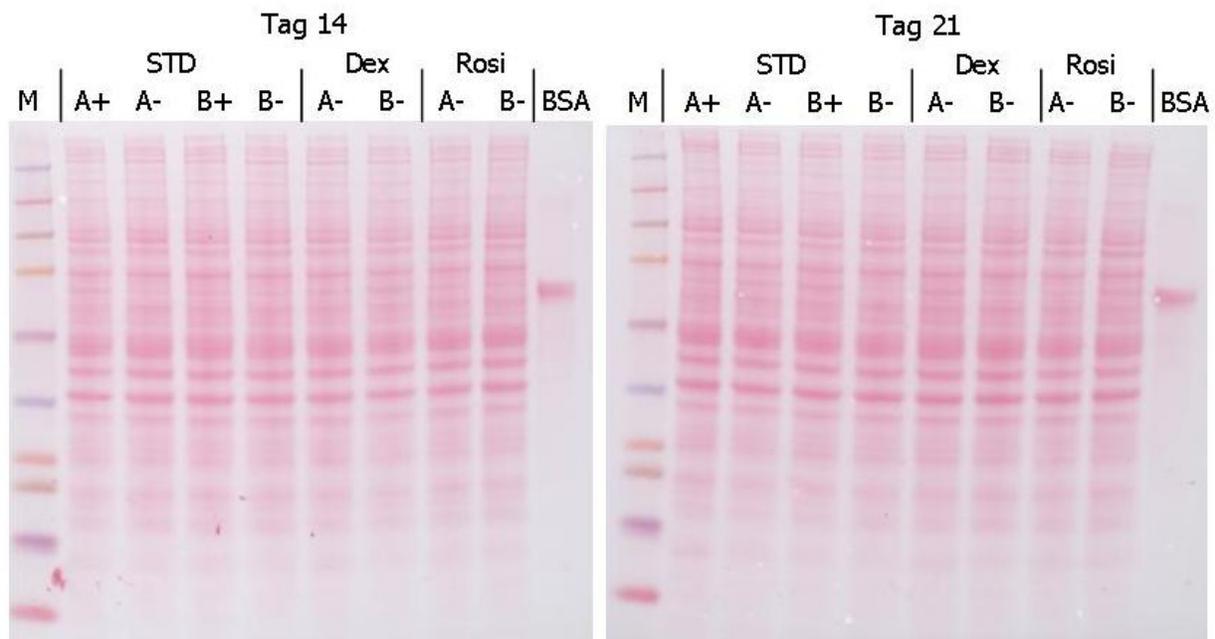


Abbildung 20: Panceau-gefärbte Nitrocellulosemembran

Um eine gleichmäßige Beladung der Spuren mit der definierten Proteinmenge von 10 bzw. 20µg pro Spur zu überprüfen, wurden die Membranen vor der Immundetektion angefärbt. Dargestellt sind die Proben des Tages 14 und 21 des Standardprotokolls (STD) sowie der separaten Inkubation mit Dexamethason (Dex) und Rosiglitazon (Rosi). Die Proteingröße lässt sich anhand des Markers (M) abschätzen. Um Seiteneffekte bei der Detektion zu vermeiden, wurde die letzte Spur jeweils mit 1 µg BSA beladen.

Die Differenzierungsmarker der Zellen, deren Sekretion in Abschnitt 3.2.1 untersucht wurde, sind in Abbildung 21 und jene dessen Sekretion in Abschnitt 3.2.4 untersucht wurde, in Abbildung 22 dargestellt.

Zunächst lässt sich, wie in Abbildung 21 zu erkennen, feststellen, dass die Zellen des Standardprotokolls wie auch jene, die 48 Stunden vor der Untersuchung nur mit Dexamethason bzw. Rosiglitazon inkubiert wurden, die Differenzierungsmarker FAS (265 kDa), apoE (34 kDa) und aP2 (15 kDa) und das Membranrezeptorprotein LRP₁ (85 kDa) exprimieren. Hierbei ist kein wesentlicher Unterschied der Expression am Tag 14 im Vergleich zu Tag 21 zu beobachten,

wobei deutlich gesagt werden muss, dass die Belichtung insbesondere bei FAS, LRP und apoE generell besonders stark ist und daher keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine eventuell quantitativ unterschiedliche Expression zulässt. Es lässt sich jedoch feststellen, dass die Expression des Differenzierungsmarker aP2 unter den verschiedenen Differenzierungsbedingungen unterschiedlich stark zu sein scheint. Dieser Kontrast ist am Tag 21 besser als am Tag 14 zu erkennen.

Die Expression scheint hierbei erhöht, umso länger die Zellen mit dem Differenzierungszusatz Rosiglitazon inkubiert wurden, was sich jeweils deutlich zwischen den Proben A- und B- des Standardprotokolls am Tag 21 zeigt.

Diese Vermutung erhärtet sich in Anbetracht der an den Tagen 14 wie auch 21 jeweils erhöhten Expression von aP2 unter alleiniger Inkubation mit Rosiglitazon (Rosi A-/B-).

Im Vergleich zum Standardprotokoll konnte bei alleiniger Inkubation mit Dexamethason bzw. Rosiglitazon für 48 Stunden sowohl in den Proben des A- als auch des B-Protokolls kein erkennbarer Unterschied in der Expression der übrigen untersuchten Differenzierungsmarker beobachtet werden.

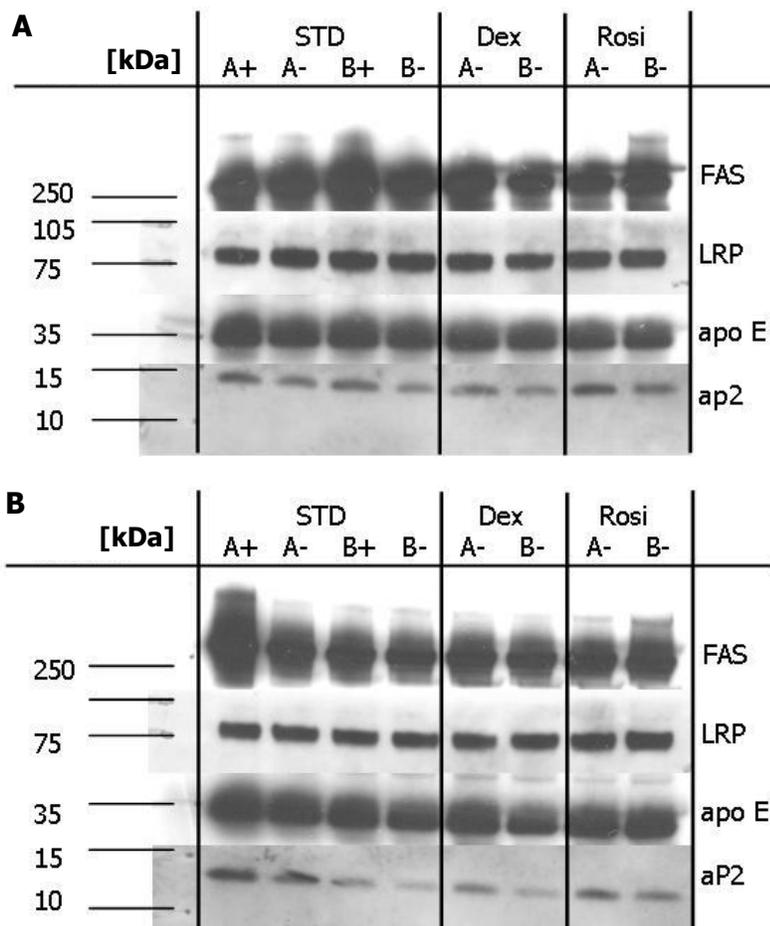


Abbildung 21: Expressionsanalyse der Differenzierungsmarker auf Proteinebene

Die Expression der Differenzierungsmarker FAS (265 kDa), apoE (34 kDa) und aP2 (15 kDa) sowie des Membranrezeptorproteins LRP₁ (85kDa) wurde am Tag 14 (**A**) und Tag 21 (**B**) untersucht. Im Standardprotokoll (STD) ist die Expression der Zellen des A- als auch B-Protokolls dargestellt, die bis zum Untersuchungszeitpunkt mit Differenzierungszusätzen (+) bzw. ohne Differenzierungszusätze (-) inkubiert wurden. Des Weiteren wurden Proben untersucht, die für 48 Stunden nur mit Dexamethason (Dex) bzw. Rosiglitazon inkubiert wurden. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die untersuchten Zellen unter allen Bedingungen sowohl am Tag 14 als auch 21 alle Differenzierungsmarker exprimieren. Während FAS, LRP und apoE konstant exprimiert werden, scheint eine Gabe von Rosiglitazon über einen längeren Zeitraum (A+ vs. B- im STD) die Expression von aP2 insbesondere am Tag 21 zu steigern. Diese Beobachtung deckt sich mit der verstärkten Expression unter alleiniger Rosiglitazoninkubation (Rosi A-/B-).

Die in Abbildung 22 gezeigten *Western-blot*s zeigen sowohl die Expression der Differenzierungsmarker der Zellen des A-Protokoll im Standardprotokoll, als auch jener nach Inkubation mit VLDL bzw. oxidierten VLDL-Partikeln (oxVLDL) am Tag 14 (A) und Tag 21 (B). Zusätzlich wurde in diesem Experiment als Ladekontrolle die Expression von Aktin dokumentiert. Zunächst konnte gezeigt werden, dass auch in dieser Differenzierung alle Differenzierungsmarker sowohl am Tag 14 als auch am Tag 21 exprimiert wurden.

Im Vergleich zu den Proben des Standardprotokoll die in Abbildung 21 dargestellt sind, lässt sich auch hier eine unterschiedlich starke Expression des aP2 zwischen den Zuständen +/- im A-Protokoll feststellen. Dieser Unterschied ist jedoch am Tag 14 stärker zu erkennen und hebt sich mit fortschreitender Differenzierung am Tag 21 praktisch nahezu auf.

Auf Grund der schwächeren Belichtung im Vergleich zu Abbildung 21 lässt sich hier zwischen den Zuständen +/- auch ein leichter Unterschied in der apoE-Expression feststellen. FAS und LRP als auch Aktin werden unter allen Zuständen gleichmäßig exprimiert. Die Expression von aP2 und apoE als auch die der übrigen Differenzierungsmarker verändert sich durch Inkubation mit VLDL- bzw. oxidierten VLDL-Partikeln nicht.

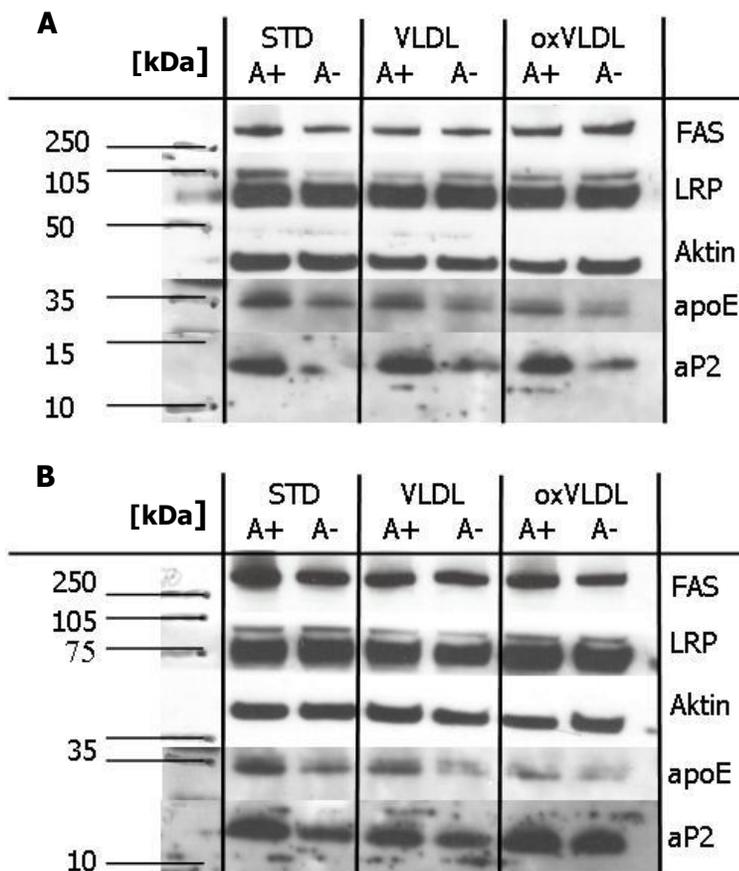


Abbildung 22: Expressionsanalyse der Differenzierungsmarker auf Proteinebene

Die Expression der Differenzierungsmarker FAS (265 kDa), apoE (34 kDa) und aP2 (15 kDa) sowie des Membranrezeptorproteins LRP₁ (85kDa) als auch Aktin (42kDa) als Ladekontrolle wurden an Tag 14 (**A**) und an Tag 21 (**B**) auf Proteinebene dokumentiert.

Im Standardprotokoll wurden die Zellen des A-Protokolls untersucht, denen 2 Tage vor Probenentnahme die Differenzierungszusätze entzogen (-) oder belassen wurden (+).

Während FAS, LRP und Aktin konstant exprimiert werden, scheint eine längere Gabe der Differenzierungszusätze die Expression von aP2 und apoE am Tag 14 und auch 21 zu steigern.

Eine Inkubation mit VLDL bzw. oxidierten VLDL-Partikeln (oxVLDL) hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine.

3.4.2 Adiponektinexpression nach Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln

Um die in Abschnitt 3.2.4 beobachtete Veränderung im Adiponektinsekretionsverhalten der Zellen nach Inkubation mit VLDL- bzw. oxidierten VLDL-Partikeln auf Expressionsebene zu untersuchen, wurde der Adiponektin Gehalt in den Zelllysaten bestimmt. Wie in Abbildung 23 zu erkennen, konnten insgesamt nur sehr geringe Mengen des Hormons mittels des *Western-blot* nachgewiesen werden. Die Proteinmenge betrug gegenüber den anderen Gelen 20µg pro Spur.

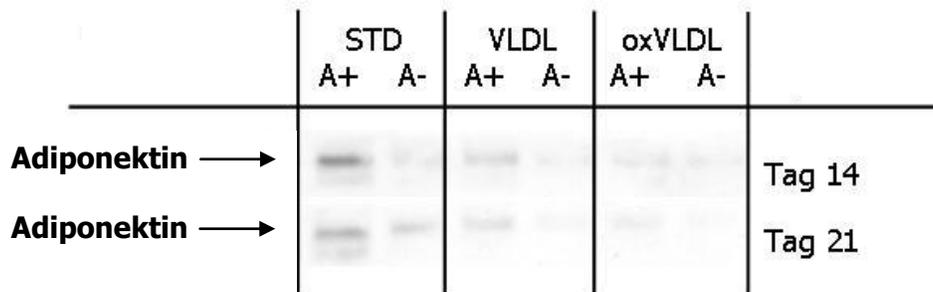


Abbildung 23: Adiponektinexpression nach Inkubation mit VLDL und oxidiertem VLDL

Die Adiponektinexpression wurde auf Proteinebene an den Tagen 14 und 21 der Differenzierung untersucht. Die Expression im Standardprotokoll ist im A-Protokoll unter Entzug der Differenzierungszusätze (A-) im Vergleich zum Zustand „mit Zusätzen“ (A+) eine wesentliche schwächere Konzentration zu erkennen. Dieses Motiv konnte ebenfalls in schwächerer Form nach Inkubation mit VLDL-Partikeln und nochmals reduziert nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln nachgewiesen werden. Dieses Schema zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem Sekretionsverhalten derselben Zellen (Abbildung 13). Adiponektin wurde bei ca. 30kDa detektiert.

Betrachtet man zunächst die Expression von Adiponektin im Standardprotokoll, so kann kein wesentlicher Unterschied des Expressionsverhalten zwischen Tag 14 und 21 festgestellt werden. Jedoch lässt sich an beiden Tagen ein Unterschied feststellen, wenn die Differenzierungszusätze 48 Stunden vor Messbeginn entzogen (A-) bzw. belassen wurden (A+). Dieser Sachverhalt könnte auf eine fortgeschrittene Differenzierung hindeuten, da Adiponektin auch als ein Differenzierungsmarker beschrieben ist. Der geringe Unterschied der Expression an Tag 14 zu Tag 21 lässt jedoch eher auf eine direkte Stimulation durch den PPAR γ Agonisten Rosiglitazon rückschließen.

Dieses Motiv findet sich auch bei den Zellen wieder, die für den genannten Zeitraum zusätzlich mit VLDL- bzw. oxidierten VLDL-Partikeln inkubiert wurden. Jedoch ist hierbei die Expression im Zustand A+ als auch A- deutlich vermindert. Diese Abnahme scheint nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln besonders deutlich. Somit wurde eine hohe Ähnlichkeit im Expressionsverhalten zum Sekretionsverhalten (Abbildung 13) nachgewiesen. Die Expression auf Proteinebene scheint ebenso durch VLDL wie durch oxidierte VLDL-Partikel beeinflussbar.

3.4.3 Expression der Insulinrezeptorsubstrate

Neben den bereits gezeigten Expressionsanalysen der Differenzierungsmarker und derjenigen des Adiponektins wurde eine Expressionsanalyse beispielhafter Moleküle im Insulintransduktionsweg durchgeführt mit dem Ziel, eine mögliche Beeinflussung durch Inkubation mit VLDL oder oxidierten VLDL-Partikeln aber auch durch die Differenzierungszusätze festzustellen. Hierbei sollte neben IRS-1 und IRS-2 auch die Expression des Insulinrezeptors untersucht werden.

In Abbildung 24 ist die Expression von IRS-1 und IRS-2 jeweils am Tag 14 (A) und 21 (B) der Differenzierung dargestellt. Hierbei wurden die Proben des A-Protokolls untersucht, denen 48 Stunden vor Messbeginn die Differenzierungszusätze im Kulturmedium entzogen (A-) oder belassen wurden (A+). Diesen beiden Zuständen wurden zusätzlich VLDL- und oxidierte VLDL-Partikel in subphysiologischer Konzentration hinzugegeben. Die Sekretionsmuster dieser Zellen sind in Abschnitt 3.2.4, deren Triglyceridgehalt in Abschnitt 3.3.3 dargestellt.

IRS-1 und IRS-2 haben beide ein Molekulargewicht von 170kDa. Neben einer Bande, die kurz über 160 kDa liegt, sind weitere Banden bei IRS-2 kurz unter 250kDa und 160kDa und bei der Detektion von IRS-1 zwischen 105 und 160 kDa zu erkennen.

Zunächst lässt sich feststellen, dass es sich bei der Bande oberhalb der 160 kDa-Marke höchstwahrscheinlich um die zu untersuchenden Insulinrezeptorsubstrate handelt.

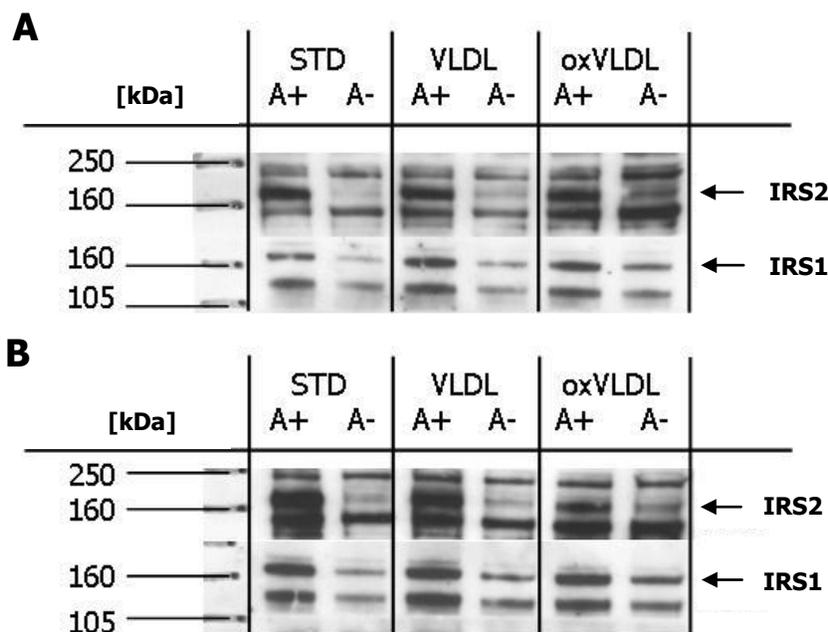


Abbildung 24: Expression der Insulinrezeptorsubstrate auf Proteinebene

Die Expression von IRS1(170kDa) und IRS2 (170kDa) wurde an den Tagen 14 (**A**) und 21 (**B**) untersucht. Hierbei konnte jeweils ein Bande oberhalb des 160 kDa Markers detektiert werden, die bei beiden Proteinen einen deutlichen Unterschied in der Expressionsstärke zwischen A+ und A- erkennen lässt. Dieses Motiv scheint durch eine Inkubation mit VLDL bzw. oxidierten VLDL nicht beeinflussbar.

Vergleicht man unter dieser Annahme zunächst die Proben A+ und A- des Standardprotokolls, so wird eine unterschiedlich starke Expression sowohl von IRS-1 als auch IRS-2 am Tag 14, aber auch am Tag 21 sichtbar. Jene Zellen, die bis zum Messzeitpunkt weiterhin mit den Differenzierungszusätzen, hierunter auch Insulin, inkubiert wurden (A+), zeigen eine deutlich höhere Expression. Dieser Unterschied scheint beim IRS2 besonders deutlich ausgeprägt.

Dieses Expressionsverhalten lässt sich ebenfalls nach Inkubation mit VLDL und oxidiertem VLDL beobachten. Im Vergleich zum Standardprotokoll schienen die Expression von IRS1 und IRS2 hierbei jedoch nicht beeinflussbar.

Zusammenfassend konnte somit mit den Expressionsanalysen auf Proteinebene gezeigt werden, dass die adipozytären Differenzierungsmarker ap2, ApoE und Adiponektin, aber auch Proteine des Insulinsignaltransduktionsweges in Abhängigkeit von Rosiglitazon exprimiert werden. Die Zugabe oxidiertes und nativer VLDL hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression dieser Marker.

4. Diskussion

4.1 Nachweise der adipozytären Differenzierung

Die Differenzierung der Adipozyten wurde anhand von drei Parametern überprüft. Erstens wurde eine histologische Untersuchung durchgeführt, in der lichtmikroskopisch im Laufe der Differenzierung an Größe zunehmende, lichtbrechende, vesikuläre Strukturen nachgewiesen wurden, deren Gehalt an hydrophoben Lipiden wie Triglyceriden nach einer Fettrotfärbung bestätigt wurde (Abb 6).

Zweitens konnte mittels Messung zellulärer Triyglyceride in allen durchgeführten Messungen eine deutliche Zunahme der Lipide an Tag 21, verglichen zu Tag 14, festgestellt werden (Abb. 17). Diese Zunahme spricht für eine konsistente Ausprägung des adipozytären Phänotyps und stimmt mit den mikroskopischen Beobachtungen überein. Drittens konnten mehrere Differenzierungsmarker der Adipogenese nachgewiesen werden. Die untersuchten Differenzierungsmarker FAS, apoE und aP2 wurden sowohl an Tag 14 und 21 vollständig im Standardprotokoll nachgewiesen (Abb. 21). Es wurde ebenfalls überprüft, ob die kurzzeitige Inkubation mit Lipoproteinen oder oxidierten Lipoproteinen die Adipogenese beeinflusst. Dies konnte nicht festgestellt werden.

Es wurden jedoch vereinzelt eine unterschiedlich starke Expression der Proteine aP2 und apoE durch die einzelnen Differenzierungszusätze beobachtet (Abb. 22). Ebenso kam es durch eine längere Inkubation mit den Differenzierungszusätzen zu einer verstärkten Expression der Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2 (Abb. 24). Frühere Arbeiten mit diesem Zellmodell zeigten keine regulatorischen Eigenschaften der Differenzierungszusätze bezüglich dieser Proteine. Es gibt jedoch ähnliche Beobachtungen, die in murinen Adipozyten gemacht wurden. So können zum Beispiel PPAR γ -Antagonisten die Expression von ApoE auf mRNA-Ebene steigern¹⁶⁰. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Proteinexpression von apoE und aP2 sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 in den hier durchgeführten Experimenten (Abb. 22). aP2 wird durch PPAR γ und C/EBP α induziert und gehört wie ApoE und LDL zu den späteren Markern der Adipogenese.

Der Beleg einer erfolgreichen Differenzierung sichert somit die Aussagekraft der hier zu diskutierenden Regulation der Adipozytokinsekretion.

4.2 Regulation der Adipozytokinsekretion

4.2.1 Regulation durch Differenzierungszusätze

In allen durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass die eingesetzten Differenzierungszusätze die Sekretion des IL-6 maßgeblich beeinträchtigen. Nach 48-stündigem Entzug dieser Zusätze stieg die IL-6-Sekretion sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 der Differenzierung deutlich an (z.B. Abb. 10). Eine Inhibition der IL-6-Sekretion durch Rosiglitazon, wie sie in diesem Zellmodell zuvor vermutet wurde, konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr ist die IL-6-Sekretion an beiden Tagen der Differenzierung nach Inkubation mit Rosiglitazon, wie auch nach Inkubation ohne Differenzierungsfaktoren nach 48 Stunden, nahezu identisch (Abb. 8).

Eine alleinige Inkubation mit dem Differenzierungszusatz Dexamethason hingegen, führte zu einer deutlichen Minderung der IL-6-Sekretion an Tag 14 und 21 (Abb. 8). Dieses um ein vielfaches reduzierte Sekretionsverhalten zeigte sich ebenfalls bei humanen Präadipozyten, die unter ähnlichen Bedingungen zu reifen Adipozyten differenziert wurden und bei steigender Dexamethasonkonzentration im Kulturmedium inkubiert wurden¹⁶⁵. Der inhibierende Effekt des Dexamethasons konnte mittels des Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonisten RU484 aufgehoben werden. Auch in primär kultivierten Adipozyten senkt Dexamethason die IL-6 Sekretion¹⁶⁶. IL-6 wird außerdem auch in anderen Zellarten wie Monozyten durch das weniger potente, pharmakologische Glukokortikoid Hydrocortison auf Proteinebene gehemmt¹⁶⁷.

Trotz alledem gibt es Hinweise, dass Dexamethason nicht allein eine Reduktion der IL-6-Sekretion im Zustand „mit Zusätzen“ verursacht. Ebenso könnte es parallel durch die Differenzierungszusätze zu einer Stimulation der Sekretion kommen. So konnte kürzlich in murinen 3T3-L1 Zellen gezeigt werden, dass eine Inkubation mit Insulin die Sekretion an IL-6 um das 2,3fache zu erhöhen vermag¹⁰⁰. Zudem gibt es Hinweise, dass eine Inhibition des MAPK-Signaltransduktionsweges durch UO126 ebenfalls zu einer verringerten IL-6 Sekretion führt¹⁶⁸. Somit handelt es sich bei der Differenz in der IL-6 Sekretion der Protokolle „mit-“ und „ohne Zusätze“ womöglich um eine Kombination aus stimulierenden und inhibitorischen Effekten seitens verschiedener Differenzierungszusätze. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Gewichtung der regulatorischen Eigenschaften und molekularer Wirkmechanismen der Differenzierungszusätze in diesem Adipozytenmodell genauer zu charakterisieren.

Im Gegensatz zur IL-6-Sekretion wurde in allen hier durchgeführten Experimenten ein zu erwartender Anstieg der Adiponektinsekretion im Zustand „mit Zusätzen“ beobachtet (z.B. Abb. 13). Dieser Sachverhalt deckt sich mit vorangegangenen Messungen an dieser Zelllinie. Eine genauere Untersuchung zeigte, dass zwar Rosiglitazon, nicht aber Dexamethason die

Adiponektinsekretion im B-Protokoll zu steigern vermag (Abb. 7). Rosiglitazon ist ein pharmakologischer PPAR γ -Antagonist. PPAR γ ist Transkriptionsfaktor für Adiponektin und bindet in dessen Promotorbereich an PPRE⁷⁶. Vergleichbare stimulierende Effekte konnten bereits *in vitro*¹⁶⁹, in Tiermodellen¹⁷⁰ und klinischen Studien¹⁷¹ nachgewiesen werden. *In vivo* zeigen PPAR γ *knock-out* Mäuse erniedrigte Plasmaspiegel an Adiponektin¹⁷².

Obwohl eine Steigerung der Adiponektinkonzentration im B-Protokoll unter Gabe des PPAR γ -Antagonisten Rosiglitazon beobachtet werden konnte, gibt es Hinweise, dass sich dieser regulatorische Effekt nicht nur auf Rosiglitazon beschränkt. So konnte in 3T3-L1-Zellen bei einer Gabe von Insulin, TNF α oder Dexamethason ein Abfall der Adiponektinexpression auf m-RNA-Ebene gemessen werden¹¹⁶. Vergleicht man die Sekretion der Zellen im Zustand „ohne Zusätze“ mit jener nach 48-stündiger Dexamethason-Inkubation, so kann in diesem Zellmodell auf Sekretionsebene kein inhibitorischer Effekt des Dexamethasons festgestellt werden (Abb. 7).

Die von Fasshauer et al. in 3T3-L1 Zellen beschriebene Inhibition der Adiponektinexpression durch Insulin verhält sich entgegengesetzt zu der durch Insulin stimulierten Adiponektinsekretion im gleichen Zellmodell⁷⁰. In menschlichen Prädipocyten des SGBS-Modells, die zu reifen Adipozyten differenziert wurden, wurde zudem ein Abfall der Adiponektinexpression und –sekretion nach Entzug des Differenzierungszusatzes Insulin beobachtet¹⁷³.

Vergleichbar mit der Regulation der IL-6-Sekretion handelt es sich hier sehr wahrscheinlich ebenfalls um mehrere regulatorische Komponenten seitens der Differenzierungszusätze, welche die Adiponektinsekretion beeinflussen. Die regulatorischen Eigenschaften der Differenzierungszusätze auf die Adiponektinsekretion müssten daher ebenfalls noch genauer untersucht werden.

4.2.2 Veränderte Adipozytokinsekretion nach Inkubation der Lipoproteine

In den Versuchen wurde gezeigt, dass eine Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln in subphysiologischen Konzentrationen von jeweils 0,1mg/ml die IL-6-Sekretion zu steigern vermag (Abb. 14). Der Zusatz oxidiertes LDL-Partikel führte in Anbetracht der IL-6-Sekretion zu uneindeutigen Ergebnissen (Abb. 10). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Oxidierung der Lipoproteine weder einen Einfluss auf das IL-6, noch auf das Adiponektinsekretionsverhalten, zu haben scheint (Abb. 13,14). Da die Adipositas mit erhöhten oxidativen Stressmarkern wie auch oxidierten Lipoproteinen einhergeht^{119-121,123}, wäre hier ein unterschiedliches Sekretionsverhalten zu erwarten gewesen. Mit diesen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die in Fettgewebe vorhandenen Makrophagen die Modifizierung von Lipoproteinen durchaus induzieren könnten. Allerdings hat dies nur eine untergeordnete Rolle für die adipozytäre Adipozytokinsekretion.

Der Anstieg der IL-6 Sekretion unter Inkubation mit oxidierten wie auch nicht oxidierten VLDL-Partikel ging mit einem Anstieg der intrazellulären Triglyceridkonzentration von durchschnittlich ca. 20% gegenüber dem Standardprotokoll einher (Abb 19). Da in vorangegangenen Experimenten mit diesem Zellmodell eine stabile Expression der LPL an den Tagen 14 und 21 der Differenzierung nachgewiesen wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Anstieg der intrazellulären Triglyceride nach Inkubation mit VLDL-Partikeln direkt auf dessen Abbau durch LPL und anschließender Aufnahme der FS verursacht wird. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass ein Anstieg der intrazellulären Lipidkonzentration im Adipozyten, wie es auch im Verlauf der Adipositas der Fall ist, direkt zu einem Anstieg der IL-6-Sekretion führt.

Die unterschiedliche Reaktion auf die Lipoproteine LDL und VLDL wirft jedoch die Frage auf, warum nur eine Inkubation mit VLDL die IL-6-Sekretion eindeutig zu steigern vermag. Dies gilt insbesondere in Anbetracht der regulatorischen Eigenschaften des Cholesterins (4.3.3), dessen Anteil in den LDL-Partikel wesentlich höher liegt als in VLDL.

Eine mögliche Erklärung könnte die in vorangegangenen Experimenten nachgewiesene Expressionsabnahme des LDLR mit fortlaufender Differenzierung in diesem Zellmodell darstellen. Aus diesem Grund konnte im Laufe der Differenzierung mittels radioaktiver Markierung der Lipoproteine eine sinkende Aufnahme der LDL gezeigt werden¹⁵⁴. Hinzu kommt, dass VLDLR mit fortlaufender Differenzierung in Adipozyten des hMSC-Tert-Modells auf Proteinebene verstärkt exprimiert wird. Auch in sich differenzierenden 3T3-L1-Zellen wurde eine Zunahme des VLDLR gemessen¹⁷⁴. Die VLDLR-Expression wird in 3T3-L1-Zellen durch den Differenzierungszusatz Dexamethason stimuliert¹⁷⁵.

Der VLDL-Rezeptor gehört zur Familie der LDLR und weist in seiner Struktur eine hohe Homologie zum LDLR auf. VLDLR wird insbesondere im Muskel- und Fettgewebe, jedoch nur zu geringem Anteil im Lebergewebe, exprimiert¹⁷⁶. VLDLR bindet apoE¹⁷⁷, welches unter anderem in VLDL zu finden ist. Neben ApoE bindet VLDLR auch direkt die LPL¹⁷⁸. Bei Überexpression von VLDLR wird die Aufnahme zum Beispiel von Chylomikronenremnants erhöht¹⁷⁹.

Bei Abwesenheit von VLDLR kommt es in VLDLR *knock-out* Mäusen zu einer reduzierten Fettgewebsmasse und zu verkleinerten Adipozyten¹⁸⁰. Die Funktion der Adipozyten bleibt hierbei jedoch intakt. Ebenso treten keine Anomalien in der Zusammensetzung der Lipoproteinfraktionen auf. In weiterführenden Experimenten an diesen Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass diese Mäuse, verglichen zum Wildtyp, bei einer 17-wöchigen *high-fat, high calorie*-Diät (HFC) eine verminderten BMI, eine verbesserte Glukoseaufnahme im Glukosetoleranztest und auch insgesamt verminderte Glukose- und Insulinkonzentrationen im Plasma aufwiesen. Selbst nach einer Kreuzung mit ob/ob Mäusen zu VLDLR -/- ob/ob -Mäusen konnte die Abwesenheit des VLDL-Rezeptors die genetische Prädisposition der Mäuse hin zur Fettleibigkeit im Vergleich zu VLDLR +/+ ob/ob deutlich verringern¹⁸¹.

In Anbetracht der hier *in vitro* durchgeführten Experimente ist es somit wahrscheinlich, dass eine zunehmende Expression des VLDLR im Laufe der Differenzierung zu vergrößerten und auch zu triglyceridreicheren Adipozyten nach Inkubation mit VLDL führt. Weiterhin fraglich bleibt jedoch, ob die erhöhte IL-6-Sekretion direkt auf den Anstieg intrazellulärer Triglyceride zurückzuführen ist oder ob die Zusammensetzung der unterschiedlichen Lipide im VLDL-Partikel die Adipozytokinsekretion reguliert (4.2.4). Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, die die Zusammensetzung der Lipide im VLDL-Partikel einschließen.

Die Adiponektinsekretion verhielt sich nach Inkubation mit oxidierten, wie auch nicht oxidierten VLDL, entgegengesetzt zur IL-6 Sekretion (Abb. 13). Es kam zu einem deutlichen Abfall der Sekretion nach Lipoproteininkubation sowohl an Tag 14, als auch Tag 21 der Differenzierung, jeweils unter Gabe und Entzug der Differenzierungszusätze vor dem Messzeitpunkt.

In vivo geht die Adipositas mit einem Abfall der Spiegel an Adiponektin einher¹⁰⁹. Die Adipositas ist unter anderem durch eine Zunahme der Adipozytengröße und somit dessen Triglyceridgehalt verbunden¹⁰⁷. In den hier durchgeführten Experimenten konnte stets ein Anstieg der intrazellulären Triglyceridkonzentration von Tag 14 zu Tag 21 beobachtet werden. Dieser Anstieg ging mit einer Zunahme der Adiponektinsekretion einher. Da Adiponektin ein Marker des reifen Adipozyten darstellt, sollte die Zunahme der Adiponektinsekretion in Korrelation mit ansteigenden intrazellulären Triglyceriden nicht als ein pathologischer Vorgang, sondern als physiologischer Reifungsprozess der Adipogenese verstanden werden.

Die Inkubation mit VLDL-Partikeln, welche aus normolipämischem Plasma isoliert wurden, führte, wie bereits erwähnt, an beiden Tagen im Vergleich zum Standardprotokoll zu einem Anstieg der intrazellulären Triglyceride (Abb. 18). In Korrelation zu diesem Anstieg kam es jedoch zu einem drastischen Absinken der Adiponektinsekretion. Dies wirft die Frage auf, auf welche Weise der Anstieg der intrazellulären Triglyceride zu einer erniedrigten Adiponektinsekretion führte oder ob dies überhaupt direkt in Zusammenhang mit der Adiponektinsekretion zu bringen ist. Diese Fragen können anhand dieser Daten noch nicht beantwortet werden. Es ist jedoch bekannt, dass die unterschiedlichen Lipidklassen die Adipozytokine beeinflussen (4.2.4).

Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die hier durchgeführte Inkubation mit Lipoproteinen nicht auf direktem Wege zu einer Absenkung der Adiponektinsekretion führte. So konnte in 3T3-L1-Zellen gezeigt werden, dass die Expression von Adiponektin über den JNK-Signaltransduktionsweg, welcher durch das inflammatorische Zytokin TNF α stimuliert wird, inhibiert wird¹⁸². Eine Inhibition der Adiponektinsekretion durch inflammatorische Zytokine, wie TNF α oder IL-6, wurde auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet¹¹⁵. Ein Entgegenwirken inflammatorischer Prozesse durch Sulfatide führte gleichzeitig zu einer stark erhöhten Adiponektinexpression in isolierten humanen Adipozyten¹⁸³.

In diesem Zellmodell ist eine Supprimierung der Adiponektinsekretion zumindestens durch IL-6 wenig wahrscheinlich, da es bei einer Steigerung der IL-6-Sekretion durch Inkubation der Zellen mit Cholesterin zu keiner Senkung der Adiponektinsekretion kam (Abb. 15). Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, dass andere Cytokine wie TNF α vermehrt unter VLDL-Inkubation ausgeschüttet und somit autokrin die Adiponektinsekretion supprimiert haben. Um eine autokrine Regulation der Adiponektinsekretion durch TNF α zu untersuchen, bedarf es weiterer Experimente.

4.2.3 Steigerung der IL-6 Sekretion durch Cholesterin

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation der Zellen mit Cholesterin in subphysiologischer Konzentration von 10 μ g/ml die IL-6-Sekretion, jedoch nicht die Adiponektinsekretion, maßgeblich beeinflusst (Abb. 15,16). Es kam zu einem vielfachen Anstieg der IL-6-Sekretion, sowohl in An- wie auch in Abwesenheit des Dexamethasons.

Dies legt die Vermutung nahe, dass ein erhöhter zellulärer Cholesteringehalt die Sekretion oder eventuell auch die Transkription von IL-6 erhöht. Es gibt Hinweise, dass Cholesterin und dessen Synthese mit der Synthese von IL-6 zusammenhängen. Da die Transkription von IL-6 durch synergetische Effekte der Transkriptionsfaktoren NF-IL6 und NF- κ B hervorgerufen wird, stellt sich die Frage, inwiefern diese Transkriptionsfaktoren und Cholesterin, bzw. dessen Vorstufen, miteinander agieren.

In isolierten Präadipozyten, die unter ähnlichen Bedingungen wie die hier genutzte Zelllinie differenziert wurden, konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Cholesterinsynthese durch den pharmakologischen HMG-CoA-Reduktase Inhibitor Cerivastatin sowohl die Transkription auf m-RNA Ebene, als auch die Sekretion des reifen Adipocyten an IL-6 wesentlich reduziert¹⁸⁴. Eine zusätzliche Inkubation mit Zwischenstufen der Cholesterinbiosynthese, Mevalonat und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), konnte den inhibitorischen Effekt des Statins in Bezug auf die IL-6-Sekretion wieder aufheben. Aus dieser Tatsache heraus wurde postuliert, dass die Reduktion dieser Zwischenstufen, welche für die posttranskriptionale Modifizierung der sog. Ras- und Rho-Proteine nötig sind, die ihrerseits wiederum NF- κ B aktivieren, eine verminderte IL-6-Sekretion zur Folge hat.

Dieser Effekt konnte zuvor auch in glatten Muskelzellen, Monocyten und Endothelzellen beobachtet werden^{185,186}. Auch in vivo konnte gezeigt werden, dass bei einer Behandlung adipöser Patienten mit dem HMG-CoA Reduktase Inhibitor Atorvastatin die Spiegel an IL-6 unabhängig von TNF α deutlich gemindert wurden¹⁸⁷.

Der Umstand, dass die Vorstufen der Cholesterinbiosynthese über Umwege die IL-6-Transkription erhöhen, erklärt jedoch nicht, warum eine Inkubation der Zellen mit Cholesterin die IL-6-Sekretion steigert. Dies gilt insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass die endogene Cholesterinproduktion der Zelle negativ rückkoppelnd durch ihr Endprodukt, Cholesterin, inhibiert wird.

Es ist jedoch bekannt, dass Cholesterin als Signalmolekül innerhalb der Zelle interagiert. So inhibiert es beispielsweise die Aktivierung von SREBP-1a und -2, um auf diesem Wege die zelluläre Cholesterinbiosynthese zu regulieren. Direkte Interaktionen von Cholesterin und den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und NF-IL6 der Zytokintranskription sind jedoch nicht bekannt. Ebenso gibt es keine wissenschaftlichen Erkenntnisse, ob *sterol responsive elements* in Promotorregionen für Interleukine agieren.

Einige Hinweise bezüglich molekularer Regulationsmechanismen des Cholesterins auf die IL-6-Sekretion könnten aus Untersuchungen an Makrophagen herangezogen werden. Es ist bekannt, dass Makrophagen Cholesterin aus cholesterinreichen Lipoproteinen, insbesondere oxidierte LDL, aufnehmen und speichern. Dieser nicht negativ auf die Cholesterinaufnahme rückgekoppelte Prozess führt subendothelial in den Gefäßen zur Bildung sog. Schaumzellen, die sich zum arteriosklerotischen Plaque formieren und unter Entzündungsvorgängen in die Apoptose eintreten¹⁸⁸. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht nur der apoptotische Prozess an sich zur Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine führt, sondern dass freies Cholesterin (free cholesterol (FC)) bereits in den Makrophagen, die Produktion und Sekretion wie IL-6 oder TNF α , verursacht. In den Makrophagen führt die Erhöhung des FC zu einer Überladung der normalerweise cholesterinarmen ER-Membran. Es kommt durch Beeinträchtigung der *sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATP-ase* (SERCA) zu Veränderung des Calciumgleichgewichts¹⁸⁹. Diese Veränderung in der Membran führt in der Zelle zum sog. *er-stress*, der sich in einer Aktivierung mehrerer Signaltransduktionswege zeigt. Sie werden unter dem Begriff *unfolded protein response* (UPR) zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang sowohl zu einer Aktivierung von NF- κ B, als auch JNK führt, und somit die Expression und Sekretion von IL-6 und TNF α steigert¹⁹⁰. Dabei kam es nach FC-Beladung zeitlich gesehen zuerst zur Erhöhung der TNF α -Sekretion, was jedoch eine autokrine Stimulation der IL-6-Sekretion durch TNF α nicht ausschließt. Eine Inhibition des Cholesterintransportes zum ER ließ diesen Cholesterineffekt auf die IL-6- und TNF α -Sekretion verschwinden. Es bleibt also zu überprüfen, ob derartige regulatorische Einflüsse des Cholesterins auch für den Adipozyten gelten. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um sowohl die Veränderungen des zellulären Cholesteringehalts näher zu untersuchen, als auch die hierauf folgende Aktivierung von NF- κ B und JNK im Zusammenhang mit der IL-6-Expression und -sekretion darzustellen

4.2.4 Regulation durch Fettsäuren

Ein erhöhter Spiegel an FFA im Plasma ist ein typisches Charakteristikum adipöser Patienten, bei denen sich eine Insulinresistenz entwickelt. Hintergrund ist der verminderte Insulinreiz. Durch ihn werden weniger Fettsäuren im peripheren Gewebe aufgenommen, die Sekretion in der Leber wird erhöht und die Lipolyse im Fettgewebe wird, verstärkt durch TNF α , gesteigert.

Die in diesem Versuch eingesetzte Ölsäure (C₁₈H₃₄O₂) führte jedoch weder an Tag 14, noch an Tag 21, anders als erwartet, zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Sekretion oder zu einer verminderten Adiponektinsekretion (Abb. 15,16).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Inkubation von 3T3-L1-Zellen mit bestimmten Fettsäuren in physiologischen Konzentrationen das Adipozytokinmuster beeinflusst. So wurde gezeigt, dass Palmitat (C₁₆H₃₁O₂) die Expression von IL-6 in 3T3-L1 Zellen, durch Aktivierung von NF- κ B, erhöht. Nach Inkubation mit anderen Fettsäuren, zum Beispiel mit Laurinsäure (C₁₂H₂₃O₂) oder Docohexaensäure (C₂₂H₃₂O₂), konnte hingegen kein stimulierender Effekt in diesem Zellmodell nachgewiesen werden¹⁹¹. Eine Steigerung der IL-6-Sekretion durch Palmitat wurde zuvor bereits in Muskelzellen demonstriert¹⁹². Im Gegenteil dazu können mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*poly unsaturated fatty acids*, PUFA), wie Docohexaensäure oder Eicosapentaensäure (C₂₀H₃₀O₂) in vivo, bei sehr fetthaltiger Diät, die Adiponektinsekretion des Fettgewebes steigern¹⁹³. Auch eine erhöhte Aufnahme an konjugierter Linolensäure führt in vivo zu erhöhten Adiponektinspiegeln im Plasma¹⁹⁴.

In db/db Mäusen führt eine an mehrfach ungesättigten Fettsäuren reiche Diät sogar zum völligen Rückgang der Makrophageninfiltration im Fettgewebe. Gleichzeitig sank im Adipozyten die Aktivität der JNK. Gegenüber anderen fetthaltigen Diäten mit ungesättigten Fettsäuren kam es nicht zum Absinken der Adiponektinkonzentration im Plasma¹⁹⁵.

Somit besteht die Möglichkeit, dass nur bestimmte Fettsäuren in der Lage sind, die IL-6- oder Adiponektinsekretion zu beeinflussen. In Anbetracht dessen, dass mehrfach gesättigte Fettsäuren in der Lage sind, die IL-6-Sekretion in vivo zu hemmen⁹⁷, dürfte dies Rückschlüsse darauf zulassen, in wieweit die Zusammensetzung der Nahrungslipide den inflammatorischen Status des Fettgewebe, wie auch die Sekretion der Adipozytokine, bestimmt. Zur Bestätigung einer solchen Hypothese müssten umfangreiche Versuche mit unterschiedlichen FFS, wie auch unterschiedlich zusammengesetzten Lipoproteinen, durchgeführt werden.

4.3 Ausblick: Bedeutung der Regulationsmechanismen

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen auf eine eindeutige Beteiligung des Lipoproteinstoffwechsels, sowie des Cholesterinstoffwechsels, an der Regulation der Adipozytokine hin. In anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass sowohl unterschiedliche Lipidklassen, wie Triglyceride und Cholesterin, einen Einfluss auf die Adipozytokine haben, als auch, dass der in reifen Adipozyten exprimierte VLDLR einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung der Adipositas zu haben scheint.

Würde man die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Situation in vivo anwenden, so könnte die Zusammensetzung unterschiedlicher Lipide in Lipoproteine, wie auch der mit der Nahrung aufgenommene Cholesteringehalt, für den Verlauf der Adipozytokinsekretion in Korrelation mit dem zellulären Triglyceridgehalt bei der Entwicklung der Adipositas von großer Bedeutung sein.

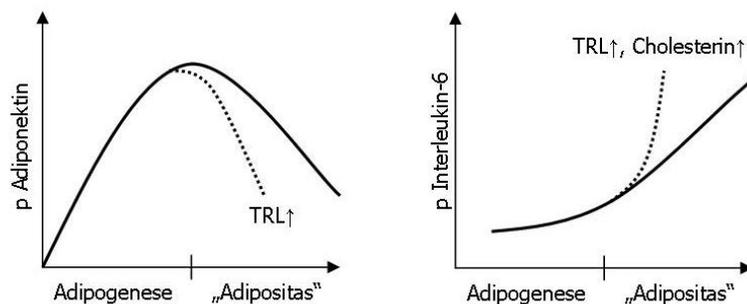


Abbildung 25: Hypothese zur Entwicklung der Adipozytokinsekretion im Zusammenhang mit dem Lipid- und Cholesterinstoffwechsel

Anhand der durchgeführten Experimente wurde gezeigt, dass im Laufe der Differenzierung die Adiponektin- und IL-6-Sekretion zunimmt. In Anbetracht einer sich entwickelnden Adipositas könnten in vivo höhere Spiegel an Cholesterin und Triglyceridreichen Lipoproteinen (TRL), wie VLDL, die Entwicklung des Plasma-Adiponektins (p Adiponektin) und des Plasma-IL-6 (p IL-6) verschärfen.

Da eine Abwesenheit des VLDLR in vivo vor Fettleibigkeit und folglich auch vor Insulinresistenz schützt, bedarf es in diesem Zellmodell genauerer Expressionsanalysen in Korrelation mit den Auswirkungen auf die Adipozytokinsekretion nach Lipoproteininkubation. In diesen Experimenten könnten Lipoproteine zum Einsatz kommen, die Probanden entnommen wurden, die sich zuvor einer Diät aus gesättigten oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren unterzogen haben, um auf diese Weise Hinweise auf die Auswirkung unterschiedlich zusammengesetzter Lipoproteine zu erhalten. Zudem sollten die Auswirkungen spezieller Fettsäuren, wie Docosahexaensäure oder Eicosapentaensäure, auf die Adiponektinsekretion untersucht werden. Auch hier müsste ausgeschlossen werden, ob eine Inhibition der inflammatorischen Zytokine durch diese PUFAs

ein Grund für den Anstieg der Adiponektinsekretion ist, oder ob es auf Signaltransduktionsebene zur direkten Stimulation des Adiponektins kommt.

In weiteren Experimenten könnte die Messung der intrazellulären Cholesterinkonzentration, in Korrelation mit Markern der inflammatorischen und IL-6 regulierenden IKK- und JNK-Signaltransduktionswege, im Mittelpunkt stehen. Diese Experimente sollten unbedingt eine Messung des TNF α auf Sekretions- und Expressionsebene einschließen, da dieses Cytokin eine starke autokrine Regulation sowohl auf IL-6, als auch Adiponektin zu haben scheint.

4.5 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit sollten regulatorische Aspekte der Adipozytokinsekretion bei sich zu Adipozyten differenzierenden hMSC-Tert Zellen untersucht werden. Es konnte eine erfolgreiche Differenzierung anhand histologischer Kriterien und des Expressionsprofils nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeitsgruppe zuvor beschriebene gegenläufige Adipozytokinsekretion, unter Gabe und Entzug der Differenzierungszusätze, wurde genauer charakterisiert. Dexamethason supprimiert in differenzierten hMSC-Tert-Zellen die Interleukin-6-Sekretion, während die Adiponektinsekretion, und höchstwahrscheinlich auch Adiponektinexpression, durch den PPAR γ Antagonisten Rosiglitazon gesteigert wird. Weitere Einflüsse der Differenzierungsfaktoren sind jedoch nicht auszuschließen und bedürfen detaillierterer Untersuchungen. Nach Inkubation von VLDL-Partikeln in subphysiologischer Konzentration, konnte ein Anstieg der intrazellulären Lipidkonzentration gemessen werden. Gleichzeitig kam es zu einem Absinken der Adiponektinsekretion, wie auch zu einem Anstieg der Interleukin-6-Sekretion. Auch auf Expressionsebene kam es zu einer Supprimierung des Adiponektins durch die Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL-Partikeln. Die Oxidierung der Lipoproteine, die in adipösen Menschen vermehrt nachzuweisen, und wahrscheinlich auf eine erhöhte Inflammation im Fettgewebe zurückzuführen ist, führte anders als erwartet zu einem verstärkten Anstieg der Interleukin-6-, sowie zu einer verstärkten Reduktion der Adiponektinsekretion. Nach Inkubation mit Cholesterin, in ebenfalls subphysiologischer Konzentration, kam es interessanterweise, zu einem starken Anstieg der Interleukin-6-Sekretion, sowohl nach Gabe, als auch nach Entzug des Dexamethasons. Die Adiponektinsekretion wurde dabei nicht beeinflusst.

Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um Veränderungen des Adipozytokinmusters, bei variablen Inkubationszeiten und Konzentration der Lipoproteine, zu erheben. Insbesondere sollten die Zusammensetzung der Lipidklassen in den Lipoproteinen, Untersuchungen der Cholesterolaufnahme und dessen intrazelluläre Konzentration, in Korrelation mit der Interleukin-6-Sekretion und -Expression, im Vordergrund stehen. Diese Untersuchungen werden dann dazu beitragen, die gegenseitige Regulation zwischen Lipidstoffwechsel und Adipozytokinsekretion besser zu verstehen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Braunes und weißes Fettgewebe einer Rattenniere, weiße Fettzelle aus dem Knochenmark eines Schafes (Elektronenrastermikroskopie)	4
Abbildung 2:	Stoffwechsel und Stoffwechselregulation im Adipozyten	8
Tabelle 1:	Auswahl wichtiger Adipozytokine	11
Abbildung 2:	Das veränderte Adipozytokinmuster ausgewählter Adipozytokine im Stadium der Adipositas und die folgende Dysregulation des Stoffwechsels	17
Abbildung 4:	Differenzierungsschema der hMSC-Tert	24
Tabelle 2:	verwendete 1. Antikörper zur Immundetektion	34
Tabelle 3:	verwendete 2. Antikörper zur Immundetektion	34
Abbildung 5:	Durchlichtmikroskopie der adipozytären Differenzierung	37
Abbildung 6:	Fettrot-Dapi-Färbung der adipozytären Differenzierung	39
Abbildung 7:	Adiponektinsekretion bei Untersuchung der Zusätze	40
Abbildung 8:	IL-6-Sekretion bei Untersuchung der Zusätze	41
Abbildung 9:	Adiponektinsekretion nach Inkubation oxidierter LDL-Partikel	42
Abbildung 10:	IL-6-Sekretion nach Inkubation oxidierter LDL-Partikel	43
Abbildung 11:	Adiponektinsekretion nach Inkubation oxidierter VLDL-Partikel	45
Abbildung 12:	IL-6-Sekretion nach Inkubation oxidierter VLDL-Partikel	46
Abbildung 13:	Adiponektinsekretion nach Zugabe oxidierter und nicht oxidierter VLDL-Partikel	47
Abbildung 14:	IL-6-Sekretion nach Inkubation oxidierter und nicht oxidierter VLDL-Partikel	48
Abbildung 15:	Adiponektinsekretion nach Zugabe von Cholesterin bzw. Ölsäure	50
Abbildung 16:	IL-6-Sekretion nach Inkubation mit Ölsäure und Cholesterin	51
Abbildung 17:	Triglyceridbestimmung nach Inkubation mit oxidierten LDL-Partikeln	52
Abbildung 18:	Triglyceridbestimmung nach Inkubation mit oxidierten VLDL-Partikeln	53
Abbildung 19:	Triglyceridgehalt nach Inkubation mit VLDL- und oxidierten VLDL- Partikeln	55
Abbildung 20:	Panceaugefärbte Nitrocellulosemembran	56
Abbildung 21:	Expressionsanalyse der Differenzierungsmarker auf Proteinebene	57
Abbildung 22:	Expressionsanalyse der Differenzierungsmarker auf Proteinebene	58
Abbildung 23:	Adiponektinexpression nach Inkubation mit VLDL und oxidierten VLDL (oxVLDL)	60
Abbildung 24:	Expresson der Insulinrezeptorsubstrate auf Proteinebene	61
Abbildung 25:	Hypothese zur Entwicklung der Adipocytokinsekretion im Zusammenhang mit dem Lipid- und Cholesterinstoffwechsel	70

Literaturverzeichnis

1. Fessler,A., Beck,J.C. & Rubinstein,D. Factors affecting lipid synthesis in human adipose tissue in vitro. *Metabolism* **16**, 438-444 (1967).
2. Shrago,E., Glennon,J.A. & Gordon,E.S. Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism* **20**, 54-62 (1971).
3. Claycombe,K.J. *et al.* Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes. *Am. J. Physiol* **274**, R1253-R1259 (1998).
4. Moustaid,N., Jones,B.H. & Taylor,J.W. Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J. Nutr.* **126**, 865-870 (1996).
5. Marin,P. *et al.* Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *Am. J. Physiol* **263**, E473-E480 (1992).
6. Letexier,D., Pinteur,C., Large,V., Frering,V. & Beylot,M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J. Lipid Res.* **44**, 2127-2134 (2003).
7. Diraison,F., Dusserre,E., Vidal,H., Sothier,M. & Beylot,M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **282**, E46-E51 (2002).
8. Goldrick,R.B. Effects of insulin on glucose metabolism in isolated human fat cells. *J. Lipid Res.* **8**, 581-588 (1967).
9. Clarke,S.D. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 13-18 (2004).
10. Horton,J.D., Goldstein,J.L. & Brown,M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest* **109**, 1125-1131 (2002).
11. Uyeda,K., Yamashita,H. & Kawaguchi,T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 2075-2080 (2002).
12. Imaizumi,K., Fainaru,M. & Havel,R.J. Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins. *J. Lipid Res.* **19**, 712-722 (1978).
13. Scanu,A. Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase. *Science* **153**, 640-641 (1966).
14. Braun,J.E. & Severson,D.L. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* **287 (Pt 2)**, 337-347 (1992).
15. Zhang,L., Lookene,A., Wu,G. & Olivecrona,G. Calcium triggers folding of lipoprotein lipase into active dimers. *J. Biol. Chem.* **280**, 42580-42591 (2005).

16. Schaffer, J.E. & Lodish, H.F. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* **79**, 427-436 (1994).
17. Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D. & Lodish, H.F. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev. Cell* **2**, 477-488 (2002).
18. Abumrad, N.A., el Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E. & Grimaldi, P.A. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* **268**, 17665-17668 (1993).
19. Isola, L.M. *et al.* 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 9866-9870 (1995).
20. Fisher, R.M., Thorne, A., Hamsten, A. & Arner, P. Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals. *Mol. Cell Biochem.* **239**, 95-100 (2002).
21. Herrmann, T. *et al.* Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase. *Gene* **270**, 31-40 (2001).
22. Brasaemle, D.L. *et al.* Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 38486-38493 (2000).
23. Blanchette-Mackie, E.J. *et al.* Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J. Lipid Res.* **36**, 1211-1226 (1995).
24. Martinez-Botas, J. *et al.* Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr*(db/db) mice. *Nat. Genet.* **26**, 474-479 (2000).
25. Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M. & Beisiegel, U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J. Mol. Med.* **80**, 576-584 (2002).
26. Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. & Stanley, K.K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164 (1989).
27. Beisiegel, U., Weber, W. & Bengtsson-Olivecrona, G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 8342-8346 (1991).
28. Farkas, J., Angel, A. & Avigan, M.I. Studies on the compartmentation of lipid in adipose cells. II. Cholesterol accumulation and distribution in adipose tissue components. *J. Lipid Res.* **14**, 344-356 (1973).
29. Krause, B.R. & Hartman, A.D. Relationship between cell size, plasma cholesterol and rat adipocyte cholesterol storage. *Biochim. Biophys. Acta* **450**, 197-205 (1976).

30. Bjorntorp,P. & Sjostrom,L. The composition and metabolism in vitro of adipose tissue fat cells of different sizes. *Eur. J. Clin. Invest* **2**, 78-84 (1972).
31. Goodman,D.S., Smith,F.R., Sepowitz,A.H., Ramakrishnan,R. & Dell,R.B. Prediction of the parameters of whole body cholesterol metabolism in humans. *J. Lipid Res.* **21**, 699-713 (1980).
32. Nestel,P.J., Schreiberman,P.H. & Ahrens,E.H., Jr. Cholesterol metabolism in human obesity. *J. Clin. Invest* **52**, 2389-2397 (1973).
33. Merida,E., Delgado,E., Molina,L.M., Villanueva-Penacarrillo,M.L. & Valverde,I. Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **77**, 1654-1657 (1993).
34. Langin,D., Holm,C. & Lafontan,M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 93-109 (1996).
35. Dodt,C., Lonroth,P., Wellhoner,J.P., Fehm,H.L. & Elam,M. Sympathetic control of white adipose tissue in lean and obese humans. *Acta Physiol Scand.* **177**, 351-357 (2003).
36. Londos,C. *et al.* Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 611-615 (1995).
37. Clifford,G.M., Londos,C., Kraemer,F.B., Vernon,R.G. & Yeaman,S.J. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5011-5015 (2000).
38. Fredrikson,G., Tornqvist,H. & Belfrage,P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* **876**, 288-293 (1986).
39. Yen,C.L. & Farese,R.V., Jr. Fat breakdown: a function for CGI-58 (ABHD5) provides a new piece of the puzzle. *Cell Metab* **3**, 305-307 (2006).
40. Zimmermann,R. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386 (2004).
41. Ryden,M. *et al.* Comparative Studies of the Role of Hormone Sensitive Lipase and Adipose Triglyceride Lipase in Human Fat Cell Lipolysis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* (2007).
42. Coppack,S.W., Frayn,K.N., Humphreys,S.M., Dhar,H. & Hockaday,T.D. Effects of insulin on human adipose tissue metabolism in vivo. *Clin. Sci. (Lond)* **77**, 663-670 (1989).
43. Arner,P. Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. *Diabetes Metab Rev.* **4**, 507-515 (1988).
44. Soeder,K.J. *et al.* The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **274**, 12017-12022 (1999).

45. Greenberg,A.S. *et al.* Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 45456-45461 (2001).
46. Kishida,K. *et al.* Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J. Biol. Chem.* **276**, 36251-36260 (2001).
47. Zimmet,P., Alberti,K.G. & Shaw,J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-787 (2001).
48. Fain,J.N., Madan,A.K., Hiler,M.L., Cheema,P. & Bahouth,S.W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273-2282 (2004).
49. Leshan,R.L., Bjornholm,M., Munzberg,H. & Myers,M.G., Jr. Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity. (Silver. Spring)* **14 Suppl 5**, 208S-212S (2006).
50. Ahima,R.S., Kelly,J., Elmquist,J.K. & Flier,J.S. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* **140**, 4923-4931 (1999).
51. Clement,K. *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**, 398-401 (1998).
52. Cohen,P. *et al.* Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J. Clin. Invest* **108**, 1113-1121 (2001).
53. Morton,G.J. *et al.* Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats. *Endocrinology* **144**, 2016-2024 (2003).
54. Minokoshi,Y. *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**, 339-343 (2002).
55. Ouchi,N. *et al.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **100**, 2473-2476 (1999).
56. Tomas,E. *et al.* Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 16309-16313 (2002).
57. Wu,X. *et al.* Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* **52**, 1355-1363 (2003).
58. Ukkola,O. Resistin - a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur. J. Endocrinol.* **147**, 571-574 (2002).
59. Landry,D.B., Couper,L.L., Bryant,S.R. & Lindner,V. Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell

- adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am. J. Pathol.* **151**, 1085-1095 (1997).
60. Levy, E. *et al.* Circulating tumor necrosis factor-alpha levels and lipid abnormalities in patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* **34**, 162-166 (1993).
 61. Stephens, J.M., Lee, J. & Pilch, P.F. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* **272**, 971-976 (1997).
 62. Ruan, H. *et al.* Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* **51**, 3176-3188 (2002).
 63. Hotamisligil, G.S. Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27 Suppl 3**, S53-S55 (2003).
 64. Rotter, V., Nagaev, I. & Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* **278**, 45777-45784 (2003).
 65. Greenberg, A.S. *et al.* Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* **52**, 4113-4116 (1992).
 66. Nonogaki, K. *et al.* Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* **136**, 2143-2149 (1995).
 67. Senn, J.J. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 13740-13746 (2003).
 68. van, H., V *et al.* Mechanisms involved in the regulation of free fatty acid release from isolated human fat cells by acylation-stimulating protein and insulin. *J. Biol. Chem.* **274**, 18243-18251 (1999).
 69. Sartipy, P. & Loskutoff, D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 7265-7270 (2003).
 70. Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26746-26749 (1995).
 71. Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T. & Tomita, M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 803-812 (1996).
 72. Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B.M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* **271**, 10697-10703 (1996).

73. Maeda,K. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 286-289 (1996).
74. Waki,H. *et al.* Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.* **278**, 40352-40363 (2003).
75. Fruebis,J. *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 2005-2010 (2001).
76. Iwaki,M. *et al.* Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52**, 1655-1663 (2003).
77. Yamauchi,T. *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**, 762-769 (2003).
78. Yamauchi,T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8**, 1288-1295 (2002).
79. Yamauchi,T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941-946 (2001).
80. Tschritter,O. *et al.* Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* **52**, 239-243 (2003).
81. Ouchi,N. *et al.* Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* **103**, 1057-1063 (2001).
82. Gerhardt,C.C., Romero,I.A., Canello,R., Camoin,L. & Strosberg,A.D. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* **175**, 81-92 (2001).
83. Xu,H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest* **112**, 1821-1830 (2003).
84. Smith,C.A., Farrah,T. & Goodwin,R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962 (1994).
85. Souza,S.C. *et al.* Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 24665-24669 (1998).
86. Kawakami,M. *et al.* Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **101**, 331-338 (1987).
87. Green,A., Dobias,S.B., Walters,D.J. & Brasier,A.R. Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. *Endocrinology* **134**, 2581-2588 (1994).

88. Zhang,H.H., Halbleib,M., Ahmad,F., Manganiello,V.C. & Greenberg,A.S. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* **51**, 2929-2935 (2002).
89. Feingold,K.R. & Grunfeld,C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes* **41 Suppl 2**, 97-101 (1992).
90. Grunfeld,C. *et al.* Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **74**, 1045-1052 (1992).
91. Iademarco,M.F., McQuillan,J.J. & Dean,D.C. Vascular cell adhesion molecule 1: contrasting transcriptional control mechanisms in muscle and endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 3943-3947 (1993).
92. Hotamisligil,G.S., Shargill,N.S. & Spiegelman,B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993).
93. Uysal,K.T., Wiesbrock,S.M., Marino,M.W. & Hotamisligil,G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* **389**, 610-614 (1997).
94. Uysal,K.T., Wiesbrock,S.M. & Hotamisligil,G.S. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* **139**, 4832-4838 (1998).
95. Mohamed-Ali,V. *et al.* Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 4196-4200 (1997).
96. Fried,S.K., Bunkin,D.A. & Greenberg,A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 847-850 (1998).
97. Meydani,S.N. *et al.* Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J. Nutr.* **121**, 547-555 (1991).
98. Pottratz,S.T., Bellido,T., Mocharla,H., Crabb,D. & Manolagas,S.C. 17 beta-Estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J. Clin. Invest* **93**, 944-950 (1994).
99. Han,S.N. *et al.* Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **43**, 445-452 (2002).
100. Fasshauer,M., Klein,J., Lossner,U. & Paschke,R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm. Metab Res.* **35**, 147-152 (2003).

101. Mohamed-Ali,V. *et al.* beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**, 5864-5869 (2001).
102. Libermann,T.A. & Baltimore,D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2327-2334 (1990).
103. Matsusaka,T. *et al.* Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10193-10197 (1993).
104. Emanuelli,B. *et al.* SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 15985-15991 (2000).
105. Kahn,S.E., Hull,R.L. & Utzschneider,K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840-846 (2006).
106. Carey,D.G., Jenkins,A.B., Campbell,L.V., Freund,J. & Chisholm,D.J. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* **45**, 633-638 (1996).
107. Hirsch,J. & Batchelor,B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin. Endocrinol. Metab* **5**, 299-311 (1976).
108. Frederich,R.C. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* **1**, 1311-1314 (1995).
109. Arita,Y. *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 79-83 (1999).
110. Weyer,C. *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**, 1930-1935 (2001).
111. Yang,W.S. *et al.* Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**, 3815-3819 (2001).
112. Hotamisligil,G.S., Arner,P., Caro,J.F., Atkinson,R.L. & Spiegelman,B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest* **95**, 2409-2415 (1995).
113. Kern,P.A., Ranganathan,S., Li,C., Wood,L. & Ranganathan,G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **280**, E745-E751 (2001).
114. Kern,P.A. *et al.* The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest* **95**, 2111-2119 (1995).
115. Fasshauer,M. *et al.* Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 1045-1050 (2003).

116. Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M. & Paschke, R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1084-1089 (2002).
117. Kappes, A. & Loffler, G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm. Metab Res.* **32**, 548-554 (2000).
118. Weisberg, S.P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest* **112**, 1796-1808 (2003).
119. Keaney, J.F., Jr. *et al.* Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 434-439 (2003).
120. Urakawa, H. *et al.* Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **88**, 4673-4676 (2003).
121. Uzun, H. *et al.* Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. *Obes. Surg.* **14**, 659-665 (2004).
122. Porreca, E. *et al.* Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women. *Atherosclerosis* **175**, 139-143 (2004).
123. Weinbrenner, T. *et al.* Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 30-35 (2006).
124. Lin, Y. *et al.* The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **280**, 4617-4626 (2005).
125. Ozcan, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461 (2004).
126. Nakatani, Y. *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J. Biol. Chem.* **280**, 847-851 (2005).
127. Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest* **115**, 1111-1119 (2005).
128. Bastard, J.P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4-12 (2006).
129. McGarry, J.D. & Dobbins, R.L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* **42**, 128-138 (1999).
130. Eldor, R. & Raz, I. Lipotoxicity versus adipotoxicity-The deleterious effects of adipose tissue on beta cells in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **74 Suppl 1**, S3-S8 (2006).

131. Rakatzi,I., Mueller,H., Ritzeler,O., Tennagels,N. & Eckel,J. Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetologia* **47**, 249-258 (2004).
132. Yki-Jarvinen,H. Ectopic fat accumulation: an important cause of insulin resistance in humans. *J. R. Soc. Med.* **95 Suppl 42**, 39-45 (2002).
133. Petersen,K.F., Dufour,S., Befroy,D., Garcia,R. & Shulman,G.I. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **350**, 664-671 (2004).
134. Zhang,Y.L. *et al.* Regulation of hepatic apolipoprotein B-lipoprotein assembly and secretion by the availability of fatty acids. I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. *J. Biol. Chem.* **279**, 19362-19374 (2004).
135. Kissebah,A.H., Alfarsi,S., Adams,P.W. & Wynn,V. The metabolic fate of plasma lipoproteins in normal subjects and in patients with insulin resistance and endogenous hypertriglyceridaemia. *Diabetologia* **12**, 501-509 (1976).
136. Haemmerle,G. *et al.* Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* **277**, 4806-4815 (2002).
137. Moitra,J. *et al.* Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* **12**, 3168-3181 (1998).
138. Garg,A. & Misra,A. Lipodystrophies: rare disorders causing metabolic syndrome. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* **33**, 305-331 (2004).
139. Roden,M. *et al.* Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest* **97**, 2859-2865 (1996).
140. Roden,M. *et al.* Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* **49**, 701-707 (2000).
141. Pirola,L., Johnston,A.M. & Van Obberghen,E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* **47**, 170-184 (2004).
142. Arner,P., Pollare,T., Lithell,H. & Livingston,J.N. Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **30**, 437-440 (1987).
143. Sun,X.J., Goldberg,J.L., Qiao,L.Y. & Mitchell,J.J. Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* **48**, 1359-1364 (1999).
144. Jullien,D. *et al.* Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* **268**, 15246-15251 (1993).

145. Yu,C. *et al.* Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.* **277**, 50230-50236 (2002).
146. Shulman,G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest* **106**, 171-176 (2000).
147. Yang,Q. *et al.* Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**, 356-362 (2005).
148. Hirosumi,J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336 (2002).
149. Green,H. & Meuth,M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133 (1974).
150. Green,H. & Kehinde,O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* **7**, 105-113 (1976).
151. Simonsen,J.L. *et al.* Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 592-596 (2002).
152. Abdallah,B.M. *et al.* 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**, 527-538 (2005).
153. Pittenger,M.F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
154. Prawitt,J., Niemeier,A., Kassem,M., Beisiegel,U. & Heeren,J. Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* **314**, 814-824 (2008).
155. Rosen,E.D., Walkey,C.J., Puigserver,P. & Spiegelman,B.M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 1293-1307 (2000).
156. Yeh,W.C., Cao,Z., Classon,M. & McKnight,S.L. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* **9**, 168-181 (1995).
157. Wu,Z., Bucher,N.L. & Farmer,S.R. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4128-4136 (1996).
158. Hauner,H. Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions. *Endocrinology* **127**, 865-872 (1990).

159. Tontonoz,P., Hu,E., Graves,R.A., Budavari,A.I. & Spiegelman,B.M. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* **8**, 1224-1234 (1994).
160. Yue,L., Rasouli,N., Ranganathan,G., Kern,P.A. & Mazzone,T. Divergent effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists and tumor necrosis factor alpha on adipocyte ApoE expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 47626-47632 (2004).
161. Armoni,M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma represses GLUT4 promoter activity in primary adipocytes, and rosiglitazone alleviates this effect. *J. Biol. Chem.* **278**, 30614-30623 (2003).
162. Gauthier,A., Vassiliou,G., Benoist,F. & McPherson,R. Adipocyte low density lipoprotein receptor-related protein gene expression and function is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* **278**, 11945-11953 (2003).
163. Fajas,L. *et al.* Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5495-5503 (1999).
164. Heeren,J., Grewal,T., Jackle,S. & Beisiegel,U. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 42333-42338 (2001).
165. Vicennati,V., Vottero,A., Friedman,C. & Papanicolaou,D.A. Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **26**, 905-911 (2002).
166. Fried,S.K., Bunkin,D.A. & Greenberg,A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 847-850 (1998).
167. Breuninger,L.M., Dempsey,W.L., Uhl,J. & Murasko,D.M. Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **69**, 205-214 (1993).
168. Wulster-Radcliffe,M.C., Ajuwon,K.M., Wang,J., Christian,J.A. & Spurlock,M.E. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 924-929 (2004).
169. Combs,T.P. *et al.* Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* **143**, 998-1007 (2002).
170. Tsuchida,A. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes* **54**, 3358-3370 (2005).

171. Yilmaz, M.I. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) agonist increases plasma adiponectin levels in type 2 diabetic patients with proteinuria. *Endocrine*. **25**, 207-214 (2004).
172. He, W. *et al.* Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 15712-15717 (2003).
173. Korner, A. *et al.* Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 540-550 (2005).
174. Gafvels, M.E. *et al.* Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homolog of the very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19. *Endocrinology* **135**, 387-394 (1994).
175. Ensler, K., Mohammadi, M., Broijers, A., Angelin, B. & Gafvels, M. Dexamethasone stimulates very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene expression in differentiating 3T3-L1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1581**, 36-48 (2002).
176. Sakai, J. *et al.* Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 2173-2182 (1994).
177. Takahashi, S., Kawarabayashi, Y., Nakai, T., Sakai, J. & Yamamoto, T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 9252-9256 (1992).
178. Niemeier, A. *et al.* VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J. Lipid Res.* **37**, 1733-1742 (1996).
179. Beisiegel, U. & Heeren, J. Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc. Nutr. Soc.* **56**, 731-737 (1997).
180. Frykman, P.K., Brown, M.S., Yamamoto, T., Goldstein, J.L. & Herz, J. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 8453-8457 (1995).
181. Goudriaan, J.R. *et al.* Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1488-1493 (2001).
182. Kim, K.Y. *et al.* c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 460-467 (2005).
183. Bruun, J.M., Roeske-Nielsen, A., Richelsen, B., Fredman, P. & Buschard, K. Sulfatide increases adiponectin and decreases TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human adipose tissue in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* **263**, 142-148 (2007).

184. van, H., V, Skurk, T., Rohrig, K. & Hauner, H. HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin inhibits interleukin-6 expression and secretion in human adipocytes. *Horm. Metab Res.* **35**, 466-470 (2003).
185. Rezaie-Majd, A. *et al.* Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1194-1199 (2002).
186. Ito, T. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **16**, 121-126 (2002).
187. Chan, D.C., Watts, G.F., Barrett, P.H., Beilin, L.J. & Mori, T.A. Effect of atorvastatin and fish oil on plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations in individuals with visceral obesity. *Clin. Chem.* **48**, 877-883 (2002).
188. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126 (1999).
189. Li, Y. *et al.* Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 37030-37039 (2004).
190. Li, Y. *et al.* Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 21763-21772 (2005).
191. Ajuwon, K.M. & Spurlock, M.E. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* **135**, 1841-1846 (2005).
192. Weigert, C. *et al.* Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* **279**, 23942-23952 (2004).
193. Flachs, P. *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* **49**, 394-397 (2006).
194. Inoue, N., Nagao, K., Hirata, J., Wang, Y.M. & Yanagita, T. Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 679-684 (2004).
195. Todoric, J. *et al.* Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* **49**, 2109-2119 (2006).

Danksagung

An diesem Punkt möchte ich mich bei folgenden Personen herzlich bedanken:

Dr. Jörg Heeren und Prof. Ulrike Beisiegel für die tolle Unterstützung und hilfreiche Begleitung meiner Arbeit.

Insbesondere Sandra Ehret und Janne Prawitt für die geduldige Einarbeitung

All den medizinischen und naturwissenschaftlichen Doktoranden und medizinischen Assistenten für eine wundervolle und kollegiale Laboratmosphäre

Lebenslauf

Schulbildung	<p>1989 – 1993 Grundschule Lutterothstraße, Hamburg</p> <p>1993 – 2002 Helene-Lange Gymnasium, Hamburg (bilingualer Zweig) Oberstufe am Bismarckgymnasium, Hamburg Abschluss: Hochschulreife, Gesamtnote: 1,7</p> <p>1999 –2000 Lewistown Area High School, Pennsylvania / USA Abschluss: High School Diploma</p>
Sprachreisen	<p>1998 2 wöchiger Sprachaustausch nach Canterbury, England</p> <p>1999 Auslandsstudienjahr, Pennsylvania / USA</p>
Zivildienst	<p>2002-2003 Israelitisches Krankenhaus, Hamburg</p>
Studium	<p>2003-2010 Studium der Medizin, Universität Hamburg (UKE)</p> <p>2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum), Gesamtnote: gut Wahlfach: Molekulare Biochemie und zelluläre Signaltransduktion, Note: Sehr gut</p> <p>2006 Wahlblock „Experimentelle Medizin“, Note: Sehr gut</p> <p>2006-2008 Dissertation am Institut für molekulare Zellbiologie IBM II, UKE Betreuung durch Prof. Dr. Dr. Beisiegel, Thema: „Regulation der Adipozytokinsekretion in einem humanen Adipozytenmodell“</p>
Famulaturen	<p>2007 Kardiologie, Klinikum Garmisch-Partenkirchen Pädiatrie, Klinikum Garmisch-Partenkirchen</p> <p>2008 Internistische Notaufnahme, AK St. Georg, Hamburg Herz- und Thoraxchirurgie, Beillinson Hospital, Tel Aviv, Israel Infektiologie, Komfo Anokye Teaching Hospital , Kumasi, Ghana</p>
Studentische Aktivitäten	<p>2004-2005 Zusatzqualifikation „Grundlagen der molekularen Medizin“</p> <p>2005-2008 Studentenvertreter im Fachschaftsrates Medizin, Referent für Öffentlichkeitsarbeit</p> <p>2007-2008 Studentenvertreter im Fakultätsrat des UKE</p>
Praktisches Jahr	<p>2009 Allgemein Chirurgie, Elmhurst Medical Center, Mount Sinai Medical School , New York, USA Allgemeine Kinderchirurgie, Hospital for Sick Children, University of Toronto, Canada Innere Medizin; Asklepios AK St. Georg, Hamburg Pädiatrie, Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg</p>
Berufliche Tätigkeiten	<p>2000-2004 Ehrenamtlicher Schwimmtrainer beim SG Hamburg West</p> <p>2007-2009 Studentische Hilfskraft in der Notaufnahme des UKE</p>

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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: _____